

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***STREPTOCOCCUS PYOGENES* VİRULANS
PROTEAZINA SPESİFİK DNA APTAMERLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Kaan Sami TÜZÜN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 03.09.2018

Bornova-İZMİR

2018



Kaan Sami TÜZÜN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Streptococcus pyogenes virulans proteazına spesifik DNA aptamerlerinin geliştirilmesi*” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.09.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Serap EVRAN

.....

Raportör Üye : Doç. Dr. Burcu OKUTUCU

.....

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Halil KOYU

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Streptococcus Pyogenes* Virulans Proteazına Spesifik DNA Aptamerlerinin Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 09 / 2018



İmzası

Adı-Soyadı

Kaan Sami TÜZÜN



ÖZET

***STREPTOCOCCUS PYOGENES* VİRÜLANS PROTEAZINA SPESİFİK DNA APTAMERLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

TÜZÜN, Kaan Sami

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap EVRAN

Eylül 2018, 87 sayfa

Yanlış veya gereksiz antibiyotik kullanımı nedeni ile antibiyotik dirençliliği kazanmış patojen bakteriler tüm dünya için bir tehdit oluşturmaktadır. *S. pyogenes*, penisiline duyarlıdır ve günümüzde *S. pyogenes* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk aşamada kullanılmaktadır. Penisiline direnç rapor edilmemiştir, ancak penisilin alerjisi olan kişilerde kullanılan makrolid antibiyotiklere dirençli izolatların sayısı giderek artmaktadır.

Bu sorunun çözümü için potansiyel ilaç moleküllerinin elde edilmesi amacı ile *S. pyogenes*'in virulans mekanizmasında rol oynayan SpyCEP enzimi hedef olarak seçildi. DNA aptamerlerinin geliştirilmesi amacı ile SELEX yöntemi kullanılarak SpyCEP enzimine bağlanan ve inhibe eden DNA aptamerleri geliştirildi.

Key words: *S. pyogenes*, SpyCEP, Aptamer, SELEX.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SPECIFIC DNA APTAMERS AGAINST VIRULENCE PROTEASE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

TÜZÜN, Kaan Sami

Master of Science Thesis, Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serap EVRAN

September 2018, 87 pages

Pathogenic bacteria that have acquired antibiotic resistance due to incorrect or unnecessary use of antibiotics pose a threat to the whole world. *S. pyogenes* is penicillin sensitive and penicillin is currently used in the first step in the treatment of *S. pyogenes* infections. Penicillin resistance has not been reported, but the number of macrolide antibiotic resistant isolates used in people with penicillin allergy is increasing.

To solve this problem, SpyCEP enzyme, which plays a role in the virulence mechanism of *S. pyogenes*, was selected as a target for obtaining potential drug molecules. DNA aptamers were developed using the SELEX method to develop DNA aptamers that bind to and inhibit the enzyme SpyCEP.

Anahtar sözcükler: *S. pyogenes*, SpyCEP, Aptamer, SELEX.



TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmalarımda benden bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım, Doç. Dr. Serap Evran'a;

Bilgi ve tecrübelerini paylaşan, laboratuvar çalışma arkadaşlarım, Burhan Bora, Dr. Canan Özyurt, Özge Uğurlu, Ezgi Man, Merve Gültan ve Merve Bilici'ye;

Tez çalışmasını destekleyen ve burs imkânı sağlayan TÜBİTAK'a (TÜBİTAK proje no. 214Z290);

BAP kapsamında destek veren Ege Üniversitesi'ne;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca destek olan bütün hocalarıma ve biyokimya bölümü öğrencilerine;

Maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme;

Teşekkür ederim



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	Vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜRLER	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Aptamerler	1
1.2 <i>Streptococcus Pyogenes</i> ve SpyCEP.....	5
2. MATERYAL VE METHOD	8
2.1 Kullanılan Bakteriler.....	8
2.2 Vektörler	8
2.3 Primer Dizileri.....	9
2.4 Bakteri Kültür Ortamları.....	10
2.5 Tamponlar ve Çözeltiler.....	10
2.6 Diğer Sarflar ve Cihazlar	12
2.7 Sterilizasyon.....	13
2.8 <i>S. pyogenes</i> 'den Genomik DNA İzolasyonu.....	13
2.9 WGA Kiti ile Genomik DNA Amplifikasyonu	13
2.10 DNA Fragmentlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	14
2.11 Agaroz Jel Elektrophorezi	14

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.12 DNA Framentlerinin Agaroza Jelden Ekstraksiyonu	14
2.13 Plazmit ve DNA fragmentlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	14
2.14 Plazmit ve DNA Fragmentlerinin Ligasyonu	14
2.15 Kimyasal Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ($\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ yöntemi)	15
2.16 Kimyasal Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyon	15
2.17 Koloni PCR.....	15
2.18 Küçük Ölçekte Test Ekspresyonu	16
2.19 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	17
2.20 Metal Şelat Afinitite kromatografisi	17
2.21 ELISA Testi ve SpyCEP Aktivite Tayini	18
2.22 DNA Aptamer Kütüphanesinin PCR ile Amplifikasyonu	18
2.23 SELEX Adımlarında Kullanılacak Olan SpyCEP-İmmobilize Magnetik Boncukların Hazırlanması	19
2.24 SELEX Prosedürü	19
2.25 Tek İplikli DNA (ssDNA) Kütüphanesinin Elde Edilmesi.....	20
2.26 Kalitatif SpyCEP İnhibisyon Testi.....	22
2.27 Kantitatif SpyCEP İnhibisyon Tayini	23
2.28 Aptamer SpyCEP Bağlanmasının karakterizasyonu.....	24
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
3.1 Test Ekspresyonu Yoluyla Optimum Rekombinant Üretim Koşullarının Belirlenmesi	25
3.2 Büyük Ölçekte Protein Üretimi	27

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3 ELISA ile Proteaz Aktivitesinin Kontrol Edilmesi	29
3.4 Rekombinant Üretim Koşullarının Optimizasyonu	32
3.5 Tek iplikli DNA (ssDNA) Aptamer Kütüphanesinin PCR ile Amplifikasyonu.....	35
3.6 Çift iplikli DNA'dan ssDNA Elde Edilmesi Amacıyla ile Kullanılan Lambda Ekzonükleaz Kesim Reaksiyonu Koşullarının Optimizasyonu	37
3.7 Rekombinant SpyCEP'in Magnetik Boncuklara İmmobilizasyonu	40
3.8 SELEX Çalışmaları.....	42
3.9 Sekans Sonuçları	44
3.10 Aptamer SpyCEP Etkileşiminin ELAA Yöntemiyle Analizi	48
3.11 İnhibisyon Testi Sonuçları	50
3.11.1 SDS-PAGE sonuçları.....	50
3.11.2 Western blot sonuçları	52
3.11.3 ELISA ile inhibisyon testi sonuçları	54
3.11.4 Aptamerlerin sekonder yapılarının karşılaştırılması	56
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	58
KAYNAKLAR DİZİNİ	60
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Aptamer geliştirilmesi adımları.....	2
Şekil 1.2 Faz 3 klinik deneme aşamasına gelen aptamerlerin yapıları (Pegaptanib, Pegnivacogin, Pegpleranib)..	5
Şekil 2.1 pET 21a vektör haritası.....	8
Şekil 2.2 SELEX adımlar.....	22
Şekil 2.3 ssDNA elde edilmesi amacı ile kullanılan lambda ekzonükleaz kesimi ve kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	22
Şekil 3.1 Tam uzunluktaki SpyCEP ekspresyonu, <i>E. coli</i> Rosetta 2 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi..	25
Şekil 3.2 20°C’de 2 gün süre ile gerçekleştirilen üretim ve saflaştırmaya ilişkin kromatogram.	28
Şekil 3.3 25°C’de gece boyu gerçekleştirilen üretim ve saflaştırmaya ilişkin kromatogram.	28
Şekil 3.4 ELISA kiti için oluşturulan standart grafiği.	30
Şekil 3.5 ELISA test plakasında proteaz aktivitesine ilişkin olarak elde edilen kolorimetrik sinyal.....	31
Şekil 3.6 Tam uzunluktaki SpyCEP’in rekombinant üretimi için gerçekleştirilen test ekspresyonlarına ilişkin SDS-PAGE görüntüsü..	34
Şekil 3.7 Aptamer kütüphanesinin amplifikasyonu için uygulanan gradient PCR’a ilişkin agaroz jel görüntüsü.	36
Şekil 3.8 PCR döngü sayısının belirlenmesi.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.9 Lambda ekzonükleaz kesim reaksiyonu süresi.....	38
Şekil 3.10 Lambda ekzonükleaz aktivitesi.....	38
Şekil 3.11 SYBR Gold ile boyanmış agaroz jel.....	39
Şekil 3.12 ssDNA eldesi.. ..	40
Şekil 3.13 IL-8 ELISA testi.. ..	42
Şekil 3.14 ssDNA'dan dsDNA eldesi.	43
Şekil 3.15 IL-8 Elüsyonundan elde edilen diziler için alınan “MEME Suite” sonucunu	45
Şekil 3.16 Termal elüsyonundan elde edilen diziler için alınan “MEME Suite” sonucunu	45
Şekil 3.17 Elde edilen bütün diziler için alınan “MEME Suite” sonucunu	46
Şekil 3.18 Reverse prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimi.....	49
Şekil 3.19 Forward prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimi.....	49
Şekil 3.20 8,14, 23, 29, 33 ve 49 numaralı aptamerlerin SpyCEP ile etkileşimi ELAA yöntemiyle tespit edildi.	50
Şekil 3.21 SpyCEP aktivitesinin inhibisyonu.. ..	51
Şekil 3.22 Degrade olmayan IL-8 bantlarının Image j programıyla hesaplanan pik alanları.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.23 SpyCEP aktivitesinin inhibisyonun Western blot ile tayini.	53
Şekil 3.24 Western blot için IL-8 degradasyon ürünlerinin Image j programıyla hesaplanan pik ve pik alanları.	53
Şekil 3.25 SpyCEP aktivite testi.	54
Şekil 3.26 ELISA inhibisyon testi.	55
Şekil 3.27 29, 33 ve 49 numaralı aptamerler ile tekrar edilen inhibisyon denemesi sonuçları.	56
Şekil 3.28 aptamerlerin (8, 14, 23, 29, 33 ve 49 numaralı aptamerler) sekonder yapıları.	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

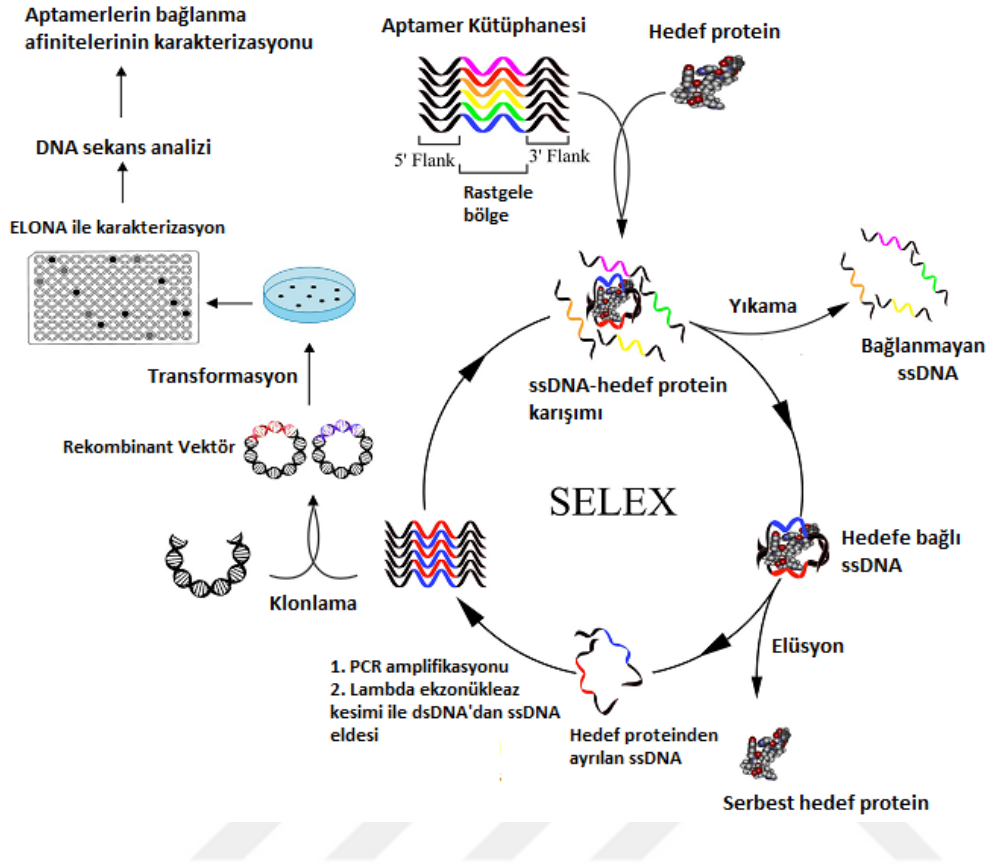
<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Aptamerler ve antikorların bazı özelliklerinin karşılaştırılması Nimjee et al., 2017	3
Çizelge 2.1 SDS-PAGE jel içerikleri	17
Çizelge 2.2 SELEX turları boyunca değişen parametreler	20
Çizelge 3.1 Tam uzunluktaki SpyCEP için IL-8 proteoliz tayinine ilişkin sonuçlar. Tabloda verilen hacimlerde eklenen fraksiyonların aktivitesi, <i>Bacillus subtilis</i> tarafından üretilen SpyCEP'in aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. <i>Bacillus subtilis</i> tarafından üretilen SpyCEP, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.	31
Çizelge 3.2 Klonlama amacı ile kullanılan primerler	32
Çizelge 3.3 Rekombinant SpyCEP üretimi için gece boyu süresince gerçekleştirilen test ekspresyonu koşulları	33
Çizelge 3.4 Gradient PCR karışımı.....	35
Çizelge 3.5 Gradient PCR programı	36
Çizelge 3.6 IL-8 Elüsyonundan elde edilen diziler “MEME Suite” programından eşleştirilmesi	45
Çizelge 3.7 Termal elüsyonundan elde edilen diziler “MEME Suite” programından eşleştirilmesi	46
Çizelge 3.8 Elde edilen bütün dizilerin “MEME Suite” programından eşleştirilmesi.....	47
Çizelge 3.9 Karakterizasyon için seçilen diziler, E ve G değerleri.....	48

1. GİRİŞ

1.1 Aptamerler

Aptamerler hedeflerine yüksek spesifiklik ve ilgi ile bağlanan tek iplikli DNA ya da RNA molekülleridir. Aptamerler SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) ismi verilen bir proses ile geliştirilirler (Stoltenburg et al., 2007). İlk aptamer 1990 yılında iki farklı grup tarafından tanımlanmıştır (Tuerk and Gold, 1990, Ellington and Szostak, 1990). Bu tarihten itibaren pek çok farklı hedef için aptamer geliştirilmiştir. Bu hedefler arasında küçük moleküller (McKeague and DeRosa, 2012), canlı hücreler (Renders et al., 2017) ve hatta dokular da yer almaktadır (Heilig and Gold, 2000). SELEX yönteminde, 20-80 bazlık rastgele bir bölge ile bu bölgenin 5' ve 3' uçlarında sabit primer bağlanma bölgeleri içeren tek iplikli DNA (ssDNA) veya RNA kütüphanesi kullanılır (Şekil 1.1). Başlangıç kütüphanesindeki toplam dizi sayısı 10^{12} - 10^{15} arasında değişmektedir ve bu sayı çeşitlilik için yeterlidir. SELEX'in ilk turunda bu rastgele kütüphane hedef protein ile uygun koşullarda inkübe edilir. Ardından, hedef proteine bağlanmayan diziler uzaklaştırılır. Hedefe bağlı diziler elüe edilir ve ssDNA durumunda PCR ile, RNA durumunda RT-PCR ile çoğaltılır. Bu döngü 7-20 kez tekrar edilir. İlerleyen SELEX turlarında hedefe bağlanan nükleotid dizilerinde üstel bir zenginleşme gerçekleşene kadar prosese devam edilir. Sonuçta, hedefe yüksek spesifiklik ve afinite ile bağlanabilen aptamerler elde edilir. Hedefe bağlanan diziler *E. coli*'ye transforme edilir ve dizi analizi ile aptamer dizileri belirlenerek karakterize edilir (Stoltenburg et al., 2007, Zhuo et al., 2017). Aptamerler antikorlara kıyasla pek çok avantaja sahiptir (Çizelge 1.1). Aptamer geliştirilmesi antikor üretimi sürecine göre daha az zaman alıcı ve daha düşük maliyetlidir. Aptamerlerin depo kararlılığı ve farklı çevresel koşullara adapte edilebilir oluşları en önemli avantajlarındandır. Antikorların kullanım alanları genellikle fizyolojik koşullar ile sınırlıdır (Nimjee et al., 2017). Ancak aptamer geliştirme aşamasında, aptamerlerin bağlanma koşulları istenen koşullara uygun olarak değiştirilebilir. Bu açıdan, aptamerlerin SELEX ile seçilmeleri aşamasında istenilen pH, iyon şiddeti ve tampon bileşenleri gibi parametrelerin kontrol edilebilmesi gerçek zamanlı bir hedef bağlanmasının gerçekleştirilmesi açısından büyük bir önem taşır. Aptamerler antikorlardan farklı

olarak küçük boyutlu olmaları nedeni ile immün sistem tarafından yabancı olarak algılanmazlar.



Şekil 1.1 Aptamer geliştirilmesi adımları (Heiat vd., 2016).

Çizelge 1.1 Aptamerler ve antikorların bazı özelliklerinin karşılaştırılması Nimjee et al., 2017

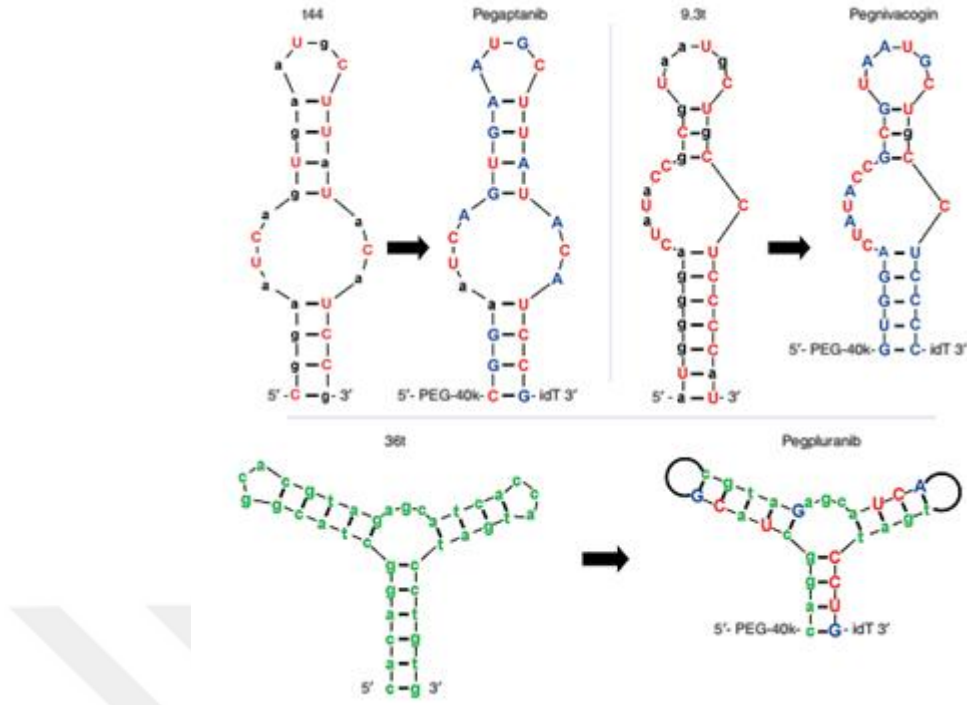
Aptamerler	Antikorlar
Bağlanma afinitesi pikomolar ile nanomolar aralığında olacak kadar düşüktür	Bağlanma afinitesi pikomolar ile nanomolar aralığında olacak kadar düşüktür
Tüm seçim <i>in vitro</i> olarak yapılan kimyasal bir prostestir ve bu nedenle her protein hedeflenebilir	Seçim biyolojik bir sistem gerektirir, bu nedenle toksinlere karşı (hayvanlar tarafından tolere edilemez) ve immünojenik olmayan hedeflere karşı antikor geliştirmek zordur
Değişik koşullar altında olan ligandlar için <i>in vitro</i> diagnostike elverişli seçim yapılabilir	Diagnostik için optimize edilen antikorlar fizyolojik koşullar ile sınırlanmıştır
Bilinen hedefe karşı tekrar eden turlar tarama prosesini sınırlar	Monoklonal antikorların taraması zaman alıcı ve pahalıdır
Bir defada yapılan sentezden bağımsız olarak sergilenen tek tip (standart) aktivite	Antikorların aktivitesi üretimden üretime değişebilir
Farmakokinetik parametreler isteğe göre değiştirilebilir	Farmakokinetik parametreleri modifiye etmek güçtür
Proteinin hedef bölgesini araştırmacı belirler	Proteinin hedef bölgesini immün sistem belirler
Çeşitli fonksiyonlar için moleküle geniş aralıkta kimyasal modifikasyon yapılabilir	Moleküle yapılabilecek modifikasyonlar sınırlıdır
Sıcaklık değişimi sonrasında orijinal konformasyona dönüş mümkündür	Sıcaklık duyarlıdır ve geri dönüşsüz denaturasyona uğrarlar
Sınırsız raf ömrü	Sınırlı raf ömrü
İmmünojenite hakkında bir kanıt yok	Dikkate değer immünojenite
Çapraz reaksiyon veren bileşenler geçiş (toggle) stratejisi ile izole edilebilir ve bu yaklaşım prelinik çalışmaları kolaylaştırır	Çapraz reaksiyon yapan bileşenleri izole etmek için strateji yoktur
İlacın inhibitör aktivitesini geri döndürmek için aptamer spesifik antidot geliştirilebilir	Molekülleri geri döndürmek için rasyonel bir metot yoktur

Trombin için çeşitli aptamerler geliştirilmiştir ve bazı aptamerlerin bağlama özelliği yanında aktivitenin inhibisyonunu da sağladığı bulunmuştur. (Avino et al., 2012). Benzer olarak, prostat-spesifik antijen (PSA) bağlayan aptamer kullanılarak aptasensör geliştirilmiştir (Cha et al., 2014). Çeşitli serin proteazlar, katepsin E, β -sekretaz 1 için aptamerler geliştirilmiştir. PSA için bir aptamerin kompetitif inhibisyon etkisi gösterdiği, diğer aptamerlerin ise ekstraselüler enzim aktivitesini kompetitif olmayan şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Dupont et al., 2011). Birçok aptamer için klinik testler devam etmektedir (Keefe et al., 2010; Xing et al., 2014). Aptamerlerin başarılı uygulamalarına örnekler, aptamer ile fonksiyonelleştirilmiş lipozomlar ile anti-kanser ilaçlarının taşınımı (Xing et al., 2013), ilaçların hedefli transportu için DNA nano-trenler (Zhu et al., 2013), ve

hedefli transport için nano-robotlar (Douglas et al., 2012) şeklinde özetlenebilir. Bakteriyel proteolitik kompleksler terapötik hedef olarak dikkat çekmektedir (Raju et al., 2012). Antimikrobiyal aptamerlerin analitik ve terapötik amaçlar ile kullanımına yönelik çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (Hamula et al., 2011, Özalp et al., 2013).

