

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE BAKTERİSİNE ÖZGÜ
APTAMER SEÇİMİ

ÖZGÜR GÖKMEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2014

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
BAKTERİSİNE ÖZGÜ APTAMER SEÇİMİ

ÖZGÜR GÖKMEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALİ TÜRKAN

GEBZE
2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/01/2014 tarih ve 2014/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/05/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özgür GÖKMEN'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE

: Doç. Dr. Ayhan ÇELİK

ÜYE

: Doç. Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Sentetik olarak elde edilen ve belirli hedeflere özgü olan tek zincirli DNA ya da RNA yapısındaki kısa oligonükleotidlere “aptamer” denir. Aptamerlerin kullanım alanları çeşitli olsa da genellikle tanı ve tedavi amacıyla kullanılırlar. Bu çalışmada zatürre hastalığına yol açan *Streptococcus pneumoniae* bakterisine spesifik bağlanan ve hızlı bir şekilde bu bakterinin tanısında kullanılabilecek DNA aptamerlerinin seçilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda, DNA aptamer kütüphanesi tasarlanıp yapay olarak sentezlendi ve aptamer seçim işlemi “Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment” (SELEX) yöntemiyle gerçekleştirildi. Aynı cins *Streptococcus sanguinis* bakterisi, karşıt hedef olarak kullanılarak elde edilecek aptamerlerin daha özgün olması amaçlandı. Bu doğrultuda, oligonükleotid kütüphanesi ilk olarak *S. sanguinis* bakterisiyle inkübe edildi (karşıt-SELEX) ve bu bakteriye bağlanmayan, geri kalan oligonükleotidler ayrıştırılarak *S. pneumoniae* bakterisiyle inkübe edildi (SELEX). Toplamda, bu işlemler 4 karşıt-SELEX ve 4 SELEX döngüsü olacak şekilde tekrarlandı. SELEX işleminin sonunda 4 adet aptamer elde edildi ve DNA dizinleri belirlendi. Akış sitometri (flow cytometry) tekniği kullanılarak FAM işaretli aptamerlerle yapılan bağlanma çalışmaları sonucu 4 aptamer içinde sadece bir aptamerin (B40) bakteriye zayıf bağlandığı bulunmuştur. Veriler Hill denkleminde fit edilerek aptamer B40 için yarı doygunluk değeri (K) 1375 ± 151 nM, Hill katsayısı (n) 1.55 ± 0.20 olarak bulunmuştur. Çok spesifik sonuç vermesi beklenen SELEX işleminden beklenen sonucun elde edilememesinin olası nedenleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aptamer, SELEX, *Streptococcus pneumoniae*.

SUMMARY

Aptamers are synthetic, single-stranded, short DNA or RNA oligonucleotides that bind with high affinity to a targeted-molecule. Despite the wide range of use, aptamers were generally applied for diagnostic and treatment purposes. The objective of this study was to find aptamers that selectively bind *S. pneumoniae* bacteria that cause pneumonia in humans. For this purpose, 75 base DNA aptamer library was synthesized. Using this library, the selection of aptamers was done by the method called “Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment” (SELEX). In the SELEX method, *S. sanguinis* was used as a counter target to increase aptamer specificity for *S. pneumoniae*. For this purpose, aptamer library was first incubated with *S. sanguinis* (counter-SELEX). The nonbinding aptamers were separated and incubated with *S. pneumoniae* (SELEX). In total 4 counter-SELEX and 4 SELEX cycles were carried out. 4 aptamers were obtained and their DNA sequences were determined. Binding of aptamers to *S. pneumoniae* was analyzed by Flow cytometry. Among four aptamers only one (B40) was found to bind weakly to the bacteria. The data was fit to the Hill equation and gave half-saturation value (K) of 1373 ± 151 nM and Hill coefficient (n) of 1.55 ± 0.20 . Overall, these results show that the aptamers obtained by SELEX method are not selective to *S. pneumoniae*, indicating that getting false positive results by the SELEX method is likely.

Key Words: Aptamer, SELEX, *Streptococcus pneumoniae*.

TEŞEKKÜR

Yapılan bu tez çalışmasında bana imkân sağlayan, yol gösteren ve destek veren hocalarım; Doç. Dr. Ali TRKAN ve Doç. Dr. Mslm AKGÖZ'e öncelikli olarak teŖekkr ederim.

Tez savunma jri yelerim Doç. Dr. Ayhan ÇELİK ve Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na teŖekkr ederim.

Tm TBİTAK UME Kimya Grubu alıŖanlarına teŖekkr etmekle birlikte deneylerim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sema AKYREK, Dr. Jale ŖAHİN, Merve ZTUĞ ŖENAL, Seda ŖENGL, Murat GEÇER, İlknur AKSOY, BuŖra OLPU, Rabia Nur KAYA, Gamze ERÇELİK ve tez yazımındaki bilgi ve yardımlarıyla Burhanettin YALÇINKAYA'ya teŖekkr ederim.

Bilgi ve birikimlerini benimle paylaŖan, bana yol gösteren ve öğreten Erkan MOZİOĞLU'na özel olarak teŖekkr ederim.