Aptamerlerin terapötik ajan olarak kullanımı umut vericidir. Örneğin, kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak, hücre proliferasyonunu, sinyal iletimini ve immun fonksiyonları düzenleyebilen yeni aptamerler geliştirilmiştir (Zhou et al., 2016). Bu aptamerlerin kanser hücre büyümesini veya metastazı durdurabildiği in vitro ve in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Birçok kanser türünde nükleolin proteini ve kemokin CXCL12 ifadesinde artış meydana gelmektedir. Nükleolin-spesifik AS1411 ve CXCL12-spesifik NOX-A12 aptamerlerinin anti-kanser etkinliği gösterilmiş ve bu iki aptamer için klinik faz çalışmaları başlatılmıştır. Terapötik uygulamalara yönelik geliştirilen bazı aptamerler patentlenmiştir. Aptamerlerin terapötik ajan olarak kullanımı umut vericidir. Bununla birlikte, SpyCEP proteazına yönelik aptamer temelli bir antimikrobiyal strateji bulunmamaktadır.

Aptamerlerin terapötik uygulamasını sınırlandıran en önemli faktör, serum nükleazları tarafından parçalanmalarıdır. Nükleazlar, aptamerin yarı ömrünü dakikalar ile sınırlandırmaktadır. Bu sorunun çözümüne yönelik olarak, aptamerler çeşitli şekillerde modifiye edilmektedirler. Şeker veya fosfat gruplarının modifikasyonu ya da 5' , 3' uçlarına çeşitli grupların eklenmesi yoluyla serum nükleazlarına karşı kararlı hale getirilmektedirler (Maier and Levy, 2016). Faz 3 klinik aşamasına gelen üç aptamer bulunmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Faz 3 klinik deneme aşamasına gelen aptamerlerin yapıları (Pegaptanib, Pegnivacogin, Pegpleranib). Aptamerler, afinitelerinin artırılması amacı ile kısaltılmış, serum nükleazlarına karşı kararlılıklarının artırılması amacı ile 40kDa PEG grubu ile modifiye edilmiş veya 3' ucundan idT grubu ile modifiye edilmişlerdir (Maier and Levy, 2016).

1.2 *Streptococcus Pyogenes* ve SpyCEP

Streptococcus pyogenes (group A Streptococcus; GAS) faranjit, impetigo, nekrotizan fasiit, ve toksik şok sendromu gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Turner et al., 2009). Dünya genelinde GAS ile ilişkili pyojenik deri enfeksiyonlarının görülme sıklığı 111 milyondan fazladır. İnvazif hastalığın yıllık görülme sıklığı ise yaklaşık 600,000 olarak bildirilmiştir (Tan et al., 2014). İncelenen bakteriyel izolatların tümü invazif karakterde değildir. Ancak, enfeksiyon sırasında non-invazif karakterden invazif karaktere fenotipik bir değişim olasıdır. Bu değişim, CovRS gibi regülatörler tarafından kontrol edilmektedir. Bu regülatörler virulans faktörlerinin ve özellikle kemokinleri parçalayan SpyCEP proteazının ekspresyonunu düzenlemektedir (Edwards et al., 2005, Sumby et al., 2006). Streptococcal hücre yüzey fibriller M proteininin anti-fagositik özellikleri dikkat çekmekle beraber, *S. pyogenes* patojen mekanizmasına

etki eden çeşitli faktörler bulunmaktadır. Streptolysin S (Sls), ekstraselüler streptococcal karboksilik esteraz (sse), immunoglobulin parçalayan enzim (Mac/Ides), *S. pyogenes* hücre zarı proteazı SpyCEP, C5a peptidaz (scpA), ve ekstraselüler streptococcal proteaz B (SpeB) diğer virulans faktörleridir (Olsen and Musser, 2010). Hücre dışına salgılanan ve membrana bağlı virulans faktörleri immun cevabı etkisiz hale getirirler ve direkt olarak konakçı dokuda hasar oluşturarak bakterinin yayılmasına katkı yaparlar. Bunun yanında, invazif karakterdeki *S.pyogenes* suşları konakçı tarafından üretilen proteazları aktive eder ve doku hasarına neden olabilir. Özellikle, MMP-2 ve MMP-9 enzimleri ekstraselüler proteaz SpeB tarafından aktive edilirler. Bakterinin sahip olduğu SpyCEP proteolitik aktivite, konakçı immun sistemin inaktivasyonuna katkı yapar. SpyCep, streptococcal hücre duvarına C-terminal üzerinden kovalent bağlıdır ve hücre dışına salgılanır. Interlökin-8'in (IL-8) SpyCEP proteazı tarafından degradasyonu sonucu nötrofil göçü ve bakterinin etkisiz hale getirilmesi engellenir. Polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) fonksiyonun zayıflaması, nekrotizan fasiit patojenezinde önemli bir rol oynar (Hidalgo-Glass et al., 2006). SpyCEP'in IL-8/CXCL8'i proteolitik parçalama aktivitesi yanında, CXCL1, 2, 3, 5, 6, ve 7 parçalama aktivitesi de bulunur. Bu şekilde, nötrofil kemokin reseptörleri CXCR1, CXCR2 ile etkileştiği bilinen tüm kemokinleri etkiler (Sumbly et al., 2008, Kurupati vd., 2010).

SpyCEP, patojen *S. pyogenes*'de IL-8 degradasyonundan sorumlu tek enzimdir. SpyCEP aktivitesi sonucu konakçı CXC kemokinlerin degradasyonu ve PMN fonksiyonunun önlenmesi *S.pyogenes*'in sistemik olarak yayılmasını sağlar. Bu nedenle, SpyCEP aşı adayı olarak tanımlanmıştır (Rodriguez-Ortega et al., 2006, Turner et al., 2009). SpyCEP'in yeni terapötik yaklaşımlar için iyi bir hedef olduğunu gösteren çeşitli in vivo çalışmalar yapılmıştır. Chiappini et al. (2012) tarafından IL-8 degradasyonu ve bunun sonucunda gerçekleşen polimorfonükleer nötrofil fonksiyonu zayıflaması araştırılmıştır. Bu çalışmada, SpyCEP-defektli *S. pyogenes*'in neden olduğu enfeksiyonlardaki kemokin düzeyleri, doğal suş enfeksiyonuna kıyasla 10-1000 kat daha yüksek bulunmuştur. Zinkernagel et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Lactococcus lactis*'de SpyCEP'in heterolog ifadesi sonucu bakterinin nötrofillere karşı %50 direnç kazandığı bulunmuştur. Bu

nedenle, SpyCEP'in *S. pyogenes*'i de nötrofillerden koruduğu öne sürülmüştür. Kurupati et al. (2010) tarafından bakterinin sistemik yayılması için SpyCEP'in gerekli ve yeterli olduğu rapor edilmiştir. Farelerde SpyCEP'e karşı aşılamanın *S. pyogenes* yayılmasını ve bu şekilde bakterinin neden olduğu invazif enfeksiyonu önlediği belirlenmiştir. Başlıca koruyucu mekanizmanın opsonizasyon yerine nötralizasyona dayalı olduğu belirtilmiştir.

Penisilin, alerjik olmayan bireylerde *S. pyogenes* enfeksiyonlarının tedavisinde halen güvenilir olarak tercih edilen bir antibiyotiktir. Penisiline duyarlı bireyler için ise, alternatif olarak makrolidler önerilmektedir. Fakat, *S. pyogenes*'in makrolide dirençliliği dünya genelinde artış göstermektedir. Antibiyotiklerin yanlış kullanımı ve antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesi arasındaki bağlantı nedeniyle, Türkiye de riskli bir durumda kabul edilmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2007 ve 2013 yılları arasında Türkiye'de antibiyotik kullanımı artış eğilimindedir. Avrupa ülkeleri ile karşılaştırıldığında, antibiyotik tüketimi bakımından Türkiye ilk sırada yer almaktadır. Penisilin kullanımı daha yüksek olmakla birlikte cefalosporin, fluoroquinolone ve makrolid kullanım oranları da oldukça yüksektir. Son raporlara göre, en yüksek düzeyde penisilin kombinasyonları kullanımı (genelde amoksisilin-klavulanik asit ile birlikte) Türkiye'de gözlenmiştir (Versporten et al., 2014). Kuzey Amerika ve Avrupa'da *S.pyogenes* enfeksiyonları 1980'lerden bu yana yoğun bir araştırma konusu olmasına rağmen, *S.pyogenes* Türkiye'de halen ciddi bir sağlık sorunudur. Yakın zamanda, kardiyovasküler cerrahi departmanında *S.pyogenes* vakası meydana gelmiştir (Tezer et al., 2014). Penisilin, halen *S.pyogenes*'e karşı etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Antibiyotik tedavisi detaylı moleküler analizlere göre şekillenmelidir. Türkiye'de, *S. pyogenes* enfeksiyonlarına yönelik epidemiyolojik araştırmalar birkaç çalışma ile sınırlıdır. 2007 yılı'nda yayımlanan bir çalışmaya göre (Özakkaş vd., 2007), *S.pyogenes*'in azitromisine duyarlı olduğu rapor edilmiştir. 2012 Yılı'nda, *S.pyogenes*'in makrolidlere dirençliliğinde artış rapor edilmiştir (Telli vd, 2012). 5-15 yaş arası çocukların %12.3'ünden *S. pyogenes* izole edilmiştir (Doğan et al., 2014).

2. MATERYAL ve METHOD

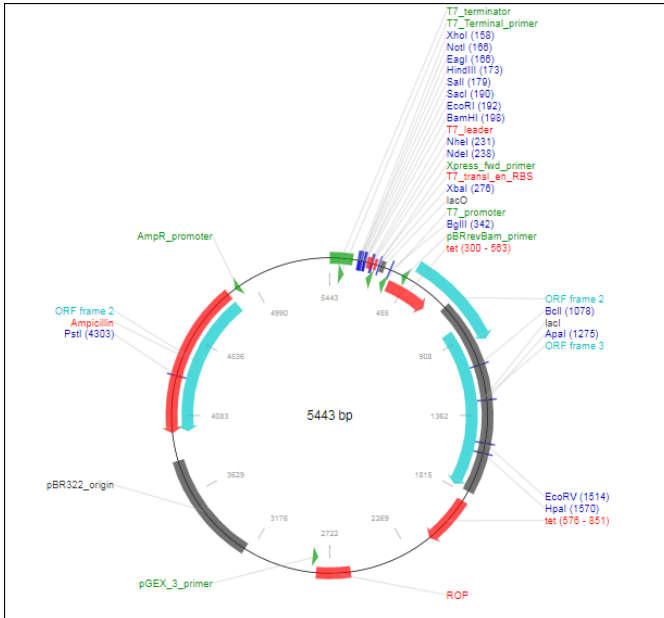
2.1 Kullanılan Bakteriler

1. *E. coli* DH5-Alpha, klonlama suşu.
2. *E. coli* Rosetta 2, ekspresyon suşu. Nadir kodonlar için gerekli tRNA'ları kodlayan plazmit içerir.

2.2 Vektörler

pET 21a (+)

Klonlama bölgesinin 3' bölgesinde altı histidin kodonu bulunmaktadır. C-terminalde altı histidin artığı ((His)₆-tag) içerecek şekilde ifade edilen protein, nikel-şelat afinite kromatografisinden yararlanılarak saflaştırılabilir. pET21a(+) vektörü beta-laktamaz kodlayan ampisilin dirençlilik geni (*bla*) içermektedir ve vektörü taşıyan hücreler bu şekilde seçilebilir. Bu suşlarda transkripsiyon izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) indüksiyonu sonucu gerçekleşir. Şekil 2.1 pET 21a vektör haritası'nda pET 21a(+) vektörüne ait gen haritası gösterilmiştir.



Şekil 2.1 pET 21a vektör haritası

2.3 Primer Dizileri

Klonlama için gerekli restriksiyon bölgelerini içeren primerler Sentegen (Ankara) firmasından sağlandı. Primer dizileri aşağıda olup, restriksiyon tanıma bölgeleri alt çizgi ile işaretlenmiştir.

5' T7 Promotor

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

3' T7 Terminatör

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

ZF_Forward

GTGCGTCATATGGCAGATGAGCTAAGCACA

ZF_Reverse

ATTTGCGGCCGCGCAGGCTTTTGCTGTTGCTGA

ZN_Reverse

GCGTGCGGCCGCGCATTGGGGACGATAGATCTTG

ZC_Forward

GTGCGTCATATGTCAACCCAGGCACCGAAA

PRAF_pET21

GATATACATATGGATGCGACTCAAAAAAGCGC

PRAR_pET21

GTGGTGCTCGAGGTTTAGGTGATCTCCTAACTT

2016_0416A-F

GTGCGTCATATGGCAGATGAGCTAAGCACAATGAGC

2016_0416A-R

ATTTGCGGCCGCTCACTCTGAACCAAGAGTGACAAGTCCTGA

Spy0416A1-F

TAGTAGGAATTCGGCAGATGAGCTAAGCACAAT

Spy0416A1-R

TAGTAGCTCGAGTCATGCCCCTTGCTGACGCGGTG

2.4 Bakteri Kültür Ortamları

Trypticase soy yeast ortamı

Trypticase soy broth 30.0 g, Yeast ekstrakt 3.0 g, Agar, 15.0 g (katı besi yeri için), Distile su 1000.0 mL, (pH 7.0 - 7.2).

Luria-Bertani-(LB)

% 0.5 (w/v) Yeast ekstrakt, % 1.0 (w/v) NaCl, %1.0 (w/v)

2.5 Tamponlar ve Çözeltiler

Ampisilin stok çözeltisi (1000×)

150 mg/mL ampisilin (Na-tuzu) suda çözüldü ve steril filtreden geçirildi.

PCR-dNTP çözeltisi (10 mM)

Her bir dNTP (N = A, C, G ve T) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde suda çözüldü ve -20 °C’de saklandı.

10× TAE

48.4 g Tris-baz; 10 mL glasyal asetik asit; 2.92 g EDTA.

TFB I tamponu

80 mM MgCl₂ ve 20 mM CaCl₂

TFB II tamponu

100 mM CaCl₂ ve %15 gliserin.

İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid stok çözeltisi

0.5 M IPTG suda çözüldü, steril filtreden geçirildi ve -20 °C’de saklandı.

Coomassie boyama çözeltisi

% 0.2 (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, %50 (v/v) etanol, % 10 (v/v) asetik asit. Filtre edilen çözelti oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE ayırma jeli tamponu

% 0.4 (w/v) SDS, 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

SDS-PAGE üst jel tamponu

%0.4 (w/v) SDS, 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

SDS-PAGE yürütme tamponu (pH 8.5)

% 0.1 (w/v) SDS, 0.025 M Tris, 0.2 M Glisin

SDS-PAGE örnek tamponu (2×):

%2 (w/v) SDS, %10 (w/v) Gliserin, %5 (v/v) β -Merkaptoetanol, %0.01 (w/v) Bromfenol mavisi, 1.25 M Tris/HCl, pH 6.8

Kromatografi tamponları:

A tamponu: 50 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH=7.8

B tamponu: 50 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=7.8

SELEX tamponu: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2

2.6 Diğer Sarflar ve Cihazlar

SELEX çalışmasında kullanılan ssDNA kütüphanesi Alpha diagnostic (Texas, USA) firmasından temin edildi. PCR çalışmalarında kullanılan Taq polimeraz enzimi (5 U/ μL) ve çalışma tamponları, SM1211 kodlu ultra low range DNA markeri, SYBR Gold jel boyası, InsTAclone PCR Klonlama Kiti ve GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermofisher Scientific (Waltham, USA), Nu-mikropor agaroz prona Conda (Spain), Lambda ekzonükleaz New England Biolabs (USA), PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan PCR-clean-up kiti Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Berlin, Germany), diğer sarflar Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmalarından temin edildi. PCR çalışmalarında kullanılan primerler Sentegen (Ankara), HPLC-grade aptamerler ELLA (Germany) ve Metabion (Martinsried, Almanya), termal döngü cihazı Applied Biosystems (California, USA), agaroz jel elektroforezi sistemi Hoefer Pharmacia Biotech (USA ve Embi Tec, CA, USA), agaroz jel görüntüleme için Blue LED Illuminator Nippon Genetics Europe GmbH (Dueren, Almanya) firmalarından temin edildi. DNA konsantrasyonları Epoch Biotek (USA) marka mikropilaka spektrofotometre ile ölçüldü. SELEX için inkübasyon aşamalarında

kullanılan Isıtıcı-Soğutucu ve çalkalamalı termal blok Eppendorf (Hamburg, Germany), masa üstü santrifüj 200 R Hettich (Tuttligen, Germany), firmalarından temin edildi. Klonlamada kullanılan agar petrilerin hazırlanması için maya ekstraktı, tripton, ampisilin ve agar Carl Roth GmbH (Germany), büyüme ortamları ve petrilerin inkübe edildiği inkübatör New England Biolabs (USA) firmalarından temin edildi. Steril filtreler (0.2 µm) VWR firmasından temin edildi. Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit (R&D Biosystems, Mineapolis, USA), HisTrap HP 5 mL kolon ve, ÄKTAprime plus kromatografi sistemi GE Healthcare (Little Chalfont, UK), UV3 HEPA PCR kabini UVP (CA, USA) firmasından temin edildi.

2.7 Sterilizasyon

Kültür ortamları kullanılmadan önce otoklavlanarak sterilize edildi (20 dakika, 121 °C ve 2 bar). Pipet uçları ve kompetent hücrelerin hazırlanmasında kullanılan malzemeler otoklavlandıktan sonra 50°C’de kurutuldu.

2.8 *S. pyogenes*’den Genomik DNA İzolasyonu

DSMZ firmasından temin edilen liofilize *S. pyogenes* (DSMZ 20565), firmanın tavsiye ettiği Trypticase soy-yeast brothda canlandırıldı. Ardından yine aynı ortamda hazırlanan broth ve agara bu kültürden inokülasyon yapıldı. 37°C’de inkübasyonun ardından, elde edilen kültürden “GeneJet Genomic DNA Purification Kit” kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

2.9 WGA Kiti ile Genomik DNA Amplifikasyonu

S. pyogenes’ten elde edilen genomik DNA, WGA kiti protokolü kullanılarak çoğaltıldı. 25 ng genomik DNA, kit protokolüne göre çoğaltıldı ve “Gel and PCR Clean-up kiti (Macherey-Nagel)” kullanılarak reaksiyon karışımından izole edildi. Elüsyon 20 µL elüsyon tamponu ile yapıldı. EPOCH2 mikropilaka okuyucunun Take3 aparatı kullanılarak izolasyon sonrası DNA konsantrasyonu belirlendi.

2.10 DNA Fragmentlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile oğaltılması

SELEX'in çeşitli aşamalarında kullanılacak olan proteinleri kodlayan gen fragmentleri standart PCR ile çoğaltıldı.

2.11 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ile elde edilen DNA fragmentlerinin kontrol edilmesi amacı ile agaroz jel elektroforezi kullanıldı. %1'lik 100 mL jelin hazırlanması için 1 g agaroz tartıldı ve üzerine 100 mL 1xTAE tamponu eklendi. Çözünen agaroz 5 µL SafeView™ Classic nükleik asit boyası eklendi. Jel örneklerinin yükleneceği kuyucukları oluşturacak olan tarakların yerleştirildiği kalıba döküldü. Agaroz jel, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Hazırlanan agaroz jel elektroforez sistemine yerleştirildi, örnekler yüklendi ve 100V'da 30 dakika yürütüldü. Biometra UVStar transilluminator yardımı ile DNA fragmentleri görüntüledi.

2.12 DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacı ile GeneJET™ Gel Extraction Kit kullanıldı.

2.13 Plazmit ve DNA fragmentlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Plazmit ve DNA fragmentleri, ilgili restriksiyon enzimleri ile son reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde muamele edildi. Restriksiyon, gece boyu 37°C'de, 200 rpm'de gerçekleştirildi. Restriksiyon reaksiyonu, enzimlerin termal blokta termal denatürasyonu ile sonlandırıldı. Reaksiyon karışımları, 6x yükleme tamponu ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi. Görüntülemenin ardından ilgili bantlar agaroz jelden ekstrakte edildi.

2.14 Plazmit ve DNA Fragmentlerinin Ligasyonu

Restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş DNA fragmentleri ve plazmit arasındaki fosfodiester bağlarının oluşturulması ve klonlamanın tamamlanması amacı ile T4-DNA ligaz reaksiyonu gerçekleştirildi. Plazmit ve fragmentler 1:1 ve 1:5 arasında değişen mol oranlarında karıştırıldı. DNA ligaz, reaksiyon tamponu

ve restriksiyon ürünleri ligasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi amacı ile gece boyu +4°C’de inkübe edildi. 60°C’de 10 dakika termal denatürasyon ile reaksiyon sonlandırıldı. Toplam hacmi 20 µL olan ligasyon karışımından 10 µL alınarak kimyasal kompetent hücrelere ısı şoku yardımı ile transforme edildi. Kalan ligasyon karışımı -20°C’de saklandı.

2.15 Kimyasal Kompetent *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması (CaCl₂/MgCl₂ yöntemi)

Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanması amacı ile şu adımlar uygulandı: 100 mL LB besi ortamına OD₆₀₀ 0.1 olacak şekilde gece kültüründen inokülasyon yapıldı. Hücreler OD₆₀₀ değeri 0.6’ya ulaşana kadar 37°C’de ve 200 rpm’de inkübe edildi. Buzda 15 dakika bekletilen hücreler, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre pelletine 20 mL TFB I tamponu eklendi, resüspanse edildi ve ikinci kez santrifüjlendi. Hücre pelletine 2 mL TFB II eklendi ve resüspanse edildi. Hücreler 200 µL lik hacimlerde, 1.5 mL’lik eppendorf tüplerine aktarıldı ve -80°C’de depolandı.

2.16 Kimyasal Kompetent *E. coli* Hücrelerine Transformasyon

-80°C’de depolanan kimyasal kompetent hücreler buz üstüne alınarak 15 dakika bekletildi. Kompetent hücrelere ligasyon karışımından 10 µL eklendi ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından, hücrelere 42°C de 45 saniye ısı şoku uygulandı ve tekrar buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Hücre süspansiyonuna 800 µL taze LB ortamı eklendi ve 37°C’de 1 saat süre ile 200 rpm’de inkübe edildi. Ardından hücreler 8000 rpm’de 2 dakika santrifüjlendi ve pellet 100 µL hacimde resüspanse edildi. Hücreler, ilgili antibiyotikleri içeren LB-agar petrilere yayıldılar. Petriler 37°C’de gece boyu inkübe edildi ve oluşan kolonilerden plazmit DNA izole edildi.

2.17 Koloni PCR

Transformasyonun ardından rekombinant plazmitin belirlenmesi amacı ile koloni PCR gerçekleştirildi. Transformasyonun ardından antibiyotik içeren agar petri yüzeyinde oluşan koloniler sterilize edilmiş kürdanla alındı ve ayrı PCR

tüplerine aktarıldı. Her bir PCR tüpüne 10 µL PCR karışımı eklendi. Primer olarak plazmite spesifik T7 promotor ve T7 terminatör bölgelerine komplementer oligonükleotidler kullanıldı. Koloni PCR’da, standart PCR’dan farklı olarak ön denatürasyon 95°C de 10 dakika uygulandı. Denatürasyon 95°C de 45 saniye, primer bağlanması 55°C’de 45 saniye, uzama 1000 bp için 1 dakika olacak şekilde, PCR adımları 30 kez tekrarlandı. Son uzama 72°C’de 10 dakika süre ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek klonlanan geni içeren plazmiti taşıyan koloniler belirlendi.

2.18 Küçük Ölçekte Test Ekspresyonu

Plazmite klonlanan genlerin ekspresyon koşullarının optimize edilmesi amacı ile, test ekspresyonu gerçekleştirildi. İlgili plazmitleri taşıyan *E. coli* hücreleri, 37°C’de gece boyu inkübe edildi ve ardından gece kültüründen örnek alınarak $OD_{600} = 0,1$ olacak şekilde 50 mL LB taze büyüme ortamına inokule edildi. Kültür, $OD_{600} = 0,4-0,6$ değerine ulaşmaya kadar 37°C’de 200 rpm’de inkübe edildi. 50 mL kültürden ($OD_{600} = 0,4-0,6$), 20 mL alınarak iki adet steril 50 mL’lik falkona aktarıldı. Protein ekspresyonunun indüklenmesi amacı ile ortama 0.5 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) eklendi ve inkübasyona farklı sıcaklıklarda (20 °C, 25 °C veya 37 °C) devam edilerek rekombinant protein üretiminin gerçekleşmesi sağlandı. İnkübasyonun ardından hücreler 4000 rpm, 30 dakika, 4°C’de santrifüjlendi. Hücre pelleti, 4 mL A tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu buzda bekletilen eppendorf tüpüne alındı ve ultrasonik homojenizatör yardımı ile hücreler parçalandı (% 25 şiddet, 2,5 dakika). Homojenat 13000 rpm’de, 30 dakika süre ile 4°C’de santrifüjlendi. Süpernatant ve pellet fraksiyonları ayrılarak SDS-PAGE’e uygulandı. IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen hücrelere ait hücre lizatlarının protein içerikleri SDS-PAGE’de karşılaştırıldı. SDS-PAGE görüntüleri karşılaştırılarak, en yüksek düzeyde SpyCEP proteininin elde edildiği üretim koşulunun belirlenmesi amaçlandı.

2.19 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE için Çizelge 2.1 **SDS-PAGE jel içerikleri**'de verilen oranlar kullanıldı. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler 1:1 oranında 2xSDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi. SDS-PAGE'e 5 µL örnek uygulandı. Tek jel için 25 mA, 150V; çift jel için 50 mA, 300 V jel yürütme koşulları uygulandı.

Çizelge 2.1 SDS-PAGE jel içerikleri

5 mL Toplayıcı jel	
Eklenen madde	Ekleme miktarı (mL)
H ₂ O	3.025
0.5 M Tris-HCl, pH 6,8	1.25
% 10 (w/v) SDS	0
Akrilamid-bisakrilamid (% 30- % 0.8 w/v)	0.67
% 10 Amonyum persülfat	0.05
TEMED	0.005
10 mL Ayırma jeli	
Eklenen madde	Ekleme miktarı (mL)
H ₂ O	3.9
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.6
% 10 (w/v) SDS	0
Akrilamid-bisakrilamid (% 30- % 0.8 w/v)	3.4
% 10 Amonyum persülfat	0.1
TEMED	0.001

2.20 Metal Şelat Afinite kromatografisi

Hücre lizati 13000 rpm'de, 30 dakika, 4 °C'de santrifüjlendi ve süpernatant ayrıldı. Rekombinant SpyCEP'i içeren süpernatantın kromatografi sistemine uygulanmasının öncesinde, olası partiküllerin uzaklaştırılması amacı ile 0.45 µm şırınga filtre yardımı ile filtrelendi. Filtrasyonun ardından örnek, A tamponuyla dengelenmiş olan HisTrap HP 5 mL kolona (Ni Sepharose) 1 mL/dakika hızda uygulandı. Kolon tekrar A tamponuyla dengelendi ve *E. coli* kaynaklı diğer

proteinlerin yıkanarak uzaklaştırılması amaçlandı. C-terminalde 6xHis tag içeren SpyCEP'in saflaştırılması amacı ile imidazol içeren B tamponuyla gradient elüsyon gerçekleştirildi.

2.21 ELISA Testi ve SpyCEP Aktivite Tayini

Elde edilen rekombinant SpyCEP enziminin aktivitesinin kontrol edilmesi amacı ile, enzimin hidrolizlediği insan interleukin 8'i (IL-8) tayin eden ELISA kiti kullanıldı. Kitin mikropılaka kuyucuklarına immobilize edilmiş IL-8 antikoru nedeni ile, uygulanan örnekte bulunan IL-8 kuyucuğa bağlanmaktadır. ELISA'nın ikinci aşamasında, enzim bağlı ikincil bir IL-8 antikoru uygulanmaktadır. Bu prensibe dayanan kit, IL-8 konsantrasyonunu pg/mL mertebesinde tayin edebilmektedir.

Tayin adımları, kit protokolünde belirtilen şekilde uygulandı. SpyCEP aktivitesinin belirlenmesi amacı ile, SpyCEP ve IL-8 substratı 37°C'de PBS tamponunda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 98°C'de 2 dakika termal denatürasyon gerçekleştirildi ve enzim inaktivasyonu yoluyla reaksiyon sonlandırıldı. ELISA kiti kullanılarak, parçalanmadan kalan IL-8 miktarı yoluyla enzim aktivitesi belirlendi. Spektrofotometrik ölçüm, her kuyucuk için 450 nm ve 540 nm dalga boylarında gerçekleştirildi. Dalga boyu düzeltmesi amacı ile, 450 nm'de elde edilen absorbans değeri, 540 nm'deki absorbans değerinden çıkarıldı.

2.22 DNA Aptamer Kütüphanesinin PCR ile Amplifikasyonu

SELEX turlarında kullanılacak olan DNA aptamer kütüphanesi, Alpha Diagnostic International (San Antonio, Texas, USA) firmasından temin edildi. Kütüphane, 5'-AGGAATTCAGATCTCCCTGCAG (N) 40 CTCGAGGAGCTCAGGATCCCG-3' oligonükleotid dizisine sahiptir. N(40) ile ifade edilen bölge, deoksiribonükleotidlerin rastgele sıralanmasından oluşan ve aptamer kütüphanesini oluşturan dizileri temsil etmektedir. N(40) bölgesinin 5' ve 3' sabit dizileri, PCR amplifikasyonu için primer bağlanma bölgelerini oluşturmaktadır. Primer bağlanma sıcaklığı ve PCR döngü sayısı gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.23 SELEX Adımlarında Kullanılacak Olan SpyCEP-İmmobilize Magnetik Boncukların Hazırlanması

Hedef proteinin magnetik boncuklara immobilizasyonu, SELEX turları sırasında bağlanmayan aptamerlerin karışımından daha kolay ve hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlamaktadır (Weng vd., 2012; Wang vd., 2014). SpyCEP için uygulanacak SELEX adımlarında benzer yöntemden yararlanıldı. Rekombinant SpyCEP, karboksil grubu kaplı Dynabeads® M-270 magnetik boncuklara immobilize edildi. İmmobilizasyonun SpyCEP'in enzimatik aktivitesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi oluşturmadığının doğrulanması amacı ile aktivite tayini gerçekleştirildi.

Magnetik boncuklar üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde hazırlandı ve SpyCEP enziminin kovalent olarak immobilize edilmesi amacı ile kullanıldı. Magnetik boncuklar, 25 mM MES tamponu ile (pH 5.0) yıkandı. Ardından, karboksil gruplarının aktivasyonu amacı ile 0.5 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) ve 0.5 M sulfo-N-hidroksisüksinimid (NHS) reaktifleri eklendi. Aktive edilen boncuklar iki kez yıkandı ve rekombinant SpyCEP eklenerek 2 saat 4°C'de inkübe edildi. Bağlanmayan SpyCEP'in uzaklaştırılması amacı ile boncuklar 10 mM PBS (pH=7.4) tamponu ile yıkandı. Boncuk yüzeyindeki serbest karboksil gruplarının bloklanması amacı ile 50 mM etanolamin eklendi ve ardından boncuklar yıkandı. SpyCEP-immobilize boncuklar 10 mM PBS (pH=7.4) tamponunda +4 °C'de saklandı.

2.24 SELEX Prosedürü

Her SELEX turunun başında tek iplikli DNA kütüphanesi -20°C'den alındı ve uygun seyreltmeler SELEX tamponuyla yapıldı. Termal cycler kullanılarak, 80°C'de 10 dakika inkübe edildi ve 37°C'ye 15 dakika süre ile yavaşça soğutuldu. Kütüphane önce boş karboksil aktive boncuklarla (Boş-MB) inkübe edildi. Bu inkübasyon termal karıştırıcıda 37°C'de, 800 rpm'de 30 dakika süre ile gerçekleştirildi. İnkübasyon 100 µL hacimde, 1,5 mL eppendorf tüplerde gerçekleştirildi. Magnetik boncukların inkübasyon sırasında disperse olduğu minimum rpm 800 olduğu için bu hız kullanıldı. İnkübasyon sonunda boncuklar, magnetik ayırıcı kullanılarak tüpün çeperine toplandı. Geride kalan çözeltinin

tamamı, boş boncuklara bağlanmayan kütüphane, SpyCEP bağlı karboksil aktive magnetik boncukların (SpyCEP-MB) üzerine eklendi ve disperse edilerek 800 rpm, 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon öncesinde SpyCEP-MB 100 µL SELEX tamponuyla 10 dakika inkübe edildi ve magnetik alan uygulanarak tampon uzaklaştırıldı.

Kütüphane SpyCEP-MB’larla etkileştikten sonra ilk tur için 2 defa, 200 µL SELEX tamponuyla, 30 saniye yıkama yapıldı. Yıkama, inkübasyonlarla aynı koşullarda yapıldı. Yıkanmış SpyCEP-MB’lara bağlı tek iplikli DNA, 95°C’de 15 dakika, çalkalamalı olarak elüe edildi. Elüsyon için 100 µL SELEX tamponu kullanıldı. Elde edilen elüatın tamamı ile toplamda 1 mL hacimde PCR karışımı hazırlandı. Buradan elde edilen amplifiye edilmiş birinci tur kütüphanesi lambda ekzonükleaz kesimi ile tek iplikli hale getirilip ikinci turda kullanıldı.

SELEX turları boyunca değiştirilen parametreler Çizelge 2.2 **SELEX turları boyunca değişen parametreler**’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 SELEX turları boyunca değişen parametreler

SELEX turu	SpyCEP (pmol)	Kütüphane (pmol)	PCR turu	Yıkama	Salmon DNA (mg/mL)	HSA (mg/mL)
1	15	50	11	2 kez,200(µL),30 saniye	0	0
2	15	3	12	2 kez,200(µL),30 saniye	0	0
3	15	25	11	2 kez,200(µL),30 saniye	0	0
4	11.25	16	20	3 kez,200(µL),30 saniye	0.1	0
5	11.25	20	19	3 kez,200(µL),30 saniye	0.1	0
6	7.5	25	20	3 kez,200(µL),30 saniye	0.1	1
7	7.5	14.9	20	3 kez,200(µL),2 dakika	0.2	1
8	5.625	25	23	3 kez,200(µL),2 dakika	0.2	2.5
9	5.625	24.1	14	3 kez,200(µL),2 dakika	0.2	5
10	3.75	19.2	23	3 kez,200(µL),5 dakika	0.2	10
11	3.75	24	20	3 kez,200(µL),5 dakika	0.2	10
12	3.75	11.5	22	3 kez,200(µL),5 dakika	0.2	10
13	3.75	25	18(T) 16(l)	3 kez,200(µL),5 dakika	0.2	10

2.25 Tek İplikli DNA (ssDNA) Kütüphanesinin Elde Edilmesi

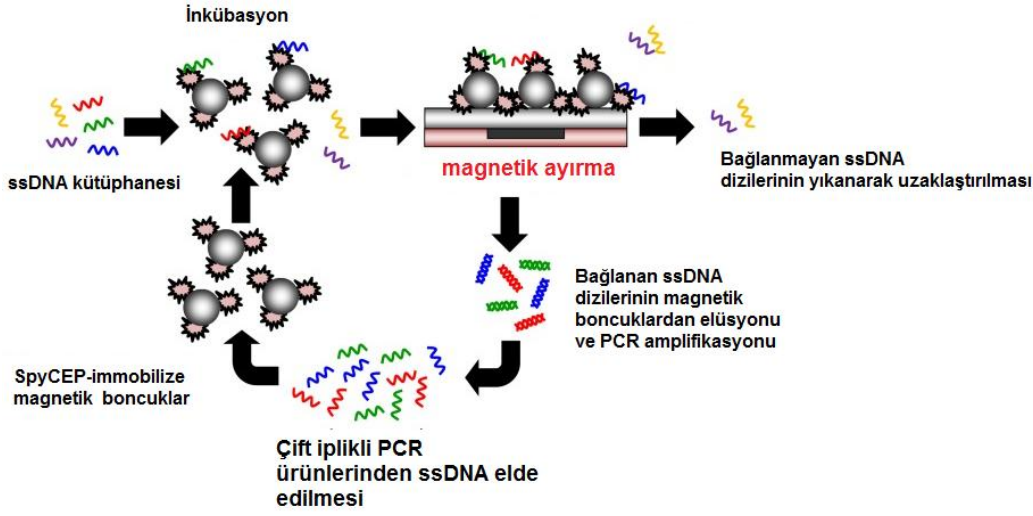
Şekil 1.1 ve Şekil 2.2’de görüldüğü gibi, her bir SELEX adımı hedefe bağlanan aptamer dizilerinin PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir.

Ancak, PCR amplifikasyonunun ardından çift iplikli (dsDNA) PCR ürünleri oluşmaktadır. İkinci tur SELEX adımı kullanılmak üzere, PCR ürünlerinin ssDNA şeklinde elde edilmesi gerekmektedir. ssDNA elde edilmesi amacı ile çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Biyotinlenmiş DNA'nın streptavidin boncukları ile ayrılması ve bu şekilde ssDNA elde edilmesi, bu yöntemlerden biridir. Bu yöntem için, PCR primerlerinden biri biyotinlenmiştir ve bu şekilde biyotinlenmiş DNA streptavidin boncuklarına bağlanmaktadır. Ancak, biyotinlenmemiş olan ipliğin boncuklardan ayrılması için alkali denatürasyon gerekmektedir. Alkali denatürasyon sırasında, streptavidinin ve biyotinlenmiş DNA'nın girişim yapacak düzeyde aptamer kütüphanesine karışması riski bulunmaktadır (Wilson, 2011). Kilili et al. (2016) tarafından, alkali denatürasyon amacı ile kullanılan NaOH konsantrasyonunun optimize edilmesi gerektiği gösterilmiştir. Bunun yanında, DNA nükleotid uzunluğu ile biyotinleme prosedürünün alkali denatürasyon koşullarını değiştirebileceğini belirtmişlerdir (Kilili et al., 2016).

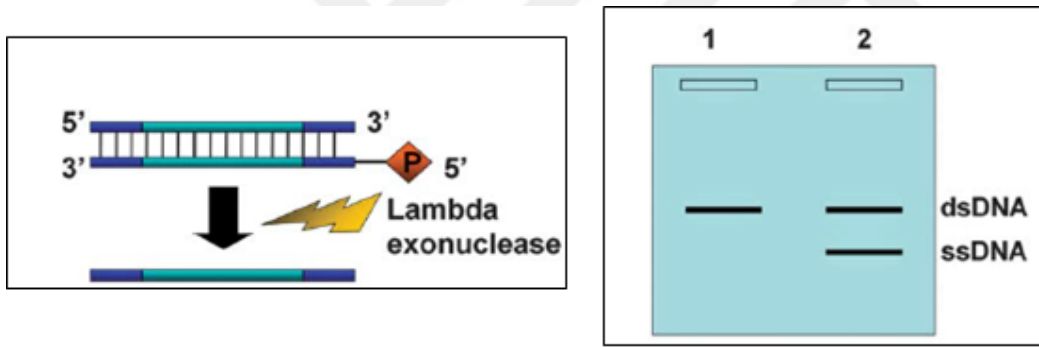
Alkali denatürasyonun ortaya çıkardığı sorunlar nedeni ile, alternatif olarak lambda ekzonükleaz ile kesim önerilmiştir (Avci-Adali et al., 2009). Bakteriyofaj kaynaklı lambda ekzonükleaz, çift iplikli DNA molekülündeki fosforillenmiş ipliği 5'-3' yönünde seçimli olarak kesen bir ekzoenzimdir (Şekil 2.3). Bu enzimin fosforillenmiş 5'-ucuna olan afinitesi, hidroksillenmiş 5' –ucuna kıyasla 20 kat daha yüksektir (Marimuthu et al., 2012). Bu nedenle, fosforillenmemiş 5' –ucu enzim tarafından kesime uğramamaktadır. Bunun yanında, lambda ekzonükleazın ssDNA'ya karşı olan aktivitesi oldukça düşüktür. Lambda ekzonükleazın bu özelliği nedeni ile, SELEX sırasında ssDNA eldesi için kullanımı avantajlıdır.

Lambda ekzonükleazın kullanımının sağlayacağı üstünlükler nedeni ile, tez kapsamında ssDNA eldesi için lambda ekzonükleaz kullanıldı. Enzim (10 U/μL) Thermo Scientific firmasından temin edildi ve kesim reaksiyonunun optimizasyonu gerçekleştirildi. 2 μg çift iplikli DNA'nın (PCR ürünü) kesim reaksiyonu için 10 U veya 20 U enzim kullanıldı. 10x reaksiyon tamponu, son konsantrasyonu 1x olacak şekilde reaksiyona eklendi. Kesim reaksiyonu, 37 °C'de farklı sürelerde (60-90 dakika) gerçekleştirildi. Kesim ürünleri %4 (w/v) agaroz jele yüklendi. dsDNA ve ssDNA bantları karşılaştırıldı. Kesim reaksiyonunun optimizasyonu sırasında, jelin boyanması amacı ile iki farklı boya kullanıldı. ssDNA'nın görüntülenmesi açısından Safeview (Applied Biological

Materials (ABM) Inc.) ve SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFisher Scientific) boya lar ı karşılaştı rıldı.



Şekil 2.2 SELEX adımlar, (Weng., et al., 2012 yayınından uyarlanmıştır.)



Şekil 2.3 ssDNA elde edilmesi amacı ile kullanılan lambda ekzonükleaz kesimi ve kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (Marimuthu et al., 2012).

2.26 Kalitatif SpyCEP İnhibisyon Testi

İnhibisyonun tayini için kalitatif olarak SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri kullanıldı. Yarı kantitatif analiz amacı ile ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Erişim Tarihi: 19 Haziran 2018) programı kullanıldı. İnhibisyon düzeylerinin belirlenmesi amacı ile örnekler 0.125 mg/mL IL-8 ve 3.75 nM SpyCEP içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon PBS tamponunda gerçekleştirildi. Kör olarak kullanılan örnekler SpyCEP eklenmedi. İnhibisyon analizi yapılacak örnekler için, IL-8 eklenme adımı öncesinde aptamerler ve

SpyCEP 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 37°C’de 24 saat süre ile gerçekleştirildi.

SDS-PAGE örnekleri önceki bölümde belirtildiği gibi hazırlandı. SpyCEP’in substratı olan IL-8 yaklaşık 10 kDa boyutunda bir proteindir. Bu nedenle ayırma jeli %17 olacak şekilde hazırlandı. Ayırmanın daha net olabilmesi için örnekler 80V sabit gerilimde yürütüldü. Akım maksimum 25 mA olacak şekilde kontrol edildi.

Western Blot için benzer reaksiyon karışımları hazırlandı ve reaksiyon sonrası örnekler SDS-PAGE’de görüntülendi. SDS-PAGE’in ardından, örnekleri içeren jel western blot membranına (PVDF Transfer Membrane, Thermo Fisher Scientific, prod# 88518) transfer edildi. Transfer için Pierce Power Blotter (Thermo Fisher Scientific) ve “1-Step Transfer Buffer”(Thermo Fisher Scientific, Prod# 84731) kullanıldı. Transfer işlemi 1.3 A sabit akım ve 25V maksimum gerilimde yapıldı. Transfer sonrasında, PVDF membran “His-Prob HRP Conjugate”(Thermo Fisher Scientific, Prod#15165) ve “3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine”(Alfa Aesar, J60461) ile muamele edildi. Transfer ve boyama işlemleri üreticilerin talimatlarına göre yapıldı.