Yaptığım bu tez çalışmasında ve hayatta her daim arkamda olan, beni destekleyen ve ileri doğru yol almamda bir an bile beni yalnız bırakmayan anneme ve babama sonsuz teŖekkrlr.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KONUyla İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Streptokoklar	3
2.2. Streptococcus Pneumoniae	3
2.3. Viridans Streptokokları	4
2.4. S. pneumoniae'nın Geleneksel Tanı Yöntemleri	5
2.4.1. Optokin Testi	5
2.4.2. Safra Çözünürlüğü	5
2.4.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi	6
2.4.4. ELISA Testi (Hızlı Tanı Kitleri)	6
2.4.5. Kültür Yöntemi	6
2.5. Aptamer İle Tanı	7
2.5.1. Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması	8
2.5.2. Aptamerlerin SELEX Yöntemiyle Seçimleri	9
2.5.3. Aptamerler İle İlgili Yapılan Çalışmalar	10
2.6. Tezin Amacı	24
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Metot	27
3.2.1. Aptamer Kütüphanesinin, Bakterilerin ve Tüplerin Hazırlanması	27

3.2.2. Aptamer Seçim Deneyleri (SELEX İşlemi)	29
3.2.3. Ligasyon, Klonlama, Transformasyon ve Dizi Analizi İşlemi	34
3.2.4. Bağlanma Deneyleri (Akış Sitometri Deneyleri)	36
4. SONUÇLAR	38
4.1. Bakteriler	38
4.2. Aptamer Kütüphanesi Oluşturulması ve Seçim Deneyleri	39
4.2.1. Aptamer Kütüphanesi Oluşturulması	39
4.2.2. Seçim (SELEX) Deneyleri	40
4.3. Ligasyon, Klonlama, Transformasyon ve Dizi Analizi	49
4.3.1. Ligasyon, Klonlama ve Transformasyon	49
4.3.2. Dizi Analizi	49
4.4. Aptamerlerin İkincil (Sekonder) Yapıları	50
4.5. Bağlanma Deneyleri (Akış Sitometri Deneyleri)	52
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar Kısaltmalar

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAM	: Fluorescein amidite
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RNA	: Ribonükleik Asit
SELEX	: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Aptamerlerin genel görüntüsü.	8
2.2: SELEX kullanarak hedefe özgü aptamerlerin in vitro seçimi.	10
2.3: Yüzeye tutundurulmuş aptamerler ile hedefin saptanması.	13
2.4: Thrombin-aptamer kompleksi bileşenleri ve sistemin genel görünümü.	15
2.5: Thrombin-aptamer kompleksinin mekanizması.	15
2.6: Prionlara karşı gerçekleştirilen aptamer seçim işlemi.	16
2.7: Proteinlere karşı gerçekleştirilen farklı seçim yöntemleri.	18
2.8: Gümüş nano parçacık tabanlı aptasensörün yapılışı ve işleyişi.	20
2.9: RNA aptameriyle B ₁₂ vitamininin renksel tayin mekanizması.	21
2.10: Aptamer destekli altın nano çubukların oluşturulması.	23
4.1: Optokin testi: <i>S. sanguinis</i> (solda) ve <i>S. pneumoniae</i> (sağda) bakterileri. Bakteriler % 5 koyun kanı içeren agarlı petri besiyerlerine ekilmiştir. Deney şartları Bölüm 3.2.1.2’de verilmiştir.	38
4.2: 75 bazlık aptamer kütüphanesinin PZT ile analizi sonucunda elde edilen ürünlerinin %2’lik agaroz jel görüntüsü. Pozitif (+) örnekler aptamer kütüphanesi varlığında, negatif (-) örnekler ise aptamer kütüphanesi yerine su eklenerek PZT’ye sokulan örneklerin PZT sonucu oluşan ürünlerini göstermektedir. “50bç” işaret (marker) DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.1.1’de verilmiştir.	39
4.3: Seçim (SELEX) ve karşıt-SELEX işlemlerinin şema ile gösterimi.	40
4.4: 2. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ile çoğaltılması sonucunda oluşan ürünlerinin agaroz jel (%2) görüntüsü. a) geri kazanım tüplerinin tüm hacimlerinin PZT’ye sokulmasıyla oluşan ve doğrulanmak istenen ilk 14 örnek; b) geri kazanım tüplerinin PZT ürünlerinin devamı olan 10 örnek; c) 2. seçim geri kazanım tüplerinin PZT ürünlerinden son 8 örnek. “50bç” işaret (marker) DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.	42

- 4.5: 2. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan (asimetrik) PZT ürünlerinin agaroz jel (%2) görüntüsü. Pozitif (+) örnek, doğrulanmak istenen DNA'nın PZT karışımına eklenip PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürünü göstermektedir. "50bç" işaret (marker) DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2'de verilmiştir. 43
- 4.6: Tek primer kullanılarak yapılan PZT örneklerinin agaroz jel görüntüsü. PZT reaksiyonları Kısım 3.2.2'de belirtildiği şekilde sadece ileri veya geri primer kullanılarak yapıldı. Kontrol olarak, asimetrik PZT deneylerinde kullanılan primerlerin her ikisini de (ileri primer/geri primer 10/0,1 pmol/ μ L oranında) içeren ve hiçbir primer içermeyen karışımların da PZT'si gerçekleştirildi. a) "İ+G" her iki primeri içeren, "İ" sadece ileri primer içeren, "G" sadece geri primeri içeren örnekleri gösterirken; b) "Primer Yok" her iki primeri de içermeyen örnekleri göstermektedir. "Negatif" örnekler ise kalıp DNA yerine su eklenerek PZT'ye sokulan örneklerin PZT sonucunu oluşan ürünlerini göstermektedir. "100 bç" işaret (marker) DNA'yı göstermektedir. 44
- 4.7: 4. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 4g-1 ve 4g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını gösterirken., negatif (-) örnek ise DNA yerine su eklenerek PZT'ye sokulan örneğin ürününü göstermektedir. "50bç" işaret DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2'de verilmiştir. 45
- 4.8: 4. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. Pozitif örnek (+) doğrulanmak istenen DNA'nın PZT karışımına eklenip PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü göstermektedir. "50bç" işaret DNA'yı göstermektedir. 46

4.9:	6. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 6g-1 ve 6g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir. “50bç” işaret DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.	46
4.10:	6. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. Pozitif (+) örnek doğrulanmak istenen DNA’nın PZT karışımına eklenip PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürününü göstermektedir. “50bç” işaret DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.	47
4.11:	8. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 8g-1 ve 8g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir. Pozitif (+) örnekler, ticari olarak satın alınmış, büyüklüğü 75 baz olarak bilinen aptamerin PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürünleri, negatif (-) örnekler ise DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürünleri göstermektedir. “50bç” işaret DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.	48
4.12:	Aptamer A1, A83, B13, B40’ın Mfold programı ile elde edilen tahmini ikincil (sekonder) yapıları.	51
4.13:	FAM-işaretli aptamer B40’ın <i>S. pneumoniae</i> bakterisine bağlanma deneylerinden elde edilen akış sitometri analiz sonuçları. Aptamer B40’ın konsantrasyonları grafikte verilen değerlerde kullanılmıştır. Bakteri miktarı sabit (3×10^8 CFU) tutulmuştur. Diğer şartlar Kısım 3.2.4.1’de verilmiştir. Y eksen (count) bakteri sayısını, X eksen floresans şiddetini göstermektedir.	52
4.14:	Aptamer B40’ın <i>S. pneumoniae</i> bakterisine bağlanma eğrisi. Akış sitomeri analiz sonuçlarından elde edilen veriler Hill denkleminde nonlineer fit edilerek bu eğri elde edildi. “Fitting” sonuçları grafik içinde verilmiştir.	53

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Seçim işlemlerinde kullanılan PZT'nin koşulları.	30
3.2: Tek örneğin PZT'si için gereken bileşen miktarları.	30
3.3: Tek örneğin eş olmayan PZT'si için gereken bileşen miktarları.	31
3.4: Seçim işlemlerinde kullanılan eş olmayan PZT'nin koşulları.	31
3.5: Tek örneğin etanol saflaştırması için gereken bileşen miktarları.	31
3.6: Ligasyon işlemi öncesinde yapılan PZT'nin koşulları.	33
3.7: Ligasyon işlemi öncesinde yapılan PZT'de tek örnek için gereken bileşenler.	34
3.8: Tek örneğin ligasyonu için gereken bileşen miktarları.	34
3.9: Koloni tarama PZT'sinde tek örnek için gereken bileşen miktarları.	35
3.10: Koloni taraması aşamasında kullanılan PZT'nin koşulları.	36
4.1: SELEX ve Karşıt-SELEX işlemleri sonucunda elde edilen aptamerlerin DNA dizinleri.	49
4.2: Aptamer A1, A83, B13, B40'ın Mfold programı ile elde edilen tahmini ikincil yapılarının T_m ve termodinamik değerleri.	51

1. GİRİŞ

S. pneumoniae, *Streptococcus* (Streptokok) cinsi içinde yer alan, kan zehirlenmesi (septicaemia), menenjit, zatürre ve bazı üst solunum yolları rahatsızlıklarına sebebiyet veren patojen bir bakteridir [Kaijalainen, 2006]. Gram pozitif ve diplokoktur. Spor oluşturmazlar ve hareketsizdirler. Üst solunum yolunun doğal florasında bulunurlar [Bozkaya, 2005]. Yapısal ayırt edici özelliklerinden en belirginini kapsülleridir. Hastalığa neden olan bütün soylarında yüzey kapsülleri bulunmaktadır [Ryan et al., 2004].

Pnömonoksik hastalıkların etki ettiği yaş grupları ve toplumlar duruma göre farklılık gösterebilmektedir. Zatürreye sebep olan *S. pneumoniae* ölümcüllük oranıyla ilk sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, her yıl 1 milyon çocuk bu nedenle yaşamını yitirmektedir. Gelişmiş olan ülkelerde de salgınlar yüzünden, özellikle çocuk ve yaşlılarda da zatürreye sık rastlanılmaktadır [Kaijalainen, 2006].