2.27 Kantitatif SpyCEP İnhibisyon Tayini

İnhibisyon tayini için örnekler 1000 pg/mL IL-8 ve 3.75 nM SpyCEP içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon PBS tamponunda 15 dakika süre ile gerçekleştirildi. Kör olarak kullanılan örneklerle SpyCEP eklenmedi. İnhibisyon analizi yapılacak örnekler için, IL-8 eklenme adımı öncesinde aptamerler ve SpyCEP 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda örnekler 95°C’de 2 dakika inkübe edildi ve enzim inaktive edildi. Örneklerdeki IL-8 konsantrasyonu ELISA kiti (Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit) ile üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

2.28 Aptamer SpyCEP Bağlanmasının karakterizasyonu

Mikroplaka kuyucuklarına her bir kuyucuk 0.4 pmol SpyCEP içerecek şekilde SpyCEP immobilize edildi (Suzuki, vd 1997). Streptavidin konjuge HRP ve SpyCEP'e bağlanacak aptamerler arasındaki bağlanmayı sağlayacak problemlerin dizileri aşağıdaki gibidir:

Reverse Prob: 5'-Biotin-TTT TTT CGG GAT CCT GAG C-3'

Forward Prob: 5'-Biotin-TTT TTT AGG ATT CAG ATC TCC-3'

SpyCEP'e bağlanan aptamerlerin prob ile inkübasyonu sonucu aptamer-prob baz eşleşmesi gerçekleştirildi. Probun içerdiği biotin ile streptavidin-konjuge HRP arasındaki bağlanma sonucu aptamer-SpyCEP kompleksi HRP ile işaretlendi. TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ve H₂O₂ arasındaki HRP katalizli reaksiyon sonucu sinyal amplifikasyonu sağlandı. Reaksiyon 2N H₂SO₄ eklenmesi yoluyla sonlandırıldı. Oluşan sarı renk için 450 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğun 540 nm'de verdiği absorbans değerleri de ölçüldü. ELISA kitinin önerdiği şekilde, 540 nm'deki absorbans 450 nm'deki absorbans değerinden çıkartılarak düzeltme yapıldı.

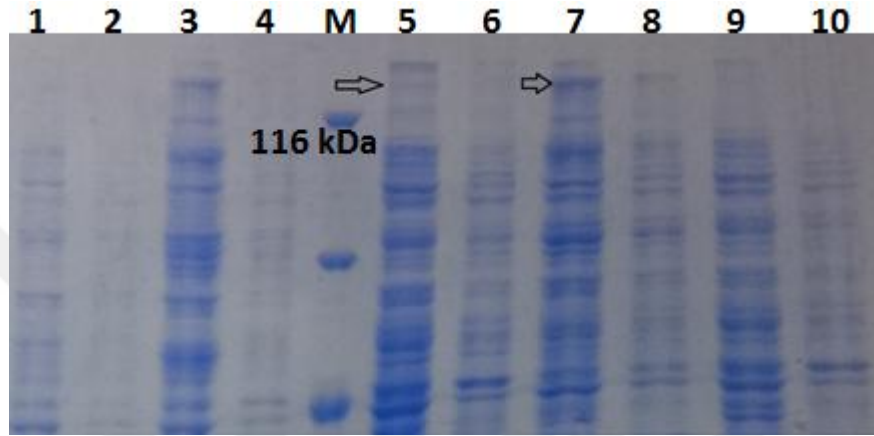
Aptamerlerin inhibisyon özelliklerinin araştırılması amacı ile, SpyCEP ve ilgili aptamer 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon 100 µL hacimde ve SELEX tamponunda gerçekleştirildi. Inkübasyon sonrasında, bağlanmayan aptamerlerin uzaklaştırılması amacı ile 2 kez SELEX tamponuyla yıkama yapıldı.

Her bir kuyucuğa 50 pmol prob (reverse veya forward) eklendi ve 37°C'de 30 dakika bekletildi. Inkübasyonun ardından 2 kez SELEX tamponuyla yıkama yapıldı. HRP konjugatı ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından 3 kez SELEX tamponuyla yıkama gerçekleştirildi. Renk reaksiyonu için 0.1 mg/mL TMB ve 2 mM H₂O₂ içeren renk raktifinden her kuyucuğa 100 µL eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon 2N H₂SO₄ (50 µL) eklenerek sonlandırıldı ve absorbans ölçüldü.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1 Test Ekspresyonu Yoluyla Optimum Rekombinant Üretim Koşullarının Belirlenmesi

Farklı koşullarda gerçekleştirilen test ekspresyonları sonucunda hücre lizatları elde edildi ve protein içerikleri SDS-PAGE yardımı ile karşılaştırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tam uzunluktaki SpyCEP ekspresyonu, *E. coli* Rosetta 2 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. 1 ve 2 numaralı kuyucuklar 37 °C’de 3 saat ekspresyona ilişkin örneklerdir. Sırasıyla, indüklenmiş hücrelerin süpernatantı ve pelleti şeklindedir. 3 ve 4 numaralı örnekler sırası ile 25 °C’de indüklenmiş hücrelerin süpernatantı ve pelleti şeklindedir. 5 ve 6 numaralı örnekler 25 °C’de gece boyu indüklenmemiş süpernatant ve pellet; 7 ve 8 numaralı örnekler 20 °C’de iki gün indüklenmiş süpernatant ve pellet; 9 ve 10 numaralı örnekler 20°C’de iki gün indüklenmemiş süpernatant ve pellet şeklindedir. SpyCEP’in hesaplanan molekül kütlesine karşılık gelen protein bantları oklar ile ifade edilmiştir.

Organizmalar arasındaki kodon kullanım farkı nedeni ile *E. coli*’de diğer organizmalara ait proteinlerin üretiminde zorluklar ile karşılaşmaktadır. Bu sorunun ortadan kaldırılması amacı ile, *S. pyogenes* kaynaklı SpyCEP üretiminde ticari *E. coli* Rosetta 2 hücreleri kullanılmıştır. Bu suşun taşıdığı ve kloramfenikol dirençli plazmit üzerinde *E. coli* tarafından kullanılmayan 7 nadir kodon (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG) tRNA’ları bulunmaktadır.

Süpernatant fraksiyonu hücrede çözünür formda üretilen proteini, pellet fraksiyonu ise hücre içinde doğru katlanamama nedeni ile agregatlaşarak inklüzyon cisimciği oluşturan proteini ifade etmesi açısından önemlidir. Bu

nedenle, hem süpernatant hem de pellet fraksiyonlarının SDS-PAGE’de görüntülenmesi amaçlanmıştır.

Rekombinant üretim koşullarının optimizasyonu amacı ile gerçekleştirilen küçük ölçekli test ekspresyonu sonucu, 37°C’de 3 saat inkübasyon koşullarında tam uzunluktaki SpyCEP proteininin hücre tarafından üretilmediği belirlendi. 37 °C, *E. coli* için optimum büyüme sıcaklığı olmasına rağmen, genellikle rekombinant protein üretimini sınırlandıran bir koşuldur. *E. coli* hücrelerinin 37 °C’de hızlı bir şekilde çoğalması, hücre içinde üretilen rekombinant proteinin doğru katlanması için gerekli süreyi sınırlamaktadır. Doğru katlanamayan rekombinant proteinler hücre içinde agregatlaşarak birikmektedir. Bu nedenle, SpyCEP için 37 °C’de gece boyu üretim yerine 3 saatlik kısa süreli inkübasyon uygulanmıştır. Bu şekilde, SpyCEP’in 37 °C’de gece boyu inkübasyon sırasında aşırı üretiminin engellenmesi ve olası agregat oluşumunun önlenmesi amaçlanmıştır. Ancak, Şekil 3.1’de görüldüğü gibi, 3 saatlik inkübasyon sonucunda SpyCEP’in üretilmediği belirlenmiştir.

İkinci bir üretim koşulu olarak, sıcaklığın 37 °C’den 25 °C’ye düşürülmesi ve inkübasyon süresinin arttırılması incelendi. Inkübasyon sıcaklığının düşürülmesi yoluyla, hücre çoğalma hızının yavaşlatılması ve bu şekilde rekombinant proteinin katlanması için ihtiyaç duyulan zamanın sağlanması amaçlandı. Bu üretim koşulunda zayıf bir protein bandı tespit edildi. 25 °C’de gerçekleştirilen küçük ölçekli üretim sonucunda düşük bir düzeyde protein üretimi gerçekleşmesi nedeni ile, *E. coli* hücrelerinin inkübasyon sıcaklığı 20 °C’ye düşürüldü ve inkübasyon süresi iki güne uzatıldı. Şekil 3.1’de görüldüğü gibi, IPTG ile indüklenmiş hücrelere karşılık gelen örnekte SpyCEP’e ait daha kalın bir protein bandı belirlendi. İndüklenmemiş örnekte bu protein bandının gözlenmemesi, IPTG indüksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve kaçak ekspresyon sorununun bulunmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, 7 numaralı kuyucukta protein bandının yoğunluğunun beklenenden düşük olması, SpyCEP’in aşırı üretiminin gerçekleşmediğini ve düşük düzeyde bir üretimin sağlanabildiğini işaret etmektedir. Bu sonucun iki farklı şekilde açıklanması mümkündür. Birinci neden, rekombinant proteaz üretimi ile ilgili karşılaşılan genel bir sorundan kaynaklanabilir. Kwon et al. (2011) tarafından belirtildiği gibi,

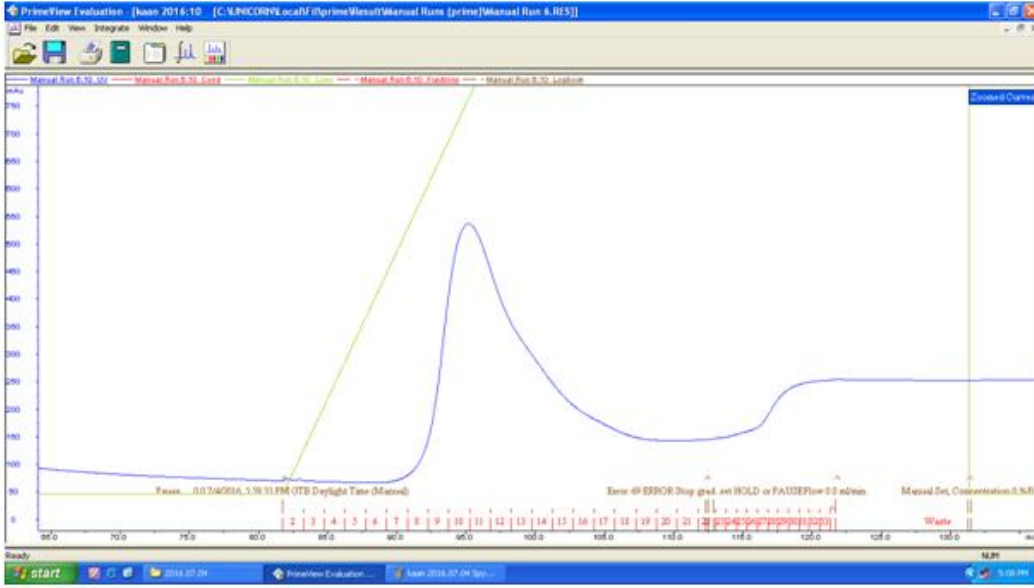
yabancı proteazların *E. coli*'de üretimi hücre üzerinde bir strese neden olabilir. Bu stres nedeni ile, *E. coli* hücreleri inklüzyon cisimciği oluşturabilir, protein ekspresyonunu gerçekleştirmeyebilir veya üretilen rekombinant proteaz sitotoksik etki gösterebilir.

1580 amino asitten oluşan SpyCEP'in *E. coli* 'de üretimini sınırlandıran diğer bir faktör protein büyüklüğüdür. Küçük proteinler, hızlı katlanma kinetiği göstermeleri nedeni ile doğru katlanamama sorunu oluşturmamaktadırlar. Ancak, büyük veya çok altbirimli rekombinant proteinler için doğru katlanamama riski bulunmaktadır (Baneyx and Mujacic, 2004).

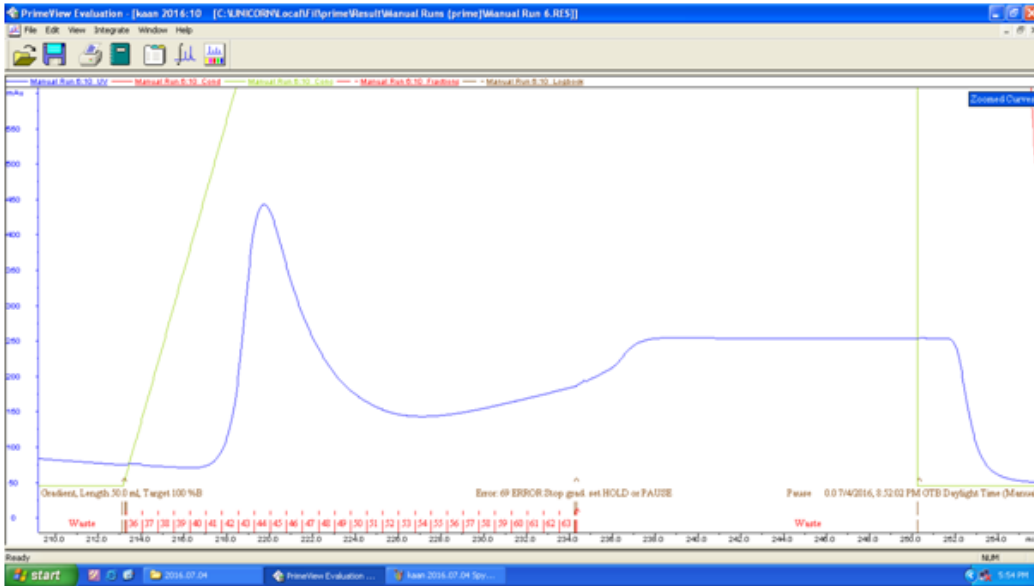
3.2 Büyük Ölçekte Protein Üretimi

Küçük ölçekli SpyCEP üretimi için 25 °C ve 20 °C'deki üretim koşullarının uygun olduğu belirlendi. Bununla birlikte, küçük ölçek için optimum bulunan koşulların büyük ölçek için de kullanılabilirliğinin incelenmesi amacı ile büyük ölçekli üretim (2 L), 25 °C ve 20 °C koşullarında tekrarlandı. Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de saflaştırmalara ilişkin kromatogramlar verilmiştir.

SpyCEP'i kodlayan genin klonlandığı pET vektör sistemi, proteinlerin C-terminaline 6xHis kuyruğu eklenecek şekilde klonlama sağlamaktadır. Bu özellikten yararlanılarak, tek adımda saflaştırmaya imkan veren Ni-şelat afinite kromatografisinden yararlanılması amaçlandı.



Şekil 3.2 20°C’de 2 gün süre ile gerçekleştirilen üretim ve saflaştırmaya ilişkin kromatogram.



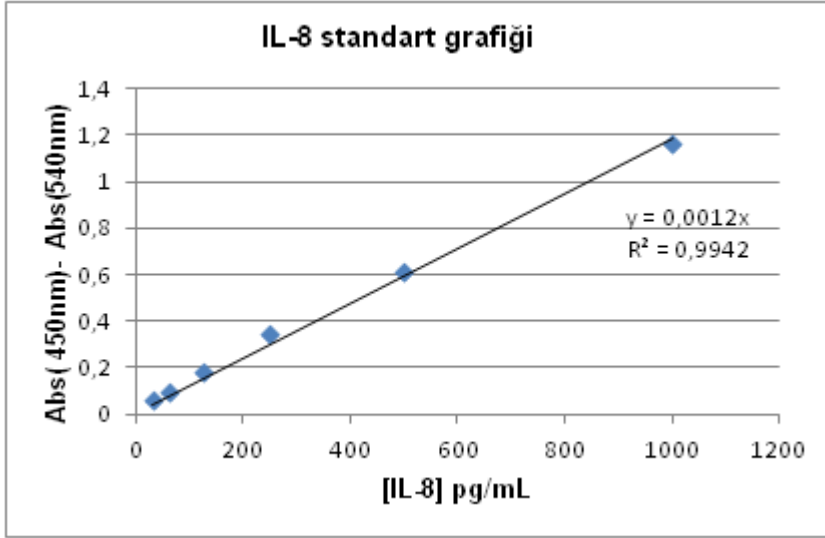
Şekil 3.3 25°C’de gece boyu gerçekleştirilen üretim ve saflaştırmaya ilişkin kromatogram.

Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de görüldüğü gibi, uygulanan imidazol gradienti sonucu protein pikleri elde edildi. Elde edilen protein piki, C-terminale eklenen 6xHis-kuyruğunun sterik olarak engellenmediğini ve rekombinant SpyCEP’in afinite kolonuna spesifik olarak bağlanabildiğini göstermektedir. 280 nm’de en yüksek absorpsiyon sinyali veren pik tepe noktası seçildi ve SpyCEP proteaz aktivitesinin kontrol edilmesi amacı ile ELISA testi uygulandı.

3.3 ELISA ile Proteaz Aktivitesinin Kontrol Edilmesi

Üretilen rekombinant SpyCEP enziminin aktivitesinin tayini amacı ile kullanılan ELISA kiti, sandviç enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Kit içeriğindeki mikrolaka kuyucuklarında, insan IL-8'e spesifik bir monoklonal aktikör immobilize edilmiştir. Standart grafiğinin hazırlanması amacı ile belli konsantrasyonlara sahip IL-8 standartları kuyucuklara eklendi ve IL-8'in kuyucuklara immobilize durumdaki antikora bağlanması amacı ile inkübasyon gerçekleştirildi. Yıkama adımı ile bağlanmayan IL-8 moleküllerinin uzaklaştırılmasının ardından, horseradish peroxidase (HRP)-konjuge ikincil aktikör eklendi. İkinci bir yıkama adımının ardından, kuyucuklara renk reaktifi eklendi ve oluşan kolorimetrik sinyal mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri, artan IL-8 konsantrasyonuna karşı grafiğe aktarıldı ve standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.4). Artan IL-8 konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen ELISA denemesine ilişkin elde edilen mikrolaka görüntüsü Şekil 3.5'de verilmiştir.

İkincil antikora bağlı HRP'in katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan sarı renkli ürün 450 nm'de belirlenmektedir. Kit protokolünde ELISA plakasının üretildiği materyalden (polistiren) kaynaklanan girişim etkisinin engellenmesi amacı ile, 540 nm'de dalga boyu düzeltmesi yapılması önerilmiştir. Bu nedenle, 450 nm'de elde edilen absorbans değeri, 540 nm'de ölçülen absorbans değerinden çıkartılmış ve kit protokolünde önerilen bu düzeltme gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 ELISA kiti için oluşturulan standart grafiği.

SELEX aşamasına geçilmesinin öncesinde, elde edilen rekombinant SpyCEP'in aktif formda saflaştırıldığına doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle, saflaştırmaya ilişkin kromatogramlar esas alınarak seçilen 11. ve 44. fraksiyonların IL-8 parçalama aktiviteleri ELISA kiti kullanılarak değerlendirildi. SpyCEP aktivitesine ilişkin ELISA sonuçları Çizelge 3.1'de ve Şekil 3.5'de verilmiştir.

Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile, standart grafiği oluşturulması için kullanılan benzer adımlar gerçekleştirildi. IL-8 substratı ile inkübe edilmiş olan rekombinant SpyCEP örneği, IL-8 monoklonal antikoru immobilize edilmiş kuyucuklara uygulandı. SpyCEP enziminin virulans aktivitesi, IL-8'in enzimatik olarak parçalanmasına ve bağışıklık hücreleri tarafından IL-8'in dedekte edilmesinin engellenmesine dayanmaktadır (Fritzer et al., 2009; Zingaretti et al., 2010). ELISA kiti ile enzim aktivitesinin tayininde, bu aktiviteden yararlanılması amaçlanmıştır. SpyCEP tarafından proteolitik yıkıma uğrayan IL-8'in konsantrasyonundaki azalmadan yararlanılarak SpyCEP aktivitesi belirlenmiştir. IL-8'in SpyCEP tarafından parçalanması, 450 nm'deki absorbans değerinin azalmasına neden olmuştur.

Çizelge 3.1 Tam uzunluktaki SpyCEP için IL-8 proteoliz tayinine ilişkin sonuçlar. Tabloda verilen hacimlerde eklenen fraksiyonların aktivitesi, *Bacillus subtilis* tarafından üretilen SpyCEP'in aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen SpyCEP, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Enzim	parçalanmış IL-8 yüzdesi (%)
44. fraksiyon (0.5 µL)	85.14
44. fraksiyon (5 µL)	85.23
11. fraksiyon (0.5 µL)	83.41
11. fraksiyon (5 µL)	83.80
SpyCEP 15ng (pozitif kontrol)	44.49
SpyCEP 75ng (pozitif kontrol)	82.93
Negatif kontrol	0



Şekil 3.5 ELISA test plakasında proteaz aktivitesine ilişkin olarak elde edilen kolorimetrik sinyal. **A1:** 1000pg interlökin; enzim eklenmediği durumda, interlökinin enzim aktivite reaksiyonundan sonra denatüre olup olmadığının kontrolü amacı ile kullanıldı. **A2:** SpyCEP 75ng; **A3:** SpyCEP 75ng; **A4:** SpyCEP 15ng; **A5:** 11. fraksiyon 5 µL; **A6:** 11. fraksiyon 0.5 µL; **A7:** 44. Fraksiyon 5 µL; **A8:** 44. fraksiyon 0.5 µL. Standart grafiğinin oluşturulması amacı ile kullanılan interlökin konsantrasyonları ve oluşturdukları kolorimetrik sinyal: **B1:** 0 pg interlökin; **B2:** 0 pg interlökin; **B3:** 31.3 pg interlökin; **B4:** 62.5 pg interlökin; **B5:** 125 pg interlökin; **B6:** 250 pg interlökin; **B7:** 500 pg interlökin; **B8:** 1000 pg interlökin şeklindedir.

ELISA sonuçlarına göre, elde edilen protein fraksiyonlarının aktif SpyCEP proteazı içerdiği belirlendi. Bu sonuçlara dayanarak, tam uzunluktaki SpyCEP'in *E. coli* hücrelerinde aktif formda üretilebildiği gösterildi.

Tez kapsamında aptamer geliştirilmesi aşamalarında kullanılmak üzere, tam uzunluktaki proteaz klonlanarak üretildi. Çizelge 3.2'de belirtilen proteinlerden yalnızca tam uzunluktaki proteaz (SpyCEP) ve PR+A'nın üretim koşulları incelendi, ancak SELEX aşamasında tam uzunluktaki proteaza spesifik DNA aptamerleri geliştirildi.