Zatürrenin başlangıç belirtileri ateş ve titremedir. Daha sonrasında hastanın akciğerlerinde belirtiler görülmeye başlanmaktadır. Bu belirtilerin en belirginleri nefes darlığı ve iltihaplı balgam öksürüğüdür. Bazen hasta kan da öksürebilir. Zatürrede hastanın akciğerinin belli bir kısmı ya da tamamı iltihaplı hücreler ile kaplanır. Bu aşamadan sonra bakteri kana karışarak diğer organlara ya da vücut sistemlerine yayılabilir. Bunlardan en dikkat çeken merkezi sinir sistemine yayılanıdır. Bu yayılım sonucu hasta şiddetli menenjit hastalığına yakalanmaktadır. Çabuk tedavi edilmediği takdirde hastanın ölümü gerçekleşmektedir [Ryan et al., 2004].

S. pneumoniae'nin tanısında; kültür yöntemi, optokin testi, polimeraz zincir tepkimesi (PZT), safrada çözünürlük gibi metotlar kullanılmaktadır. Ayrıca genotip belirleme metotları da vardır. Bu metotların çoğunda sonuç için 1-2 gün kadar beklemek gerekmektedir [Kaijalainen, 2006]. ELISA (hızlı tanı kitleri) gibi metotlarla da *S. pneumoniae*'nin tanısı koyulabilmektedir. Üstelik sonuçlar hızlı alınabilmektedir. Fakat bu kitlerin sonuç keskinlikleri düşüktür. Çünkü özellikle yalancı pozitif ve negatif sonuçların çıkma olasılıkları yüksektir. Çıkan sonuçların diğer bir yöntemle, özellikle kültür yöntemiyle test edilmesi gerekmektedir [Armengol et al., 2004].

Son yıllarda bilim dünyasında belirli hedeflere özgü, tek zincirli oligonükleotidlerin kullanımı sıklaşmıştır. DNA ya da RNA yapısında olan bu oligonükleotidlere “aptamer” denilmiştir. “Apt” Latince uygun, uyan anlamında olup hedefe özgünlüğü belirtir. Aptamerlerin kullanımı özellikle antikorların kullanımına oranla çok daha cazip hâle gelmiştir. Çünkü elde edilmeleri kolaydır ve vücutta antijen oluşumuna sebep olmazlar.

Aptamerlerin hedef ağı çok geniştir. Proteinlere, bakterilere, çeşitli organik moleküller vb. gibi hedeflere karşı seçilmiş çok sayıda aptamer vardır [Derbyshire et al., 2012], [Cao et al., 2009], [Ogasawara et al., 2007].

Literatürde *S. pneumoniae*’ya karşı seçilmiş bir aptamer henüz bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, *S. pneumoniae*’ya karşı aptamer seçim çalışmaları yapılmıştır. Seçilen aptamerin daha özgün olması amacıyla karşıt seçim olarak Viridans grubu streptokokların bir üyesi olan *S. sanguinis* kullanılmıştır. Böylece *S. pneumoniae*’ya karşı seçilen ilk aptamer ya da aptamerler ile literatürdeki boşluk doldurulmuş olunacaktır. Ayrıca ileride yapılacak olan ilaç çalışmalarında da bu çalışma sonunda seçilen aptamer ya da aptamerler kullanılabilir. Böylece dünya çapında birçok kişinin ölümüne yol açan bir bakterinin çok hızlı ve yüksek keskinlikle tanınması ve hatta hastalığın gelişmesi engellenerek hem yaşamını yitiren insan sayısının azaltılması hem de ekonomik tasarruf hedeflenmektedir.

2. KONUYLA İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Streptokoklar

Streptococcus cinsi *Streptococcaceae* ailesi içinde yer alır. Bu ailede *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* gibi cinsler de yer almaktadır. *Streptococcus* cinsleri farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduklarından dolayı (farklı pH'lara sahip besiyerlerinde üreyebilme vb. gibi) Piyojen streptokoklar, Laktik streptokoklar, Enterokoklar ve Viridans streptokoklar olmak üzere gruplara ayrılmıştır. *Streptococcus* cinsleri gram pozitif ve katalaz negatiflerdir [Bozkaya, 2005].

Streptokoklar 1874 yılında Billroth tarafından tarif edilmiştir. Pasteur 1879 yılında bir hasta kanında benzer mikroorganizmalara rastlamıştır. 1883 yılında Fehleisen saf kültürü elde ederken, 1884 yılında Rosenbach *S. pyogenes* adını kullanmıştır. 1933 yılında Lancefield streptokokların beta hemolitik olanlarını serolojik olarak sınıflandırmıştır [Bozkaya, 2005].

Streptokoklar genel olarak 0,5-2,0 µm çapında zincir veya tesbih taneleri şeklinde dizilmişlerdir. Sporsuz ve hareketsizdirler. Bazıları, özellikle hastalığa sebebiyet verenleri kapsül bulundurmaktadır. Zengin besiyerinde, %5-10 CO₂ içeren ortamda ve 37°C'de iyi ürerler. Genellikle fakültatif anaerob olan bu bakterilerin bazıları zorunlu anaerobtur. Kanlı agarda alfa, beta ve gama olmak üzere 3 farklı şekilde hemoliz yapabilirler. Alfa hemolizde kan hücreleri kısmi parçalanırken, beta hemolizde kan hücreleri tamamiyle parçalanır. Gama hemolizde ise kan hücreleri parçalanmaz [Bozkaya, 2005].

2.2. Streptococcus Pneumoniae

S. pneumoniae insanda zatürreye sebep olan bakteridir. İlk başlarda *Diplococcus pneumoniae* olarak bilinmekteydi [Bozkaya, 2005]. Fakat sonradan *Streptococcus* cinsine geçirilmiştir. 0,5-1,0 µm büyüklüğe sahip; spor oluşturmeyen, hareketsiz, gram pozitif ve diplokok olan bu türler, üst solunum yolunun doğal florasında bulunmaktadır. Hücre duvarları yapısı peptidoglikan ve teikoik asit

içermektedir. Peptidoglikanın yapısı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşurken, teikoik asitin yapısında galaktozamin fosfat ve kolin bulunmaktadır [Bozkaya, 2005]. Yapısal ayırt edici özelliklerinden en belirginini kapsülleridir. Hastalığa neden olan bütün soylarında yüzey kapsülleri bulunmaktadır [Ryan et al., 2004].

Zengin besiyerinde ürerler. Kanlı agarda 16-18 saat içinde alfa hemoliz yapmış kolonileri rahatlıkla görülmektedir. Oksijenli ortamda ve kanlı olmayan ortamda ürediklerinde H_2O_2 (hidrojen peroksit) açığa çıkarmaları ve H_2O_2 'in de zehirleyici etkiye sahip olması nedeniyle kısa sürede ölürler. Kanlı besiyerinde ürediklerinde ise kan hücreleri, açığa çıkan H_2O_2 'ti parçadıklarından bakterilerin bir süre daha canlı kalmasına katkıda bulunmaktadır. Enerjilerinin çoğunu glikozu parçalayarak sağlamakla birlikte bu işlem sonrasında açığa çıkan laktik asidin miktarındaki artış bakterilerin ölümüne yol açmaktadır [Bozkaya, 2005].

S. pneumoniae laboratuvarlarda genel olarak şu özellikleriyle tanınmaktadır: Alfa hemoliz yaparlar, katalaz negatiftirler, safra tuzlarında erirler ve optokine (etil-hidroakuprein) karşı duyarlıdırlar [Bozkaya, 2005].

2.3. Viridans Streptokokları

İnsan ve hayvanların üst solunum yollarında yoğun olarak bulunan ortakçı bakteri grubudur. Dolayısıyla oksijenli ortamın baskın bakterileridir. Fakat vücudun diğer bölgelerine ulaştıklarında ciddi hastalıklara sebebiyet vermektedirler. Özellikle ağızda bulunan bu bakteriler, dişlerde bir sorun oluştuğunda (diş çekimi ya da çürüme gibi) kana geçerek kan yoluyla kalbe giderler. Burada çoğalıp kalp kapakçıklarının ritmini bozarak kalp krizine neden olmaktadır [Bozkaya, 2005].

Streptokokların genel özellikleri bu bakteri grubu için de geçerli sayılmaktadır. Genel olarak alfa hemoliz, çok nadiren beta hemoliz yapmaktadırlar. Bu grubun üyeleri *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. milleri*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* türleridir [Bozkaya, 2005].

Bu grubun üyeleri benzer koloni yapılarından ve alfa hemoliz yaptıklarından dolayı diğer streptokoklardan kolay kolay ayırt edilemez. Fakat bu grubun üyeleri optokine karşı dirençli olduklarından dolayı optokin testi ile *S. pneumoniae*'dan ayırt edilebilirler [Bozkaya, 2005].

2.4. *S. pneumoniae*'nin Geleneksel Tanı Yöntemleri

S. pneumoniae'nin tanısında; optokin testi, safrada çözünürlük, polimeraz zincir tepkimesi (PZT), ELISA ve kültür yöntemi gibi metotlar kullanılmaktadır. Ayrıca genotip belirleme metotları da vardır. Bu metotların birçoğunda sonuç için uzun süreler beklemek gerekmektedir [Kaijalainen, 2006].

2.4.1. Optokin Testi

1911 yılında Morgenroth ve Levy, kinin ve türevlerinin pnömokokların üstünde öldürücü etkisi olduğunu bulmuşlardır. Fakat bu tarz maddelerin pnömokok tedavilerinde zehirleyici etki oluşturduğu da gözlemlenmiştir. 1915 yılında Moore, *S. pneumoniae*'nin bir kinin türevi olan etilhidrokupreine karşı en duyarlı streptokok olduğunu gözlemlemiştir. 1943 yılında ise Morch, etilhidrokuprein hidrokloritin (optokin) düşük derişimlerini hazırlayıp kâğıda emdirmiştir ve bunu bakterilerin ekili olduğu kanlı agarda kullanıp, gerçekten de belli bir çap boyunca bakterilerin üremediğini gözlemlemiştir. Bu yöntemle birlikte *S. pneumoniae*, diğer α -hemolitik bakterilerden ayırt edilebilmiştir. Bu yöntem *S. pneumoniae*'yi saptamada safrada çözünürlüğe göre daha güvenilirdir. Çünkü kapsüllü ve hastalık yapıcı pnömokok, kapsülsüz ve hastalık yapmayan hâle döndüğünde optokine karşı duyarlılığını korurken safrada çözünürlüğünü kaybetmektedir [Kaijalainen, 2006].