Çizelge 3.2 Klonlama amacı ile kullanılan primerler

Protein	Primer (Forward / Reverse)
PR+A	ZF_Forward / ZN_Reverse
0416A	2016_0416A-F / 2016_0416A-R
0416A1	Spy0416A1-F / Spy0416A1-R
Tam uzunluktaki proteaz	ZF_Forward / ZF_Reverse
N-term	ZF_Forward / ZN_Reverse
C-term	ZC_Forward / ZF_Reverse

3.4 Rekombinant Üretim Koşullarının Optimizasyonu

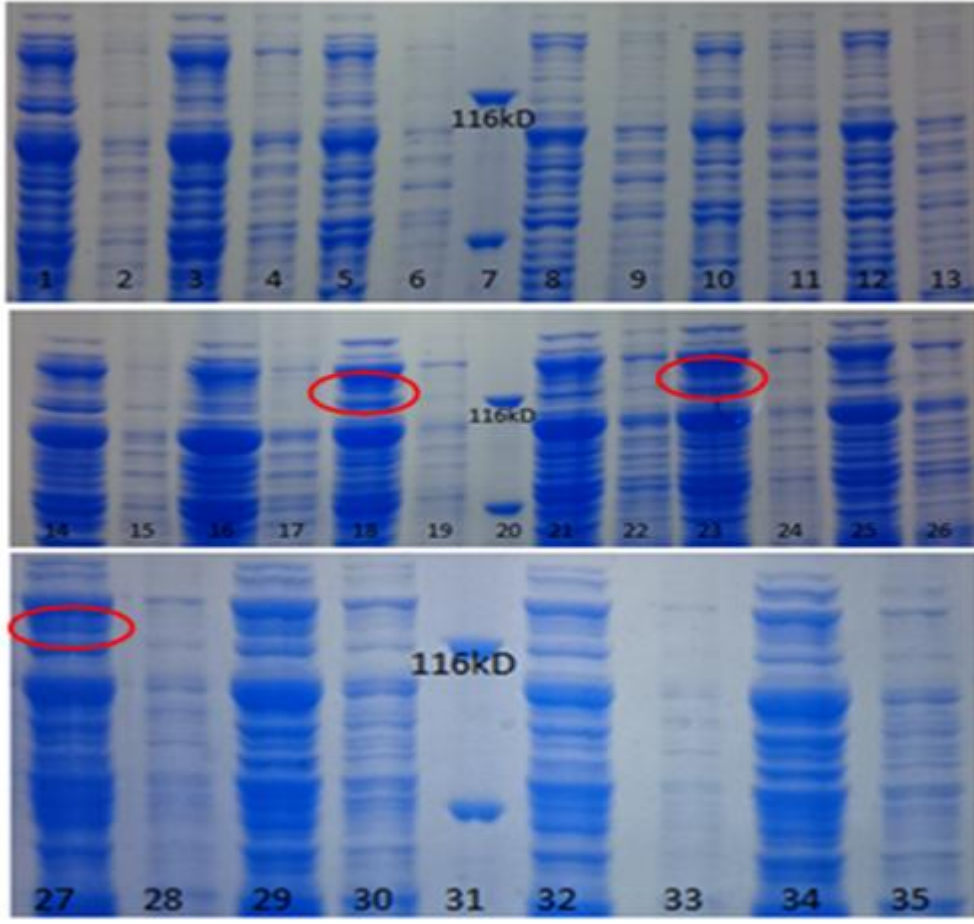
Tam uzunluktaki SpyCEP üretimi için farklı sıcaklık ve süre koşullarında gerçekleştirilen test ekspresyonu çalışmaları gerçekleştirildi (Çizelge 3.3). Bu amaçla, hücre tipinin ve izopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid (IPTG) konsantrasyonunun etkisi incelendi. *E. coli* ekspresyon hücresi olarak, *E. coli* BL21-Gold(DE3)pLysS kompetent hücreleri (Agilent Technologies) kullanıldı. Bu hücrelerin sahip olduğu bazı avantajların SpyCEP üretimine olumlu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu hücreler, yüksek transformasyon etkinliğine sahiptir ve endonükleaz I (endA) enzimi açısından defektlidir. Bu enzim açısından defektli olmaları nedeni ile, rekombinant plazmidin parçalanması engellenmektedir. Bunun yanında, bu *E. coli* suşu OmpT ve Lon proteazlarını da içermemektedir. Proteaz defekti nedeni ile, rekombinant proteinin parçalanma sorunu ortadan kaldırılmıştır. SpyCEP'i taşıyan plazmidin hücre içindeki

stabilitesinin arttırılmasının rekombinant üretim verimine olan etkisinin incelenmesi amacı ile bu suş kullanıldı.

Diğer bir test ekspresyonu parametresi olarak, IPTG ile protein ekspresyonunun indüklendiği OD₆₀₀ değerinin etkisi incelendi. Galloway et al. (2003), yüksek molekül kütesine sahip bir rekombinant proteinin üretimi için geç logaritmik fazdaki IPTG indüksiyonunun başarılı olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak, San-Miguel et al. (2013), *E. coli* 'de üretimi zor olan ve inklüzyon cisimcikleri şeklinde üretilen bitki proteinleri için, geç logaritmik fazda ve düşük sıcaklıkta IPTG indüksiyonu önermişlerdir. Bu nedenle, yüksek molekül kütesine sahip olan ve *E. coli* hücresi için potansiyel toksik etkiye sahip SpyCEP'in üretiminde bu parametre de incelendi.

Çizelge 3.3 Rekombinant SpyCEP üretimi için gece boyu süresince gerçekleştirilen test ekspresyonu koşulları

Örnek	Üretim sıcaklığı (°C)	IPTG indüksiyonu OD ₆₀₀ değeri	IPTG konsantrasyonu (mM)
1	30	0.8	0.5
2	30	0.4-0.6	0.5
3	30	0.8	1.0
4	30	0.4-0.6	1.0
5	25	0.8	0.5
6	25	0.4-0.6	0.5
7	25	0.8	1.0
8	25	0.4-0.6	1.0



Şekil 3.6 Tam uzunluktaki SpyCEP'in rekombinant üretimi için gerçekleştirilen test ekspresyonlarına ilişkin SDS-PAGE görüntüsü. **Çizelge 3.3**'te belirtilen her bir örnek için ilk iki kuyucuk IPTG indüksiyonu gerçekleştirilen süpernatant ve pellet; son iki kuyucuk IPTG indüksiyonu yapılmayan kontrol süpernatant ve kontrol pelleti içermektedir. 1. kuyucuk: 1 numaralı örnek için IPTG indüksiyonu sonrası elde edilen süpernatant. 2. kuyucuk: 1 numaralı örnek için IPTG indüksiyonu sonrası elde edilen pellet. 3. kuyucuk: 1 numaralı örnek için IPTG eklenmemiş hücrelerin süpernatantıdır. 4. kuyucuk: 1 numaralı örnek için IPTG eklenmemiş hücrelerin pelletidir. 5, 6, 8, 9. kuyucuklar: **Çizelge 3.3**'te gösterilen 2 numaralı örnek; 10, 11, 12, 13. kuyucuklar: Tablo 5'de gösterilen 3 numaralı örnek; 14, 15, 16, 17. kuyucuklar Tablo 5'de gösterilen 4 numaralı örnek; 18, 19, 21, 22. kuyucuklar: **Çizelge 3.3**'te gösterilen 5 numaralı örnek; 23, 24, 25, 26. kuyucuklar: **Çizelge 3.3**'te gösterilen 6 numaralı örnek; 27, 28, 29, 30. kuyucuklar: 7 numaralı örnek; 32, 33, 34, 35. kuyucuklar 8 numaralı örnektir. Protein markerı; 7, 20 ve 31. kuyucuklara yüklenmiştir.

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi, 30°C'de ve farklı IPTG konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen test ekspresyonları sonucu belirgin bir protein indüksiyonunun gerçekleşmediği gözlemlendi. 25°C'de gerçekleştirilen IPTG

indüksiyonlarının protein ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. SDS-PAGE sonuçlarına göre, rekombinant SpyCEP üretimi için 25 °C’de gece boyu inkübasyonun optimum koşul olduğu belirlendi. Bununla birlikte, IPTG eklenen OD600 değerinin ve farklı IPTG konsantrasyonlarının anlamlı bir farka neden olmadığı gözlemlendi. 8 no.lu örnek için IPTG konsantrasyonunun 1,0 mM’a arttırılmasının protein üretimini olumsuz etkilediği sonucuna ulaşıldı.

3.5 Tek iplikli DNA (ssDNA) Aptamer Kütüphanesinin PCR ile Amplifikasyonu

Kütüphanenin PCR amplifikasyon koşullarının belirlenmesi amacı ile, primerlerin bağlanma sıcaklığının optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, farklı primer bağlanma sıcaklıklarında gradient PCR uygulandı (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4 Gradient PCR karışımı

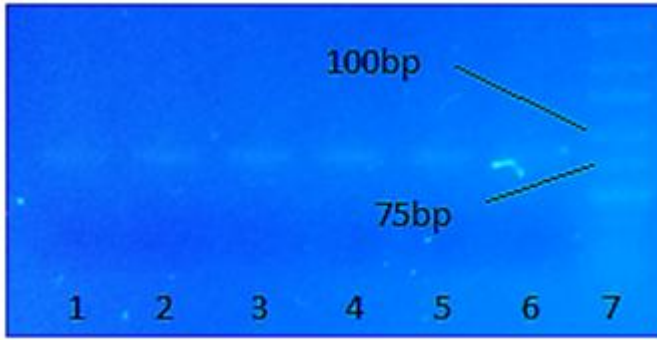
PCR bileşeni	Hacim (µL)	Son konsantrasyon (mM)
5’-Primer	1	10^{-3}
3’-Primer	1	10^{-3}
Taq polimeraz	0.5	
DTT	2	2×10^{-3}
MgCl ₂	6	1.5
dNTP karışımı	2	0.2
10XReaksiyon tamponu	10	1
ssDNA Kütüphanesi	1	0.5×10^{-3}
H ₂ O	76.5	
Toplam	100	

Gradient PCR adımları Çizelge 3.4’te verildiği şekilde uygulandı. Çizelge 3.5 de belirtilen 2, 3 ve 4 numaralı adımlar 12 kez tekrarlandı.

Çizelge 3.5 Gradient PCR programı

PCR adımı	Süre	Sıcaklık (°C)
1.denatürasyon	3 dak	95
2.denaturasyon	30 s	95
3.primer bağlanması	30 s	56,58,60,62, 64,66
4.uzama	45 s	72
5.son uzama	3 dak	72

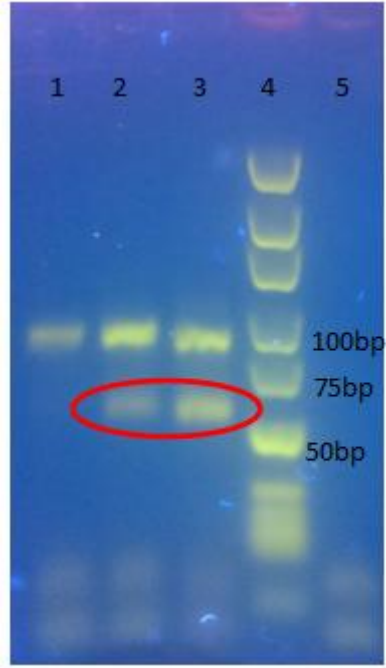
Agaroz jelde en parlak PCR ürünü oluşumunu sağlayan primer bağlanma sıcaklığı, 62 °C olarak belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Aptamer kütüphanesinin amplifikasyonu için uygulanan gradient PCR'a ilişkin agaroz jel görüntüsü. 1. kuyucuk: 56 °C; 2. kuyucuk: 58°C; 3. kuyucuk 60°C; 4. kuyucuk 62°C, 5. kuyucuk: 64°C; 6. kuyucuk 66°C; 7. kuyucuk: DNA marker.

Kütüphanenin PCR amplifikasyonu ile ilgili ikinci bir parametre olarak, PCR döngü sayısının etkisi incelendi. Bu amaçla, üç farklı PCR döngü sayısı (9, 11 veya 13) sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde görüntülendi. Şekil 3.7'de klasik transluminatör kullanılarak görüntülenen agaroz jelde, PCR ürünlerinin zayıf görüntü verdiği belirlendi. Bu nedenle, laboratuvar altyapımızda bulunmayan ancak protein araştırma laboratuvarında kullanma imkânı bulduğumuz GelDoc-It Imaging System kullanıldı. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi, 11 ve 13 PCR döngüsü sonunda, non-spesifik PCR ürünlerinin oluştuğu belirlendi. Non-spesifik

ürünlerin ilerleyen SELEX adımlarında girişime neden olacağı dikkate alınarak, 9 PCR döngüsü optimum olarak belirlendi.

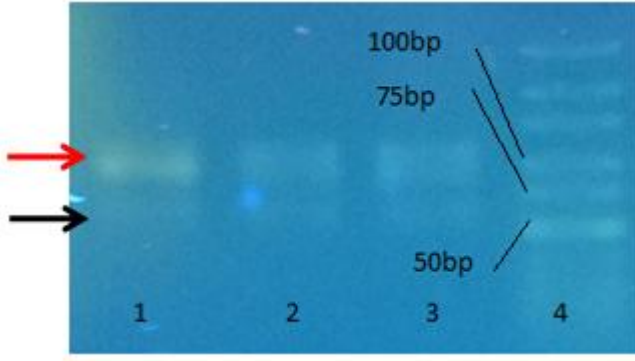


Şekil 3.8 PCR döngü sayısının belirlenmesi. 1. kuyucuk 9 PCR döngüsü, 2. kuyucuk 11 PCR döngüsü, 3. kuyucuk 13 PCR döngüsü sonucunda elde edilen ürünleri içermektedir. 4. kuyucuk DNA markerı, 5. kuyucuk kalıp içermeyen negatif kontrol. Non-spesifik PCR ürünleri jel fotoğrafı üzerinde işaretlenmiştir.

3.6 Çift iplikli DNA'dan ssDNA Elde Edilmesi Amacıyla ile Kullanılan Lambda Ekzonükleaz Kesim Reaksiyonu Koşullarının Optimizasyonu

Lambda ekzonükleaz aktivitesi için en uygun süre ve enzim Unit aktivite değerlerinin belirlenmesi amacı ile çeşitli koşullar incelendi.

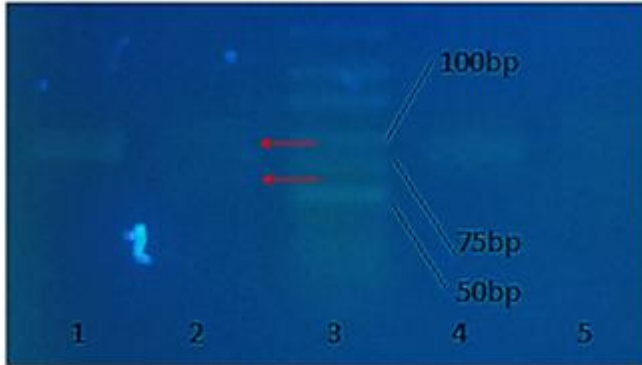
İlk parametre olarak, kesim reaksiyonu süresi incelendi. Bu amaçla, 10 U lambda ekzonükleaz ve 2 µg PCR ürünü içeren kesim reaksiyonu hazırlandı ve 30, 45 ve 60. dakikalarda örnek alındı. 80 °C'de 10 dak inkübe edilen örneklerde, enzimin termal denatürasyonu gerçekleştirildi. Örnekler agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Lambda ekzonükleaz kesim reaksiyonu süresi. 1. kuyucuk 30 dak; 2. kuyucuk 45 dak; 3. kuyucuk 60 dak süre ile gerçekleştirilen kesim reaksiyonu ürünlerini içermektedir. 4. kuyucuk DNA markerdir.

Şekil 3.9’da görüldüğü gibi, kesim reaksiyonu sonucunda ortamdaki tüm çift iplikli DNA moleküllerinin tek iplikli DNA’ya dönüştürülemediği belirlendi. Çift iplikli DNA bandı, kırmızı renkli ok ile kesim ürünü olarak beklenen tek iplikli DNA bandı siyah renkli ok ile gösterilmiştir.

Üretici firma tarafından önerilen enzim aktivitesi, 2 µg çift iplikli DNA için 10 U enzim kullanılması şeklindedir. Üretici firma tarafından önerilen 10 U enzim aktivitesinin kesimin tamamlanması için yeterli olmadığı sonucuna varıldı ve bu nedenle aynı reaksiyon 20 U enzim ile tekrarlandı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Lambda ekzonükleaz aktivitesi. 1. ve 3. kuyucuklar kesimin 0. dakikasında enzim eklenmeden önce alınan örneklerdir. 2. kuyucuk 2 µg DNA için 10 U enzim kullanılan örnek, 5. kuyucuk 2 µg enzim için 20 U enzim kullanılan örnektir. 3. kuyucuk DNA markerdir.

Şekil 3.10’da görüldüğü gibi, 10 U enzim aktivitesi kullanılması durumunda kesimin tamamlanmadığı belirlendi. 20 U enzim aktivitesi kullanılması

durumunda ise, çift iplikli DNA bandının yoğunluğu anlamlı düzeyde azaldı. Bununla birlikte, tek iplikli DNA molekölü net bir şekilde görüntülenemedi.

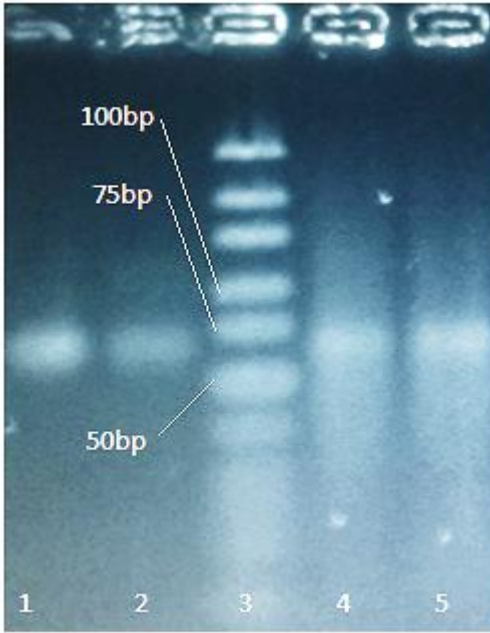
Kesim reaksiyonu sonucu oluşması beklenen ssDNA ürünleri ile ilgili görüntüleme sorunu, kullanılan Safeview (Applied Biological Materials (ABM) Inc.) boyasının ssDNA için uygun bir boya olmayabileceği şeklinde değerlendirildi. Bu nedenle, Safeview yerine dedeksiyon hassasiyeti daha yüksek olan SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFisher) kullanılarak kesim reaksiyonları tekrarlandı. Bu amaçla, aptamer kütüphanesi 9 döngü PCR sonucunda çoğaltıldı ve dsDNA, 20 U lambda ekzonükleaz ile kesildi. Kesim 90 dakika süre ile 37°C’de gerçekleştirildi. Ardından, enzimin inaktivasyonu amacı ile 80°C’de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler %4 agaroz jele yüklendi, 150V sabit gerilimde 30 dakika yürütüldü. Ardından, agaroz jel SYBR Gold boyası ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve boyama işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 SYBR Gold ile boyanmış agaroz jel. 1. kuyucuk, reaksiyona enzim eklenmeden önce alınan dsDNA örneği. 2. kuyucuk DNA marker. 3. kuyucuk 90 dakikalık kesimin ardından alınan örnek.

Şekil 3.11’de görüldüğü gibi, 3. kuyucukta kesim sonrası tek bant elde edilmesi ve dsDNA moleküllerinin bulunmaması, kesimin başarı ile tamamlandığını göstermektedir. Bunun yanında, ssDNA dedeksiyonu için kullanılan SYBR Gold boyasının Safeview boyasından daha uygun olduğu sonucuna ulaşıldı.

Bununla birlikte, kesim ürününün 50 baz çifti büyüklüğünde elde edilmesi beklenmekteydi. Bu farkın nedeninin açıklanabilmesi amacı ile ssDNA kütüphanesi kontrol olarak doğrudan agaroz jele yüklendi (Şekil 3.12). Şekil 3.12’de görüldüğü gibi, kesim reaksiyonu sonucu elde edilen ssDNA ürününün, orjinal ssDNA kütüphanesi ile aynı boyutta olduğu belirlendi ve kesimin başarılı olduğu sonucuna varıldı. Bu durumda, ssDNA ürününün beklenenden daha yukarıda bir bant vermesi, ssDNA moleküllerinin farklı karakterde sekonder yapı oluşturması ve denatüre olmayan jelde farklı yürüme karakterine sahip olması ile açıklanabilir. Bunun yanında, 60 dakikada kesimin tam gerçekleşmediği ve reaksiyon süresinin optimum 90 dakika olduğu belirlendi.



Şekil 3.12 ssDNA eldesi. 1. kuyucuk 90 dakika süreli ekzonükleaz kesimi ürünü; 2. kuyucuk 60 dakika süreli ekzonükleaz kesimi ürünü; 3. kuyucuk DNA markerıdır. 4. ve 5. kuyucuk orjinal ssDNA kütüphanesidir.

3.7 Rekombinant SpyCEP’in Magnetik Boncuklara İmmobilizasyonu

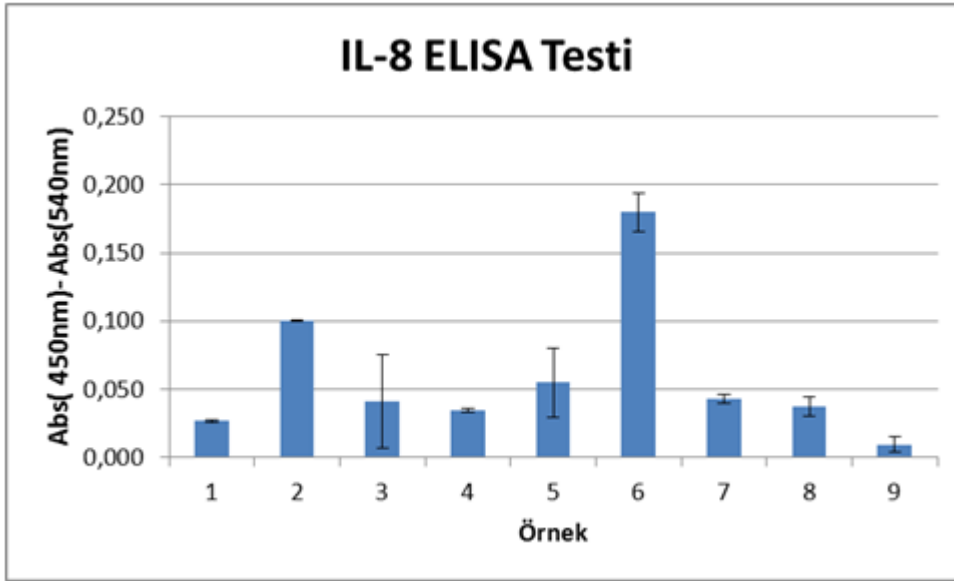
2 mg karboksil modifiye magnetik boncuğa, 175 pikomol SpyCEP bağlandığı belirlendi. Magnetik boncuklara immobilizasyon sonucu, SpyCEP aktivitesinin olumsuz etkilenmesi ve aktivitenin tamamen kaybedilmesi riskine karşı ELISA yardımı ile aktivite tayini gerçekleştirildi (Şekil 3.13). Geliştirilecek olan aptamerlerin SpyCEP’in aktif konformasyonuna bağlanmasının amaçlanması

nedeni ile immobilize SpyCEP'in insan interleukin-8 (IL-8) parçalama aktivitesi ELISA testli ile doğrulandı. SpyCEP immobilize boncuklardan 25 µg alınarak ELISA testinde kullanıldı.

ELISA testi, örnekte bulunan IL-8'in varlığını göstermektedir ve oluşan kolorimetrik sinyal, enzim aktivitesi ile ters orantılıdır. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi, SpyCEP-immobilize boncuklarda enzimatik aktivite belirlendi. Bu durum, SpyCEP'in boncuk yüzeyinde aktif konformasyonda olduğunu ve SELEX çalışmalarında kullanılabileceğini göstermesi açısından olumludur.

ELISA sonuçlarına dayanarak:

- 1 numaralı örnekte magnetik boncuklara bağlanan SpyCEP'in aktivitesi belirlenmiştir. Eklenen 500 pg/mL konsantrasyondaki IL-8'in tamamına yakını proteolitik olarak parçalayabilmiştir.
- 2 numaralı örnekte, ortama eklenen SpyCEP'in tamamının magnetik boncuklara bağlanmadığı görülmektedir.
- 3, 4 ve 5 numaralı örnekler, bağlanan boncuklarla yapılan yıkama ve bloklama adımlarından sonra, boncuklara kovalent bağlanmayan enzimlerin yıkandığı dolayısıyla bu örneklerde de SpyCEP aktivitesi olduğunu göstermektedir.
- 8 numaralı örnekte, boncuklara bağlanmadan önce enzimin aktif olduğu görülmektedir.
- 9 numaralı örnek, SpyCEP ve IL-8 içermemektedir, negatif kontrol olarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.13 IL-8 ELISA testi. 1, 2, 3, 4, 5 ve 8 numaralı örneklere 500 pg/mL konsantrasyonda IL-8 eklendi ve 2 saat 37 °C’de inkübe edildi. 1, 25 µg SpyCEP bağlı magnetik boncuk içermektedir; 2, magnetik boncuklara bağlanmayan SpyCEP örneği; 3, etanolamin ile bloklama adımından sonra alınan örnektir; 4, birinci yıkama ve 5, ikinci yıkama örneğidir; 6, 500 pg/mL IL-8 standartının verdiği kolorimetrik sinyal, 7, 62.5 pg/mL IL-8 standartına ait sonuçtur. 8, magnetik boncuklara bağlanmayan serbest SpyCEP ve 500 pg/mL IL-8 içermektedir; 9, negatif kontrol olarak kullanılan PBS tamponudur.

3.8 SELEX Çalışmaları

SpyCEP-immobilize magnetik boncuklar ile SELEX adımları uygulandı. Bu amaçla, negatif-SELEX için kullanılmak üzere etanolamin ile bloklanmış boş magnetik boncuklar hazırlandı. Kütüphaneden PCR ile çoğaltılan dsDNA, Lambda exonükleaz ile kesildi ve ssDNA elde edildi. ssDNA karışımı, etanolamin ile bloklanmış boş boncuklar ile 30 dakika inkübe edildi. Bu adım ile, boş magnetik boncuklar ile non-spesifik olarak etkileşen ssDNA moleküllerinin eliminasyonu amaçlandı. Magnetik boncuklar mıknatıs yardımıyla toplandı ve boş magnetik boncuklara bağlanmayan ssDNA moleküllerini içeren sıvı faz alınarak bu kez SpyCEP-immobilize magnetik boncuklar ile 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Ardından, magnetik boncuklar mıknatıs yardımıyla toplandı ve sıvı faz atıldı. Magnetik boncuklar iki kez 5 dakika süre ile PBS tamponunda yıkandı. Ardından, SpyCEP-immobilize magnetik boncuklara bağlanan ssDNA moleküllerinin elüe edilmesi amacı ile magnetik boncuklar 95 °C ‘de inkübe

edildi. Elde edilen elüat üzerine PCR master karışımı eklendi ve 11 tur PCR gerçekleştirildi. 11 turun sonunda SpyCEP-immobilize magnetik boncuklardan elüe edilen ssDNA'nın amplifiye olduğu belirlendi (Şekil 3.14). Bu şekilde, 1. SELEX turu tamamlandı. Negatif-SELEX sonucunda boş magnetik boncuklardan elde edilen ssDNA'dan PCR ürünü oluşumu belirlenmedi. Bu sonuç, kütüphanenin magnetik boncuklara non-spesifik olarak bağlanmadığını veya çok az düzeyde bağlandığını göstermektedir. Bu sonuç, 1. tur protein-SELEX öncesinde kütüphane çeşitliliğinin kaybedilmemesi açısından olumludur. Şekil 3.14'te 3 numaralı kuyucukta PCR ürünü elde edilmesi, SpyCEP'e bağlanan aptamer kütüphanesinin varlığını göstermektedir.



Şekil 3.14 ssDNA'dan dsDNA eldesi. 1: boş magnetik boncuklara bağlanan ve elüe edilen ssDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR. 2: DNA marker. 3, SpyCEP-immobilize magnetik boncuklara bağlanan ve elüe edilen ssDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR

Çizelge 2.2'de belirtildiği gibi 4 tur boyunca şartların zorlaştırılmamasına rağmen, kütüphaneyi amplifiye etmek için gereken PCR turu sayısında belirgin bir düşüş gözlenmedi. Bu nedenle zenginleşmenin gerçekleştiği sonucuna varılarak 13. turda SELEX sonlandırıldı ve SpyCEP'e bağlı olan aptamerler elüe edildi. Yüksek sıcaklık uygulaması (termal elüsyon) ile aptamerlerin sekonder yapılarının bozulması ve hedeften ayrılmaları amaçlandı. Bununla birlikte, termal elüsyon öncesinde 50µM IL-8 ile elüsyon gerçekleştirildi. Bu elüsyonla enzimin

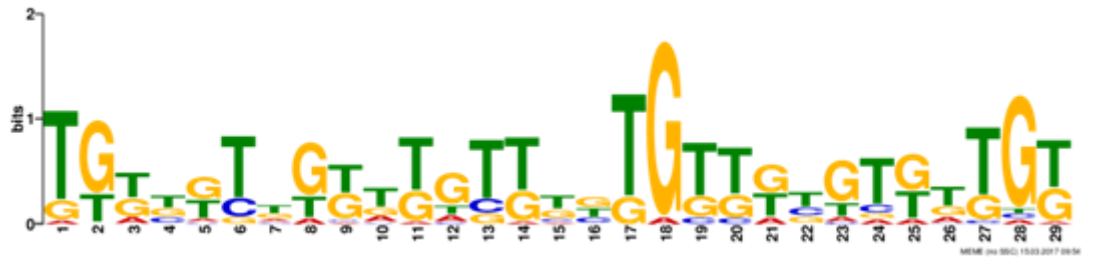
aktif bölgesine bağlanabilecek aptamerlerin, enzimin substratıyla yer değiştirerek elüe edilmesi hedeflendi. IL-8 Elüsyonunun ardından termal elüsyon yapıldı ve enzim üzerine bağlanan bütün aptamerler elüe edildi. 13. tur kütüphaneleri (IL-8 Elüsyonu ve termal Elüsyon) “InsTAclone PCR Cloning Kit” kullanılarak klonlandı ve sekans analizine gönderildi.

3.9 Sekans Sonuçları

13. SELEX turundan elüe edilen örnekler için sekans analizi yapıldı. IL-8 elüsyonundan elde edilen diziler için “MEME Suite” (Şekil 3.15) ve IL-8 elüsyonundan elde edilen diziler için alınan “MEME Suite” sonucu (Çizelge 3.6) ile IL-8 elüsyonundan elde edilen dizilerin “MEME Suite” programından eşleştirilmesi gerçekleştirildi. Çizelge 3.7'da ve Şekil 3.16'da gösterildiği gibi, termal elüsyondan elde edilen dizilerin de “MEME Suite” programından eşleştirilmesi gerçekleştirildi. Diziler kendi aralarında ve tüm diziler birlikte olacak şekilde karşılaştırmalar yapıldı. “MEME Suite” programı, girilen sekansları çakıştırıp, sekansların arasında korunmuş motifleri bulmaktadır. Program bütün sekansları karşılaştırdıktan sonra, her bir dizi için birer “E” değeri vermektedir. Bir dizi için verilen E değeri ne kadar düşükse bu dizinin o kadar zenginleştiğini göstermektedir.

Çizelge 3.6 IL-8 Elüsyonundan elde edilen diziler “MEME Suite” programından eşleştirilmesi

Dizi	E değeri	Eşleşen diziler
14	1.93e-10	GTAAA GTGGTTTGTTCGTGGGTTCGTGGTGG TT
8	2.59e-10	TACAGT TGACTTTGGTTGTTTCTGTTTGTATGTTGT GGC GC
29	2.99e-10	CGGTTGG TGTGGTGTGTGGTTTGTGTGGTGTGGTGA CGT
11	4.57e-10	GTTGTA TGTGCTGGTGGCTTTTGTGTTGTTATGG TCG
3	1.34e-9	CTGT TGTCTGATTTTGTGTTTGTGGGCGGTGGT GGGTTT
22	5.81e-9	TGTTGCTTGTATTGTGGTTGCTTGTGGT ATGTACTCGT
12	1.15e-8	TGTCTTTGTTTTTGTGGCGCGATGTGG TTGTCGGTGG
23	2.43e-8	CG TGTTCCTCGTGTGTGTGTTTGTGAGGT GGTGTTGTC
18	2.99e-8	GTT TGGTTGAGGTGGCGTTTGGTGTTCGTTGT TGGGTGC
24	5.46e-8	TGGCT TTGTGCGGTATGGTATTGTGGGCTTTGT GA
21	6.03e-8	TGGCTTGGTT TTGGGTGGCCGGTGGGTGTGATGTGGTGT
2	7.31e-8	GT TGTCTGAGTATATTCCGGTTGTGTAGGGT TGTGTTCCG
6	1.07e-7	GTTGGT TGGAACAGTGTGTTGTGGTGTGATGT GCGT
26	2.62e-7	GTAG TTAGTTGTGATACCTCTGTTGTTTTGGG TTCCTC
15	4.02e-7	CTG TGTGTGTTGGGGTTCGGGTTCGTTTATAG CAGTG
5	7.11e-7	GACG TTGCTTCATTGTTTGTGTTTATTGGTGT GTGG
19	7.70e-7	GGTTAGA AGTGGTGTGTTTGTGGTAGTACGTTTTGG
27	1.14e-6	CGA GTTTTTGAAGGTTTGTGGTATGGGCTGT TGTGCA
4	1.23e-6	GTGCTG TGTGTTGGTTCTACATGCCCTGTTTTGG GA
17	2.74e-6	GCTTGG GGGTATGGTGGGTTACTGGTGTGATGTG GCGT
16	3.38e-6	TTCTTTT GGATGTGGGTAGCGTTTGTGTCGATTTCT TTG
1	5.79e-6	GGNGNTGT TNNTGCNATNTNGGGGTGTTGCATTTTGT
9	1.98e-5	TGGTGTTCGTTTTCGTCGGTCCGACGG GTTTTTATGT



Şekil 3.15 IL-8 Elüsyonundan elde edilen diziler için alınan “MEME Suite” sonucu



Şekil 3.16 Termal elüsyonundan elde edilen diziler için alınan “MEME Suite” sonucu

Çizelge 3.7 Termal elüsyonundan elde edilen diziler “MEME Suite” programından eşleştirilmesi

Dizi	E değeri	Eşleşen diziler
49	8.12e-13	G GTGTGTGTGCGCTTTTGGGTGGTTGTG CTTGCGTC
46	1.16e-10	GTTGGTTT GTGTTTGTGCGCTTATCTGTGTTGTTT AC
43	2.56e-10	GGTGATCA GTGGGTTTCTATGTGGGGTGGTGGTT GCT
35	1.21e-9	GCTTTTA GGTATGAGTGTGTTTGTGGTGTGGTT TGTC
44	1.35e-9	TGTT GGTGTTGTGTTCTGCTTGGTTTGTGTT GTGCGTC
32	4.74e-9	GGTTTGTGT TTTTGGTTTGCAATGGTATGGTGTGTT C
48	3.15e-8	GTGTGTTTGGGTTGTGCAATAGAGTTGT ATGGTTCTGG
47	3.15e-8	CNN GAGTGGGGTTGTTGGTGTGTTGGTGTATG TGGTCGTG
42	6.39e-8	GGTTGC TCGTGGTTTCGTTGCTTGATTTTGGGTT TAT
33	6.89e-8	GGTGTGT GGGTCTGCGGGCTGCGGGCTGGTTGTTG GTTGT
39	8.00e-8	TGGT TTGTTTGTCTGTTTCGCAATTTTGGTT TTTTA
50	4.40e-7	C CGGGTTATAGGTTTGTGTGTGTAGTGTG AGTGAACC
45	4.66e-7	TTTGAAGTGTGGGGTGTGTTGGTGTGTT TAACTTGTGC
38	5.53e-7	TT GTGGTGTGCTCAATGGTAATTGTGTGGG TGTTTTGGGT

Kullandığımız SELEX tamponunda K^+ ve Mg^{2+} iyonları bulunmaktadır. Bu iyonlar G-kuadrupleks oluşumunu desteklemektedir. “QGRS analyzer” programına göre sekanslanan dizilerden 21 tanesinde G-kuadrupleks mevcuttur. “QGRS analyzer” programı DNA dizilerinde oluşabilecek G-kuadrupleksleri tahmin etmektedir. Verilen diziye göre hangi bazların G-kuadrupleks oluşturabileceğini göstermektedir. Dizilerin oluşturacakları bu yapı, daha stabil üç boyutlu yapıların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. 33 numaralı dizi, diğer dizilere kıyasla daha fazla G-kuadrupleks oluşturma eğilimindedir. Benzer şekilde, 21 numaralı dizinin de G-kuadrupleks oluşturma ihtimali yüksektir.



Şekil 3.17 Elde edilen bütün diziler için alınan “MEME Suite” sonucu

Çizelge 3.8 Elde edilen bütün dizilerin “MEME Suite” programından eşleştirilmesi

22.	9.83e-12	CGTGTTCTCG	TGTGTGTGTGTTTGTGAGGTGGTGTGTTGT	C
36.	1.03e-9		TGTTGGTGTGTGTTCTGCTTGGTTTTGT	TTTGTGCGTC
39.	1.64e-9	CNNGAG	GGGGTGTGTGGTGTGTGGTGTATGTGGT	CGTG
27.	2.58e-9	CGGTT	GGTGTGGTGTGTGGTTTGTGTGGTGTGGT	GACGT
14.	5.34e-9	C	TGTGTGTGTTGGGGTTGCGGGTTCGTTTT	AGCAGTG
3.	5.34e-9	CTGT	TGTCGTATTTTTGTGTTTGTGGGGCGTGGT	GGGTTT
7.	6.15e-9	TACAGT	TGACTTTGGTTGTTTCTGTTTGAATGTTGT	GGCGC
20.	7.07e-9	T	TGGCTTGGTTTTGGGTGGCCGGTGGGTGT	GATGTGGTGT
13.	7.07e-9	GTAAAG	TGGTTTGTGTTGTGGGTGTGTGGTGGT	T
30.	1.06e-8	GGTG	TGTGGGTCTGCGGGCTGGCGGCTGGTTGT	TGGTTGT
29.	1.22e-8		TGGTTTTGTGTTTTTTGGTTTGCATTGGT	ATGGTGTGTT
21.	2.05e-8		TGTTGCTTGTATTTGTGGTTGCTTGTGGT	ATGTACTCGT
17.	3.39e-8	GTT	TGGTTGAGGTGGCGTTTGGTGTTCGTTGT	TGGGTGC
10.	4.88e-8	GTTG	TATGTGTCTGGTGGCTTTTGTGTTGTTAT	GGTCG
11.	5.50e-8	TGTC	TTTTTTTTTTTTGTGGCCGATGTGGTTGT	CGGTGGT
35.	7.81e-8	GGTGA	TCAGTGGGTTTCTATGTGGGGTGGTGGT	TTGCT
31.	1.10e-7	GCTT	TTAGGTTATGAGTGTGTTTGTGGTTGTGGT	TGTGTC
38.	2.61e-7	GTTGG	TTTGTGTTTGTGCGCTTATCTGTGTTGTT	TGAC
41.	2.90e-7	GG	TGTGTGTGCNCTTTTGGGTGGTTTGTGCT	TGCGTC
16.	2.90e-7	GCT	TTTTGGGTATGGTGGGTACTGGTGTGTAT	GTGGCGT
37.	5.83e-7	TTTGAAGTGT	GGGGTGTGTTGGTGTGTTAACTTGTGCT	
23.	7.07e-7	TGGCT	TTGTGCGGTATGGTATTGTTGGGCTTTGT	GA
6.	2.09e-6	G	TTGGTTGGAACAGTGTGTTGTGGTGTGTTGT	GATGTGCGT
5.	2.27e-6	GACG	TTGCTTCATTGTTTGTGTTTATTGGTGT	GTGG
26.	2.47e-6	CGAGTTTTT	TGAAGTTTTGTGGTATGGGCTGTTGTGCA	
18.	2.92e-6	GGTTA	GAGTGGTTGTTTTGTGGTAGTACGTTTT	GG
8.	2.92e-6	TGGTGTGTT	GGTTTGGTGGTGGTGGGACGGGTTTTTAT	GTT
33.	5.97e-6	TGGTT	TGTTTGTCTGTTTGGCATTTTTTGGTTTT	TTTA
32.	5.97e-6	TGTGGTGTGCG	TCAATGGTAATTGTGTGGGTGTTTTGGGT	
25.	1.24e-5	GTAGT	TAGTTGTGATACCTTCTGTTGTTTTTGGGT	TCCTC
40.	1.63e-5	G	TGTGTTTGGGTGTGCAATAGAGTTGTAT	GGTTCTGGT
34.	1.74e-5	GGTTGC	TCGTGGTTTGGTTGCTTGATTTTTGGTTTT	AT
2.	1.99e-5	GT	TGTCGTAGTATATCCGGTTGTGTAGGGT	TGTGTTCCG
1.	2.57e-5	GGNGNTGT	TNNTGCNATNTNGGGGTGTTGCATTTTTGT	
42.	3.50e-5	CCGGGT	TATAGGTTTGTGTGTGTAGTGTGAGTGAA	CC
12.	3.50e-5	GAT	TGTCCTCTGTATGCTGTGTCCTAAGTTTGA	GTGTC
4.	3.50e-5	GT	GCTGTGTTGTTGGTTCTACATCCCTTGT	TTGGGA
15.	4.18e-5	TTCTTTT	GGATGTGGGTAGCGTTTGTGTGATTTCT	TTG

Şekil 3.17 ve Çizelge 3.8’de elde edilen bütün sekans sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

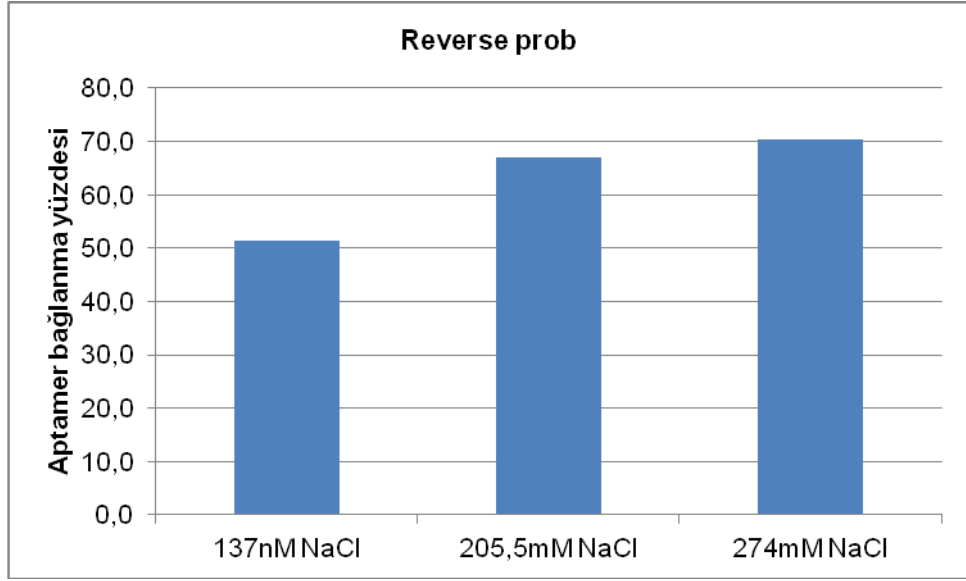
Bu analizlerin sonucunda 8, 14, 23, 29, 33 ve 49 numaralı diziler ileri karakterizasyon için seçildi ve oligo formunda temin edildi. Seçilen dizilerin sekansları E ve G değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 Karakterizasyon için seçilen diziler, E ve G değerleri