Fakat son yıllarda optokine karşı dirençli *S. pneumoniae* soylarının olduğu da gözlemlenmiştir. Bu soylar aynı Viridans grubu bakterileri gibi optokine karşı dirençli olup üremelerine devam etmektedir. Böylece ortaya yalancı negatif sonuçlar çıkmaktadır [Pikis et al., 2001], [Cortes et al., 2008].

2.4.2. Safra Çözünürlüğü

1900 yılında Neufeld safranın pnömokok hücrelerini çözdüğünü gözlemlemiştir. Tanı amaçlı olarak önem arz eden bu bulgu, *S. pneumoniae*'yi diğer streptokoklardan ayırmaktadır. İlaveten Neufeld sadece taze özütlenmiş ve hastalık yapan pnömokokların çözüldüğünü bulmuştur. Levy 1907 yılında % 5 ve % 10'luk

sodyum tarokolat kullanarak pnömokokların diğer tüm bakterilerden ayırt edilebileceğini düşünmüştür [Kaijalainen, 2006].

2.4.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi

Bu metot bir gen parçasının çoğaltılarak agaroz jelde görüntülenmesi temeline dayanmaktadır. Gerçek zamanlı PZT cihazları kullanarak erime eğrileri oluşturulur ve bu sayede istenilen ürün diğer ürünlerden ayırt edilmektedir [Kaijalainen, 2006].

Pnömolisin, PZT ile pnömokok tayininde kullanılan hastalık yapıcı bir gendir. Ayrıca pnömolisin geni haricinde PZT tayininde kullanılabilecek diğer gen bölgeleri de vardır. Hastadan alınan örnek PZT'ye konulduğunda istenilen bir çoğalma gözleniyorsa, bu durum hastanın vücudunda pnömokok bakterilerinin olduğunu da gösterecektir [Kaijalainen, 2006].

2.4.4. ELISA Testi (Hızlı Tanı Kitleri)

Bu testte bakterinin hücre duvarında bir ya da birkaç bölgeyi tanıyan antikor kullanılmaktadır. Bakteri hücresi ortama konulduğunda antikorlar, 2 bölgeli bir sandviç yapısı oluşturarak bakteriye bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda test bandında meydana gelen renk değişikliği pozitif sonucu belirtmektedir. Fakat hızlı tanı kitlerinin verdiği sonucun keskinlikleri göreceli olarak düşüktür. Çünkü hastadan alınan örneğin içinde bulunan başka etmenler ortaya yalancı pozitif ya da yalancı negatif sonuç çıkmasına neden olabilir. Bu yüzden hızlı tanı kitlerinden elde edilen sonuçların diğer tanı yöntemleriyle de doğrulanması gerekmektedir [Armengol et al., 2004].

2.4.5. Kültür Yöntemi

Bu yöntemde bakteriler besiyerine ekilir. Ekilen bakterinin cinsine göre bekleme süresi vardır. *S. pneumoniae* için bu bekleme süresi 16-18 saat kadardır. Besiyerinin zengin olması gerekmektedir. *S. pneumoniae*'nin tayininde özellikle kanlı agar kullanılmaktadır. Çünkü bakteriler büyürken kan hücrelerini kısmi olarak

parçalayarak yeşil renk oluşturmaktadırlar (α -hemoliz). Bu yöntemden çıkacak sonuçlar tam kesin değildir. Çünkü diğer α -hemoliz yapan streptokoklar yüzünden yalancı pozitif sonuç ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle optokin testi gibi diğer yöntemlerle sonuçlar doğrulanmalıdır [Bozkaya, 2005], [Armengol et al., 2004].

2.5. Aptamer İle Tanı

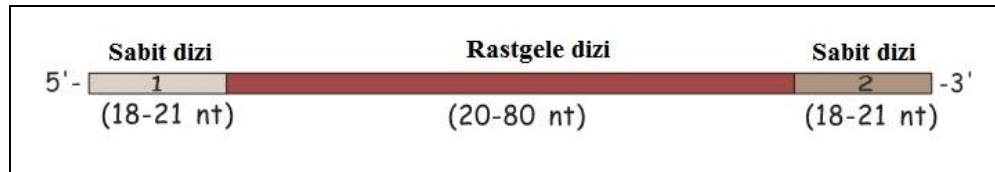
Belirli hedeflere özgü ve sadece onları tanıyabilen, yapay olarak oluşturulmuş, tek zincirli DNA ya da RNA yapısında olan kısa oligonükleotidlere “aptamer” denir. “Apt” Latince “aptus” kelimesinden gelen uygun, uyan anlamına gelmektedir. Aptamerler genel olarak 100 veya 100 nükleotitden küçüktür. Çok farklı moleküllere karşı aptamer seçimi gerçekleştirilebilir. Bunun için hedef molekülün tam yapısını bilmeye gerek yoktur. Çünkü aptamer seçiminin başında oluşturulan aptamer kütüphanesi birbirinden farklı olmak üzere 10^{13} - 10^{15} tane tek zincirli ve birbirinden farklı aptamer içerir. Seçimin ilerlemesiyle birlikte hedefe özgün olarak bağlanan aptamerler ortamda bulunurken bağlanmayanlar elenecektir. Bu özgün bağlanma ise oligonükleotidlerin ikincil ve üçüncül yapılarıyla açıklanmaktadır. Her aptamer birbirinden farklı olduğu için ortaya çıkan farklı ikincil ve üçüncül yapılar aptamerlerin hedef ağına neden çok geniş olduğunu da bir nevi açıklamaktadır [Mascini, 2009].