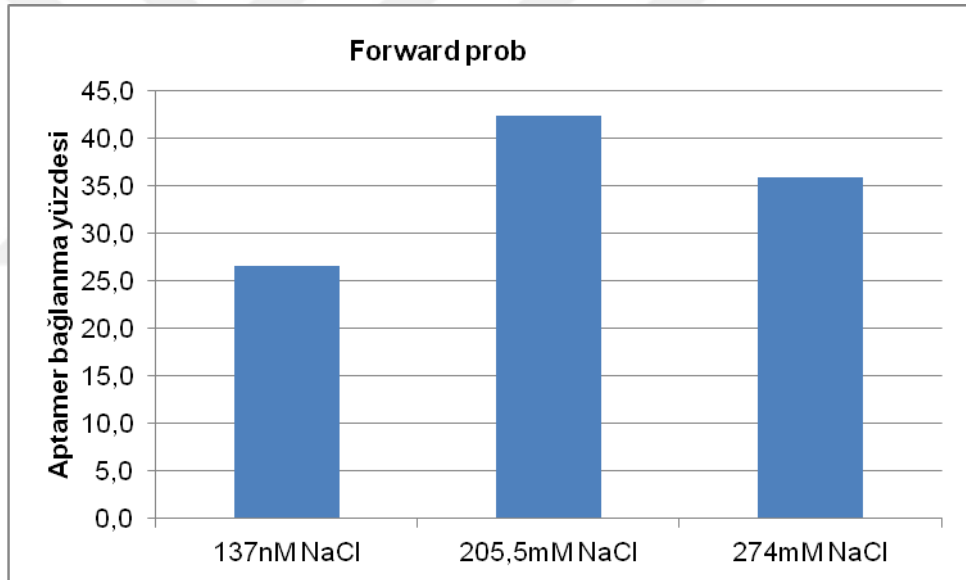
Sekans adı	Sekans	E değeri	G değeri
Apta_Spy_14	5' AGGATTCAGATCTCCCTGCAGGTAAAGTGGTTTGTGTGT GGGTTGTGTGGTGGTTCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	1.93e-10	18
Apta_Spy_23	5' AGGATTCAGATCTCCCTGCAGCGTGTTCGTGTGTGTGTGT TTGTTGAGGTGGTGTTCCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	9.83e-12	10
Apta_Spy_49	5' AGGATTCAGATCTCCCTGCAGGGTGTGTGTGCGCTTTGGGT GGTTTGTGCTTGCGTCCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	8.12e-13	-
Apta_Spy_33	5' AGGATTCAGATCTCCCTGCAGGGTGTGTGGGTCTGCGGGCTGG CGGCTGGTTGTTGGTTGTCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	1.06e-8	21+17
Apta_Spy_8	5' AGGAATTCAGATCTCCCTGCAGTACAGTTGACTTTGGTTGTT GTGTTGATGTTGTGGCGCCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	2.59e-10	-
Apta_Spy_29	5' AGGATTCNGATCTCCCTGCAGCGGTTGGTGTGGTGTGTGGTTG TGTGGTGTGGTGACGTCTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	2.99e-10	19

3.10 Aptamer SpyCEP Etkileşiminin ELAA Yöntemiyle Analizi

Kolorimetrik test için tasarlanan problar ile aptamerlerin etkileşimleri test edildi. Reverse prob, aptamerin 3' primer bölgesiyle baz eşleşmesi yapacak şekilde tasarlandı. Forward prob da, aptamerin 5' primer bölgesine baz eşleşmesi yapacak şekilde tasarlandı. Reverse prob aptamerin primer bölgesiyle 13, forward prob aptamerin diğer primer bölgesiyle 15 baz eşleşmesi yapmaktadır. Bunun yanında, ortamdaki Na^+ iyonlarının konsantrasyonunun, aptamer ve problar arasındaki komplementasyonu etkileyebileceği dikkate alındı ve bu parametre de kolorimetrik teste geçmeden önce denendi. SELEX tamponu 137 mM NaCl içermektedir. Bu konsantrasyonda, reverse probun aptamerlerin %50'sini, forward probun ise aptamerlerin %27'sini bağladığı belirlendi. NaCl konsantrasyonu iki katına çıkarıldığında reverse prob'un aptamer bağlama yüzdesi %70 olarak belirlendi. Forward prob için bu konsantrasyonda aptamer bağlama yüzdesi %36 olarak belirlendi. Şekil 3.18 Reverse prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimini göstermektedir. Şekil 3.19 forward prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimini göstermektedir.

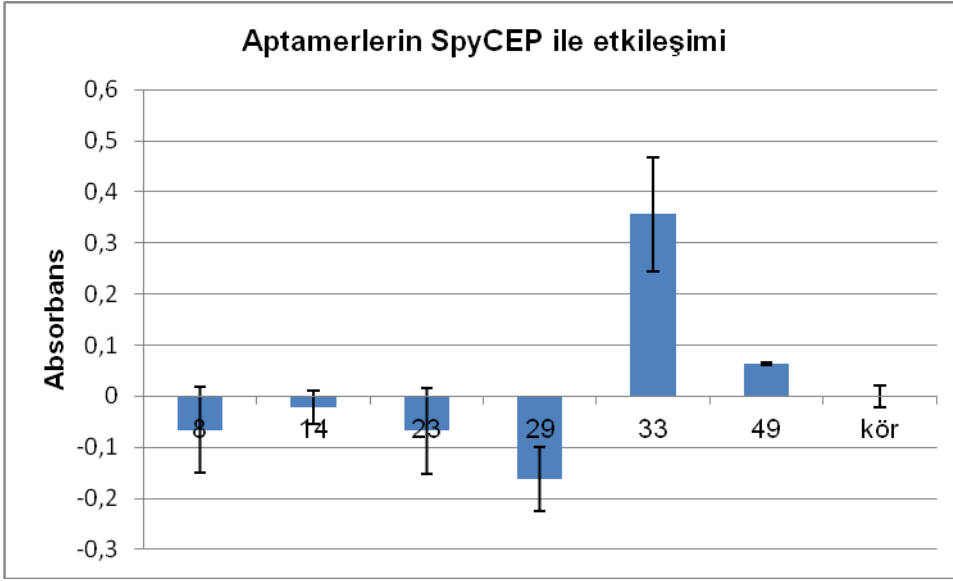


Şekil 3.18 Reverse prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimi.



Şekil 3.19 Forward prob'un değişen NaCl konsantrasyonlarında aptamerle etkileşimi.

Reverse probun aptamerleri daha yüksek miktarda bağlaması nedeniyle kolorimetrik teste reverse prob ile devam edildi. “Meme Suite” ve “QGRS analyzer” programlarıyla seçilen 6 aptamer için yapılan kolorimetrik testte, 33 ve 49 numaralı aptamerlerin SpyCEP’e bağlandığı gözlemlendi. Diğer aptamerlerin SpyCEP’le etkileşimi bu kolorimetrik test ile gözlemlenmedi. Test sonuçları Şekil 3.20’de verilmiştir.

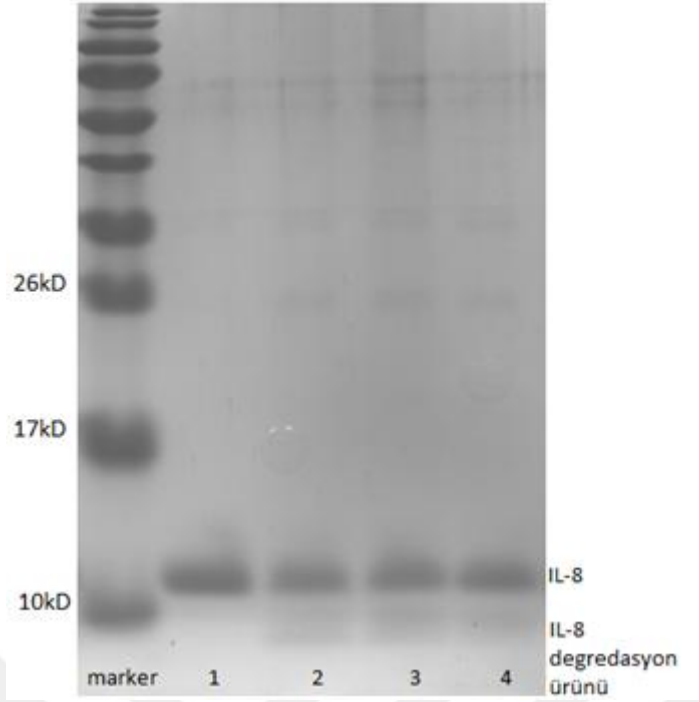


Şekil 3.20 8,14, 23, 29, 33 ve 49 numaralı aptamerlerin SpyCEP ile etkileşimi ELAA yöntemiyle tespit edildi.

3.11 İnhibisyon Testi Sonuçları

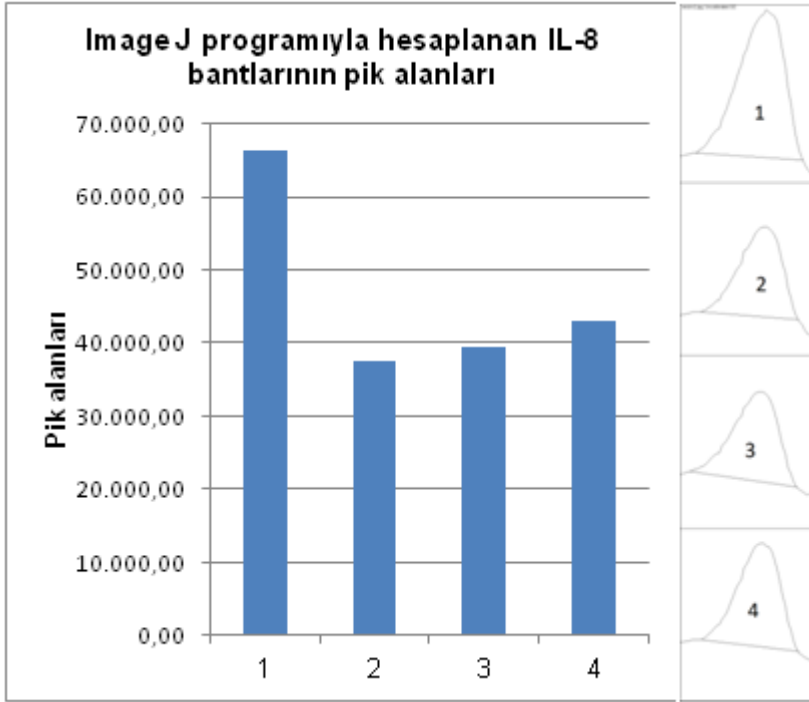
3.11.1 SDS-PAGE sonuçları

33 ve 49 numaralı aptamerlerin SpyCEP aktivitesini inhibe etme yetenekleri incelendi. Enzim aptamerler ile etkileştirildi ve ardından substratı olan IL-8 ile PBS tamponunda inkübe edildi. Kör olarak hiçbir aptamer ile inkübe edilmemiş enzim kullanıldı. SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3.21’de verilmiştir.



Şekil 3.21 SpyCEP aktivitesinin inhibisyonu. 1 yalnız IL-8, 2 SpyCEP ve IL-8, 3 33 numaralı aptamerle inkübe edilen SpyCEP ve IL-8, 4 49 numaralı aptamerle inkübe edilen SpyCEP ve IL-8.

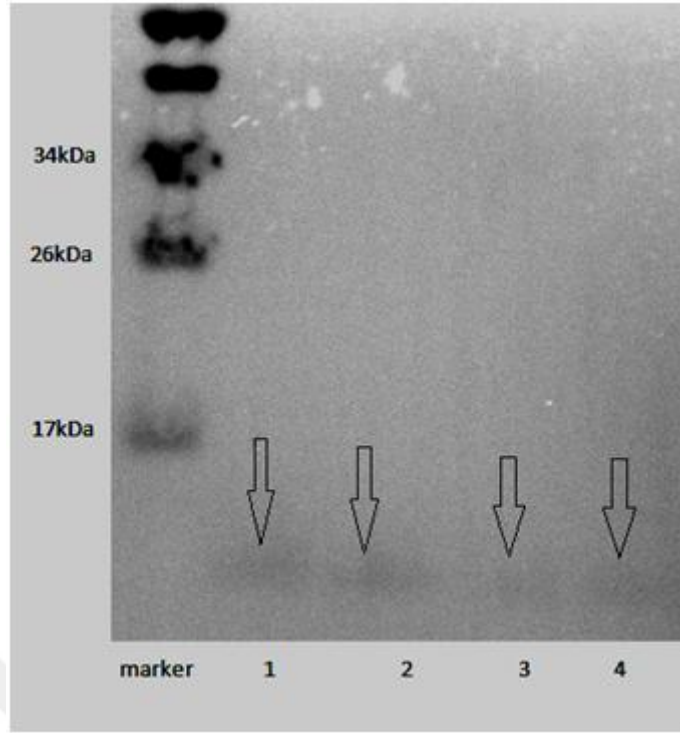
SDS-PAGE sonuçlarında 1 numaralı kuyucukta enzim ile reaksiyona girmeyen IL-8 görülmektedir. Enzim olmadığı koşulda IL-8 10 kDa'luk marker'ın biraz üzerinde tek bir bant vermektedir. 2, 3 ve 4 numaralı kuyucuklarda IL-8'e ait bandın altında oluşan yeni bant enzimin aktivitesi sonucu degrade edilen IL-8 dir. Degrade olmayan IL-8'i gösteren bantlar "İmage j" programı ile analizlendi (Şekil 3.22).



Şekil 3.22 Degrade olmayan IL-8 bantlarının Image j programıyla hesaplanan pik alanları.

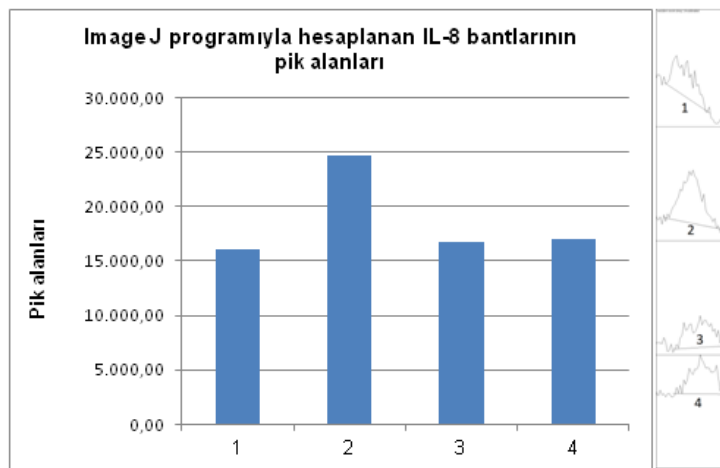
3.11.2 Western blot sonuçları

SDS-PAGE örnekleriyle aynı şekilde hazırlanan örnekler için Western blot analizi gerçekleştirildi. 1 numaralı kuyucukta yalnız IL-8, 2 numaralı kuyucukta enzimle inkübe edilen IL-8 bulunmaktadır. 3. kuyucuktaki örnekte SpyCEP önce 33 numaralı aptamerle inkübe edildi, ardından IL-8 ile inkübe edildi. Aynı şekilde 4 numaralı kuyucuktaki enzim 49 numaralı aptamerle inkübe edildi ve ardından IL-8 ile inkübasyona bırakıldı. Western blot görüntüsü Şekil 3.23'te verilmiştir. Şekil 3.24'te aynı görüntü için ImageJ programıyla hesaplanan pik alanları verilmiştir.



Şekil 3.23 SpyCEP aktivitesinin inhibisyonun Western blot ile tayini. 1 yalnız IL-8, 2 SpyCEP ve IL-8, 3 33 numaralı aptamerle inkübe edilen SpyCEP ve IL-8, 4 49 numaralı aptamerle inkübe edilen SpyCEP ve IL-8.

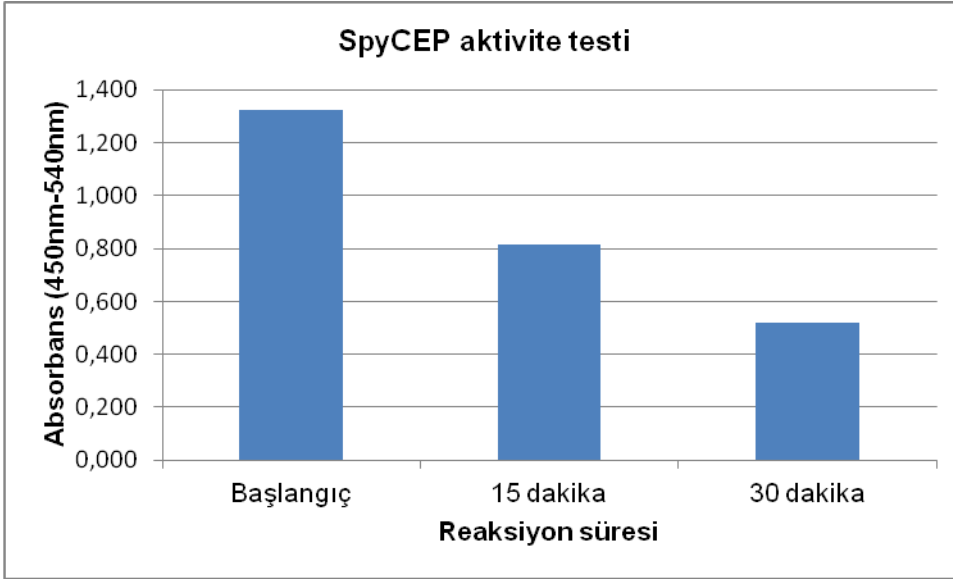
Bantlar karşılaştırıldığında 3 numaralı kuyucukta IL-8 degradasyon ürünü konsantrasyonu 2 numaralı kuyucuğa kıyasla daha azdır. Bu da SpyCEP'in inhibisyonunu ifade etmektedir.



Şekil 3.24 Western blot için IL-8 degradasyon ürünlerinin Image j programıyla hesaplanan pik ve pik alanları.

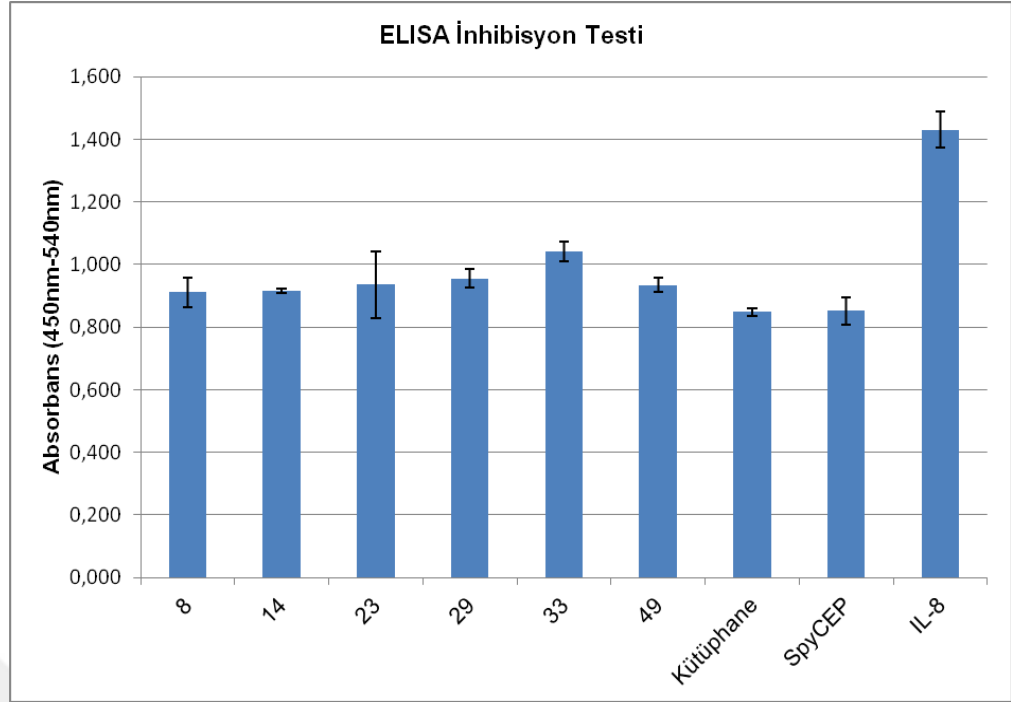
3.11.3 ELISA ile inhibisyon testi sonuçları

İnhibisyonun ELISA kullanılarak değerlendirilmesinin öncesinde, SpyCEP'in aktivite gösterdiği en kısa süre belirlendi. Önceki ELISA testlerinde belirtildiği gibi, enzimin aktivitesi substratının degradasyonu üzerinden ölçülmektedir. İnhibisyonun belirlenebilmesi amacı ile aktivitenin gözlenebildiği en kısa süre belirlendi. Bu süre 15 dakika olarak belirlendi (Şekil 3.25).



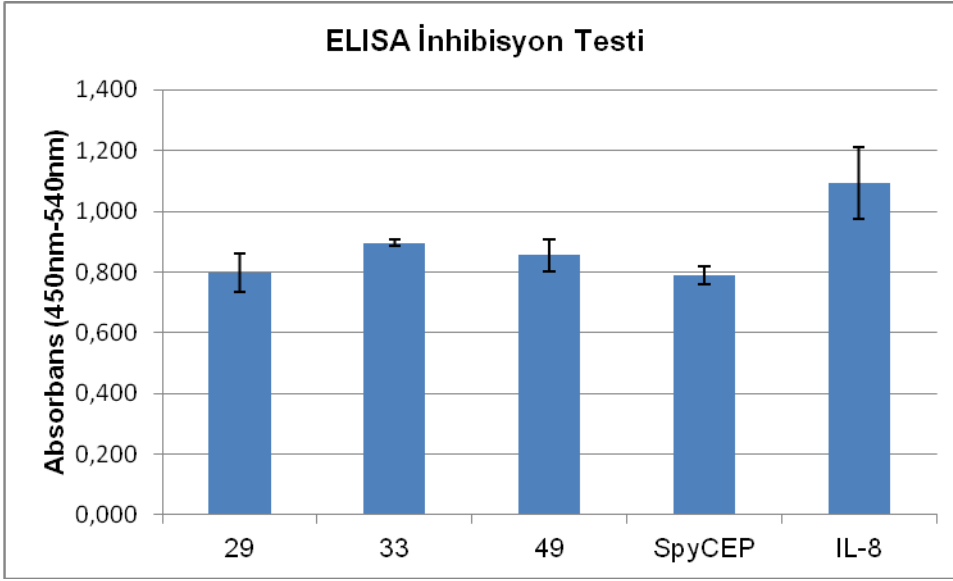
Şekil 3.25 SpyCEP aktivite testi. 1000 pg/μL IL-8 SpyCEP ile inkübe edildi ve farklı sürelerde örnekler alınarak, ELISA ile IL-8 konsantrasyonu tayin edildi. Başlangıç, enzim eklenmeden önce alınan örneği, 15 dakika ve 30 dakika ise enzim eklendikten sonra alınan örnekleri ifade etmektedir.