Aptamerlerin kısa olması ve her birinin birbirinden farklı olması, onların 3 boyutlu yapılarının da farklı olmasını sağlamaktadır. Bu 3 boyutlu yapılarından dolayı, aptamerler ilgili hedefe çok yüksek özgünlükte bağlanmaktadır. Bu özgünlük K_d (ayırışma sabiti) değerlerinin nanomolar ve pikomolar seviyesinde olmasından da anlaşılabilmektedir [Hamula et al., 2008], [Duan et al., 2012]. Aptamerler bu yönüyle antikorlara benzemektedir. Fakat antikorlara karşı çok daha üstün tarafları vardır. Öncelikle aptamerler yapay olarak sentezlendikleri ve canlı dışında izlenebildikleri için her hangi bir hedefe karşı seçilebilirler. Bu da antikor oluşturmak için gerekli hücre ya da hayvan gereksinimini ortadan kaldırır. İkinci olarak, aptamerler bir kere seçildikten sonra PZT ile çoğaltılarak yüksek oranda ve yüksek saflıkta elde edilebilmektedir. Üçüncü olarak, aptamerler basit kimyasal yapıya sahip olduklarından dolayı kolayca değiştirilebilir yapıya sahiplerdir. Amaca uygun olacak şekilde aptamerlere fonksiyonel gruplar eklenebilmektedir. Son olarak,

aptamerler antikorlara göre daha fazla kararlıdır. Bu da zorlu koşullarda (yüksek sıcaklık, uç pH değerleri vb.) uygulama gerektiren durumlarda onları ideal aday konumuna yükseltmektedir [Iliuk et al., 2011].

2.5.1. Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması

Aptamer seçim işlemine geçmeden önce aptamer kütüphanesinin hazırlanması gerekmektedir. Kütüphanenin hazırlık aşamasında yapılanlar şunlardır: Aptamerlerin başında ve sonunda dizisi bilinen (sabit) bölgeler yani primer bölgeleri tasarlanmaktadır. Bu bölgeler sayesinde aptamerlerin PZT ile çoğaltılması mümkün olmaktadır. Bu iki primer bölgesinin arası ise dizisi bilinmeyen bölge, yani kütüphane sentezlenirken eklenen nükleotidlerin sırasının bilinmediği “rastgele dizi” bölgesidir. Bu rastgele bölge, eş hacimlerde birleştirilmiş olan A, T, C, G nükleotitlerinin bulunduğu şişe kullanılarak oluşturulmaktadır. Bu bölgenin uzunluğu 20-80 nükleotid olarak değişmektedir. Aptamerin her hedefe karşı farklı özgünlüğünü sağlayan asıl bölge burasıdır [Mascini, 2009]. Şekil 2.1'de aptamerlerin genel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.1: Aptamerlerin genel görüntüsü.

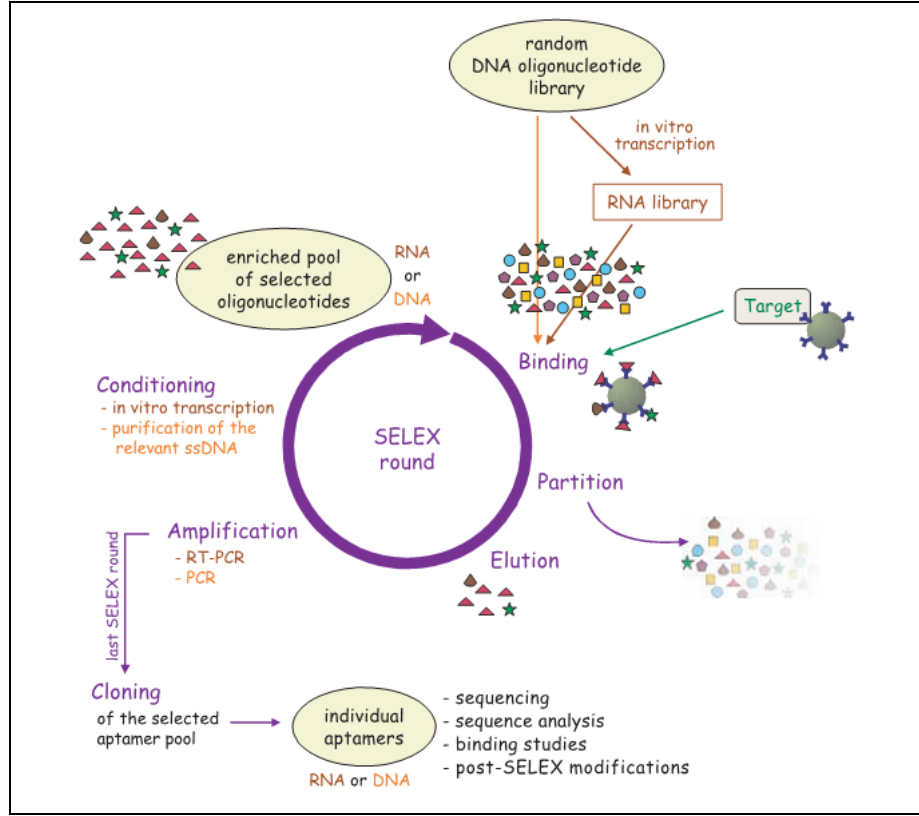
Böylece iki primer bölgesinin arasında kalan, dizisi bilinmeyen rastgele bölge sayesinde birbirinden tamamıyla farklı 10^{13} - 10^{15} dolayında tek zincirli DNA kütüphanesi oluşturulur. Eğer RNA aptameri seçim işleminde kullanılacaksa yapay olarak oluşturulan aptamerlerin 5' ucuna T7 promotör dizisini de içeren primer bölgesi koymak gerekir [Mascini, 2009].