15 dakikalık sürenin enzimin aktivitesini göstermesi için yeterli olduğu belirlendi. Sekanslanan dizilerden seçilen 6 aptamer için gerçekleştirilen inhibisyon testinin sonuçları Şekil 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.26 ELISA inhibisyon testi. Her reaksiyon eşit miktarda SpyCEP ve IL-8 kullanılarak gerçekleştirildi. 8, 14, 23, 29, 33 ve 49 sayıları enzim ile muamele edilen farklı aptamerleri; kör, enzim eklenmeyen örneği; SpyCEP, aptamer ile muamele edilmeyen enzimi; kütüphane, tek iplikli DNA kütüphanesi ile inkübe edilen örneği göstermektedir.

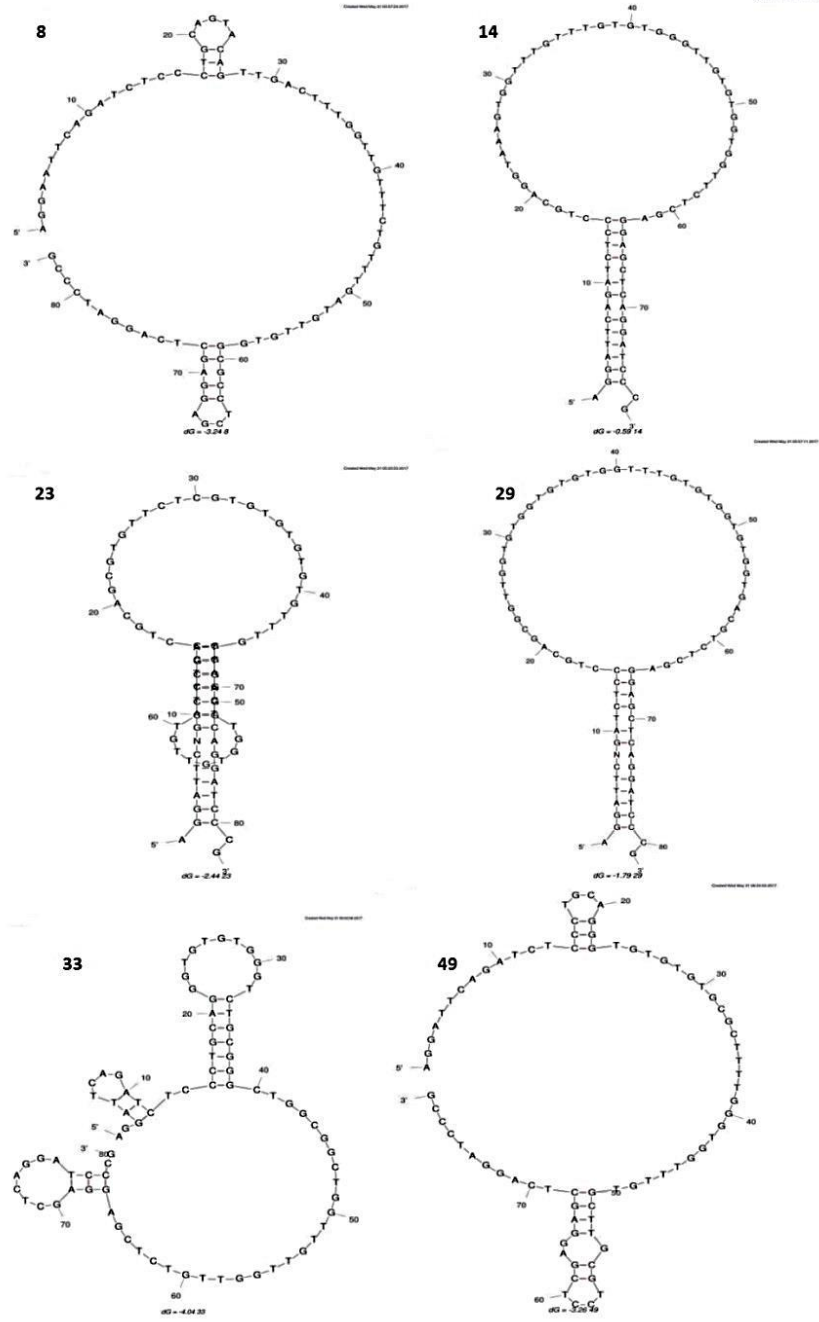
Sonuçlar incelendiğinde, 29, 33 ve 49 numaralı aptamerler ile inkübe edilen ve daha sonra substratı ile reaksiyona sokulan enzimin aktivitesinin azaldığı belirlendi. Diğer aptamerler için ise inhibisyon etkisi görülmemiştir. Rastgele dizilerden oluşan DNA kütüphanesi ile inkübe edilen enzim aktivitesini kaybetmemiştir. Bu durum, aptamerin enzime bağlanmasının ve inhibisyon yeteneğinin non-spesifik bir etki sonucu gerçekleşmediğini desteklemektedir. İnhibisyon denemesi tekrarlandığında, 33 ve 49 numaralı aptamerlerin SpyCEP'i tekrarlanabilir şekilde inhibe ettikleri görülmüştür. 29 numaralı aptamer tekrarlanabilir sonuçlar vermemiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27 29, 33 ve 49 numaralı aptamerler ile tekrar edilen inhibisyon denemesi sonuçları.

3.11.4 Aptamerlerin sekonder yapılarının karşılaştırılması

33 numaralı aptamer için inhibisyon yüzdesinin %33 olarak belirlenmesi nedeni ile, inhibisyon yüzdesinin artırılmasına yönelik aptamer mühendisliği yaklaşımının uygulanabilirliği incelendi. Bu amaçla, aptamerlerin sekonder yapıları mfold web server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) (Erişim Tarihi: 19 Haziran 2018) kullanılarak belirlendi (Şekil 3.28). Aptamer mühendisliği yaklaşımında, sekonder yapı üzerinde korunmuş motifler ve primer dizide zenginleşen motifler analizlenerek aptamer dizisinde çeşitli modifikasyonlar önerilmektedir (Gao et al., 2016). Ancak, SpyCEP için zenginleşen dizilerin sekonder yapıları mfold programı ile analizlendiğinde, sekonder yapıda korunmuş motifler tespit edilememiştir. Sekonder yapılarıdaki varyasyon belirli bir yapıya odaklanma ve rasyonel tasarıma dayalı aptamer mühendisliği yaklaşımı kullanımını kısıtlamaktadır. Enzim inhibisyon testlerinde en iyi etkinliği gösteren 33 ve 49 numaralı aptamerler incelendiklerinde, sekonder yapının yanı sıra primer dizinin de benzerlik taşımadığı belirlenmiştir (Çizelge 3.7).



Şekil 3.28 aptamerlerin (8, 14, 23, 29, 33 ve 49 numaralı aptamerler) sekonder yapıları.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Yanlış veya gereksiz antibiyotik kullanımı nedeni ile, antibiyotik dirençliliği kazanmış patojen bakteriler tüm dünya için bir tehdit oluşturmaktadır. Davos’da düzenlenen 2016 Dünya Ekonomi Forumu’nda, 18 ülkeden ve 80’den fazla şirket ortak bir deklarasyon yayınlamışlardır. Ortak deklarasyonda, antibiyotik dirençliliğine karşı yeni antibiyotiklerin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için AR-GE çalışmalarına ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. *S. pyogenes*, penisiline duyarlıdır ve günümüzde *S. pyogenes* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk aşamada kullanılmaktadır. Penisiline direnç rapor edilmemiştir, ancak penisilin alerjisi olan kişilerde kullanılan makrolid antibiyotiklere dirençli izolatların sayısı giderek artmaktadır.

Bu sorunun çözümü için potansiyel ilaç moleküllerinin elde edilmesi amacı ile *S. pyogenes*’in virulans mekanizmasında rol oynayan SpyCEP enzimi hedef olarak seçildi ve DNA aptamerleri ile enzim aktivitesinin inhibisyonu amaçlandı. DNA aptamerlerinin geliştirilmesi amacı ile başlangıç aptamer kütüphanesi ticari olarak temin edildi ve SELEX turları uygulandı. SELEX sonucunda, SpyCEP’e bağlanan ve enzim aktivitesini inhibe eden DNA aptamerleri belirlendi.

Bu tez kapsamında;

1. SpyCEP enziminin *E. coli* hücrelerinde rekombinant üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirildi.
2. Protein-SELEX uygulandı ve DNA aptamerlerin dizi analizi gerçekleştirildi.
3. Korunmuş motif analizine dayanarak belirlenen aday DNA aptamerlerinin SpyCEP’e bağlanma özellikleri karşılaştırıldı. DNA aptamerlerinin SpyCEP enzim aktivitesini inhibisyon yeteneklerinin incelenmesi amacı ile yarı-kantitatif ve kantitatif testler gerçekleştirildi.

Kantitatif değerlendirme sağlayan ELISA testine göre, 33 numaralı aptamerin inhibisyon yüzdesi yaklaşık %33, 49 numaralı aptamerin inhibisyon yüzdesi yaklaşık %14 olarak belirlenmiştir. Yarı-kantitatif SDS-PAGE ve Western blot analizleri ile her iki aptamer için inhibisyon etkisi doğrulanmıştır, ancak bu yöntemlerin hassasiyetinin kantitatif ELISA testinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. ELISA, SpyCEP tarafından parçalanmadan kalan IL-8 miktarını tayin esasına dayanmaktadır.

ELISA testine göre yaklaşık %33 inhibisyona neden olan 33 numaralı aptamer SpyCEP'in inhibisyonuna yönelik ilaç potansiyeli taşımaktadır. Fakat mevcut inhibisyon yüzdesi bu aptamerin doğrudan ilaç olarak kullanılması için yeterli değildir. Hedeflenen inhibisyon yüzdesine ulaşılması için aptamer mühendisliği yaklaşımının uygulanabilirliği değerlendirilmiştir.

Aptamerin inhibisyon yüzdesinin arttırılmasına yönelik olarak aptamer-SpyCEP etkileşimlerinin modellenmesi yoluyla aptamerin enzim üzerindeki bağlanma bölgesinin belirlenmesi gerekmektedir. Aptamerin enzim aktivitesini tamamen inhibe etmemesinin nedeninin anlaşılması amacı ile bağlanma mekanizmasının anlaşılmasını sağlayacak ek çalışmalara (rneğin aptamer ve enzimin birlikte kristalizasyonu ve aptamer-enzim etkileşiminin modellenmesi) ihtiyaç vardır. 33 ve 49 numaralı aptamerlerin her ikisi de inhibisyon etkisine sahip olmasına rağmen, aralarında yapı ve dizi benzerliğinin bulunmaması, daha detaylı olarak incelenmesi gereken diğer bir sorudur.

Yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen DNA aptamerleri, yeni antibiyotik adaylarıdır ve ilaç potansiyellerinin değerlendirilmesi için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunun yanında, DNA aptamerlerinin SpyCEP'e bağlanma özelliklerinden yararlanılarak aptamer temelli yeni dedeksiyon platformlarının da geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Nükleik asit aptamerlerinin ilaç olarak kullanımını sınırlandıran en önemli faktör nükleazlar tarafından degrade edilmeleri ve serum kararlılıklarının düşük olmasıdır. İleriye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları için, serum kararlılıklarını arttırma amacı ile aptamerlerin polietilen glikol (PEG) ile modifikasyonu, baz modifikasyonları gibi aptamer mhendisliği uygulamalarından yararlanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Avci-Adali, M., Paul, A., Wilhelm, N., Ziemer, G. and Wendel, H. P., 2010, Upgrading SELEX Technology by Using Lambda Exonuclease Digestion for Single-Stranded DNA Generation, *Molecules*, 15:1-11 pp.

Avino, A., Fabrega, C., Tintore, M. and Eritja, R., 2012, Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: chemically modified derivatives and biomedical applications, *Curr Pharm Des.*, 18:2036-2047 pp.

Baneyx, F. and Mujacic, M., 2004, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnology*, 22(11):1399-1408 pp.

Cha, T., Cho, S., Kim, Y. T. and Lee, J. H., 2014, Rapid aptasensor capable of simply diagnosing prostate cancer, *Biosens Bioelectron.*, 62:31-37 pp.

Chiappini, N., Seubert, A., Telford, J. L., Grandi, G., Serruto, D., Margarit, I. and Janulczyk, R., 2012, *Streptococcus pyogenes* SpyCEP influences host pathogen interactions during infection during murine air pouch model, *PLOS ONE*, 7(7): e4011.

Doğan, M., Aydemir, Ö., Güner, Ş. N., Feyzioğlu, B. and Baykan, M., 2014, Antibiotic susceptibility of group A B-Hemolytic Streptococci isolated from tonsillar swab samples in 5-15 years old children, *Eur j Gen Med.*, 11(1):29-32 pp.

Douglas, S. M., Bachelet, I. and Church, G. M., 2012, A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads, *Science*, 335:831-834 pp.

Dupont, D. M., Andersen, L. M, Botkjaer, K. A. and Andreasen, P. A., 2011, Nucleic acid aptamers against proteases, *Curr Med Chem.*, 18(27):4139-4151 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Edwards, R. J., Taylor, G. W., Ferguson, M., Murray, S., Rendell, N., Wrigley, A., Bai, Z., Boyle, J., Finney, S. J., Jones, A., Russell, H. H., Turner, C., Cohen, J., Lee, F. and Sriskandan, S., 2005, Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*, *J. Infect. Dis.*, 192:783–790 pp.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W., 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346:818–822 pp.

Fritzer, A., Noiges, B., Schweiger, D., Rek, A., Kungl, A. J., Gabain, A., Nagy, E. and Meinke, A. L., 2009, Chemokine degradation by the Group A streptococcal serine proteinase ScpC can be reconstituted in vitro and requires two separate domains, *Biochem J.*, 422:533-543 pp.

Galloway, C.A., Sowden, M.P. and Smith, H.C., 2003, Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase, *Biotechniques* , 34:530-536 pp.

Gao, S., Zheng, X., Jiao, B. and Wang, L., 2016, Post-SELEX optimization of aptamers, *Anal Bioanal Chem*, 408(17):4567–73 pp.

Hamula, C. L. A., Le, X. C. and Li, X. F., 2011, DNA aptamers binding to multiple prevalent m-types of *Streptococcus pyogenes*, *Anal Chem*, 83:3640-3647 pp.

Heiat, M., Najafi, A., Ranjbar, R., Latifi, A. M., and Rasaee, M. J., 2016, Computational approach to analyze isolated ssDNA aptamers against angiotensin II, *Journal of biotechnology*, 230: 34-39 pp.

Heilig, J. S., and Gold, L., 2000, *U.S. Patent No. 6,013,443*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hidalgo-Grass, C., Mishalian, I., Dan-Goor, M., Belotserkovsky, I., Eran, Y., Nizet, V., Peled, A. and Hanski, E., 2006, A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues, *EMBO J*, 25:4628-4637 pp.

Keefe, A. D., Pai, S. and Ellington, A., 2010, ‘Aptamers as therapeutics, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 9:538-550 pp.

Kikili, G. K., Tilton, L. and Karbiwnyk, C. M., 2016, [Letter to the Editor] NaOH concentration and streptavidin bead type are key factors for optimal DNA aptamer strand separation and isolation, *Bio Techniques*, 61:114-116 pp.

Kurupati, P., Turner, C. E., Tziona, I., Lawrenson, R. A., Alam, F. M., Nohadani, M., Stamp, G. W., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Edwards, R.J. and Sriskandan, S., 2010, Chemokine-cleaving *Streptococcus pyogenes* protease SpyCEP is necessary and sufficient for bacterial dissemination within soft tissues and the respiratory tract, *Molecular Microbiology*, 76(6):1387-1397 pp.

Kwon, K., Hasseman, J., Latham, S., Grose, C., Do, Y., Fleischmann, R. D., Pieper, R. and Peterson, S. N., 2011, Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis*, *BMC Biochemistry*, 12:17

Maier, K. E. and Levy, M., 2016, From selection hits to clinical leads: Progress in aptamer discovery, *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 5:16014.

Marimuthu, C., Tang, T., Tominaga, J., Tan, S. and Gopinath, S. C. B., 2012, Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation, *Analyst*, 137:1307-1315 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

McKeague, M., and DeRosa, M. C., 2012, Challenges and opportunities for small molecule aptamer development, *Journal of nucleic acids*, Volume 2012, Article ID 748913, 20 pages

Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., and Sullenger, B. A., 2017, Aptamers as therapeutics, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 57:61-79 pp.

Olsen, R.J. and Musser, J. M., 2010, Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 5:1-31 pp.

Özakkaş, F., Aksungar, F. B. ve Topkaya, A. E., 2007, A grubu-beta hemolitik streptokokların antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM*, 21(1):10-13.

Özalp, V. C., Bilecen, K., Kavruk, M. and Öktem, H. A., 2013, Antimicrobial aptamers for detection and inhibition of microbial pathogen growth, *Future Microbiol.*, 8(3):387-401 pp.

Raju, R. M., Goldberg, A. L. and Rubin, E. J., 2012, Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov.*, 11(10):777-789 pp.

Renders, M., Miller, E., Lam, C. H., and Perrin, D. M., 2017, Whole cell-SELEX of aptamers with a tyrosine-like side chain against live bacteria, *Organic & biomolecular chemistry*, 15:1980-1989 pp.

Rodriguez-Ortega, M. J., Norais, N., Bensi, G., Liberatori, S., Capo, S. and Grandi, G., 2006, Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A streptococcus surface proteome, *Nature Biotechnology*, 24(2):191-197 pp.

San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P. and Gavidia, I., 2013, Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature, *SpringerPlus*, 2:89 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B., 2007, SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular engineering*, 24(4):381-403 pp.

Sumby, P., Whitney, A. R., Graviss, E. A., DeLeo, F. R. and Musser, J. M., 2006, Genome-wide analysis of group A Streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity, *PLOS Pathogens*, 2(1):41-49 pp.

Sumby, P., Zhang, S., Whitney, A. R., Falugi, F., Grandi, G., Graviss, G. A., DeLeo, F. R. and Musser, J. M., 2008, A chemokine-degrading extracellular protease made by group A streptococcus alters pathogenesis by enhancing evasion of innate immune response, *Infect Immun*, 76(3):978-985 pp.

Tan, L. K. K., Eccersley, L. R. J. and Sriskandan, S., 2014, Current view of haemolytic Streptococcal pathogenesis, *Curr Op Infect Disease*, 27:155-164 pp.

Telli, M., Eyigör, M., Tiryaki, Y. ve Aydın, N., 2012, *Streptococcus pyogenes* suşlarında makrolid direnç mekanizmaları ve oranları(Aydın), *ANKEM*, 26(2):74-79 pp.

Tezer Tekçe, Y., Erbay, A., Unaldı , O., Cabadak, H., Sen, S. and Durmaz, R., 2014, ‘‘An outbreak of *Streptococcus pyogenes* surgical site infections in cardiovascular surgery department, *Surg Infect (Larchmt)*., 16(2):151-154 pp.

Tuerk, C. and Gold, L., 1990, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, *Science*, 249(4968):505-510 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Turner, C. E., Kurupati, P., Jones, M. D., Edwards, R. J. and Sriskandan, S., 2009, Emerging role of the Interleukin-8 cleaving enzyme SpyCEP in clinical *Streptococcus pyogenes* infection, *The Journal of Infecitous Diseases*, 200(4):555-563 pp.

Turner, C. E., Kurupati, P., Jones, M. D., Edwards, R. J. and Sriskandan, S., 2009, Emerging role of the Interleukin-8 cleaving enzyme SpyCEP in clinical *Streptococcus pyogenes* infection, *The Journal of Infecitous Diseases*, 200(4):555-563 pp.

Versporten, A., Bolokhovets, G., Ghazaryan, L., Abilova, V., Pyshnik, G., Spasojevic, T., Korinteli, I., Raka, L., Kambaralieva, B., Cizmovic, L., Carp, A., Radonjic, V., Maqsudova, N., Çelik, H. D., Payerl-Pal, M., Pedersen, H. B., Sautenkova, N. and Goossens, H., 2014, Antibiotic use in eastern Europe: A cross national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe, *The Lancet Infectious Diseases*, 14(5):381-387 pp.

Weng, H., Huang, C. and Lee, G., 2012, Screening of Aptamers on Microfluidic Systems for Clinical Applications, *Sensros*, 12:9514-9529 pp.

Wilson, R., 2011, Preparation of Single-Stranded DNA from PCR Products with Streptavidin Magnetic Beads, *Nucleic Acid Therapeutics (Formerly Oligonucleotides)*, 21(6):437-440 pp.

Xing, H., Hwang, K., Li, J.,Torabi, S.F. and Lu, Y., 2014, DNA aptamer technolgy for personalized medicine, *Curent Oppinion in Chemical Engineering*, 4:79-87 pp.

Xing, H., Tang, L., Yang, X., Hwnag, K., Wang, W., Yin, Q., Wong, Y., Dobrucki, L. W., Yasui, N., Katzenellenbogen, J. A., Hellferich, W. G., Cheng, J. and Lu, Y. , 2013, Selective delivery of an anticancer drugwith aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* , *J Mater Chem B Mater Biol Med.*, 1(39):5288-5297 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhou, G., Wilson, G., Hebbard, L., Duan, W., Liddle, C., George, J. and Qiao, L., 2016, Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy, *Oncotarget*, 7(12):13446.

Zhu, G., Zheng, J., Song, E., Donovan, M., Zhang, K., Liu, C. and Tan, W., 2013, Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics, *PNAS*, 10(20):7998-8003 pp.

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G. and Zhang, B., 2017, Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine, *International journal of molecular sciences*, 18:2142.

Zingeratti, C., Falugi, F., Nardi-Dei, V., Pietrocola, G., Mariana, M., Liberatori, S., Gallota, M., Tontini, M., Tani, C., Speziale, P., Grandi, G. and Margarit, I., 2010, *Streptococcus pyogenes* SpyCEP: a chemokine-inactivating protease with unique structural and biochemical features, *The FASEB Journal*, 24:2839-2848 pp.

Zinkernagel, A. S., Timmer, A. M., Pence, M. A., Locke, J. B., Buchanan, J. T., Turner, C. E., Mishalian, I., Sriskandan, S., Hanski, E. and Nizet, V., 2008, The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing, *Cell Host Microbe*, 4(2):170-178 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kaan Sami Tüzün

Doğum Yeri: Mersin

Doğum Tarihi: 21.07.1993

Vatandaşlık: T.C.

Eğitim:

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD,
2015-2018

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 2011-2015