2.5.2. Aptamerlerin SELEX Yöntemiyle Seçimleri

SELEX, “Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment” anlamına gelmektedir [Ellington and Szostak, 1990], [Tuerk and Gold, 1990]. *In vitro* olarak yapılan bu yöntemin işleyişi aşağıdaki gibidir:

Yapay olarak elde edilmiş olan ve yaklaşık 10^{13} - 10^{15} tane tek zincirli DNA içeren kütüphane belli tamponların içinde belirlenmiş hedefle (bakteri, hücre, protein vb.) buluşturulur ve belli bir süre etkileşime bırakılır. Sonra bağlanan aptamerler ile bağlanmayanları ayırmak için bir kaç defa yıkama işlemi yapılır. Böylece hem en başından beri hedefe bağlanmamış olan aptamerler ayrılırken hem de hedefe zayıf bağlanan aptamerler de ortamdan ayrılmış olur. Bu bağlanmayan hedeflerin ortamdan uzaklaştırılması aptamer seçim işleminin en kritik noktasıdır. Çünkü bu aptamerlerin ortamda bulunması bağlanan aptamerlerin de bağlanmasına etki edecektir. Bağlanmayan aptamerlerin ortamdan uzaklaştırılması için yatkınlık (affinity) kromatografisi, manyetik ayırma, filtreleme ya da santrifüjleme yöntemleri kullanılabilir. Daha sonra hedefe bağlanan aptamerler özel çözeltiler, ısı ya da su ile geri kazanılır ve PZT ile çoğaltılır. Böylece SELEX işleminin ilk döngüsü tamamlanmış olur. PZT ile çoğaltılan DNA’lar artık çift zincirlidir. Bunları bir sonraki seçimde kullanmak için tekrardan tek zincirli hâle getirmek gerekmektedir. Tek zincirli hâle getirilen aptamerler ile SELEX işleminin ikinci döngüsüne başlanır. Her döngü sırasında şartlar zorlaştırılarak (yıkama sayısının artması, hedef ile aptamerin buluşma süresinin kısaltılması vb.) en özgün aptamerin seçimi hedeflenmiş olur. Duruma göre 6-20 arası SELEX döngüsü özgün aptamer seçimi için yeterlidir [Mascini, 2009].

RNA aptameri kullanılacaksa SELEX döngüsünde dikkat edilmesi gereken yerler vardır. SELEX’e başlamadan önce T7 promotör bölgesi içeren primer kısmına T7 RNA polimeraz bağlanarak kütüphaneyi RNA kütüphanesi yapmak gerekmektedir. Bu şekilde SELEX döngülerine başlanır. Her döngü sonunda ise PZT ile oluşturulmuş olan çift zincirli DNA’lar transkripsiyon yoluyla tekrardan RNA’ya dönüştürülür ve bir sonraki döngüye bu RNA aptamerleri ile devam edilir [Ellington and Szostak, 1990], [Tuerk and Gold, 1990], [Mascini, 2009]. Şekil 2.2’de SELEX işleminin genel işleyişi verilmiştir.



Şekil 2.2: SELEX kullanarak hedefe özgü aptamerlerin in vitro seçimi.

2.5.3. Aptamerler İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda aptamerler ile ilgili yapılan çalışmalar sürekli artmaktadır. Özellikle son 10 yıldır aptamerlerin farklı uygulamaları bilim dünyasına yeni bakış açıları getirmiştir [Iliuk et al., 2011]. Bu kısımda bugüne kadar yapılmış çalışmalardan bazıları irdelenecektir.

Aptamerlerin hedef ağı çok geniş olsa da yapılan birçok çalışma bakterileri hedef olarak belirlemiştir. Bu çalışmalarda genel amaç bakterinin hızlı bir şekilde tanınmasıdır. Bunun yanında bu bakterilere karşı seçilen aptamerler kullanılarak yapılan medikal cihazlar ya da sentezlenen ilaçlar ile ortaya çıkan hastalıkların hem erken teşhisi yapıp ölümlerin önüne geçilecektir hem de zaman ve para kaybını azaltmak mümkün olacaktır.

Yapılan bir çalışmada dünyada hâlâ büyük bir sorun oluşturan ve verem hastalığına neden olan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)'e karşı aptamer seçilmiştir. Çünkü çoklu ilaçlara karşı tüberküloz bakterisi dirençli hâle gelmiştir ve

bu da tüberkülozün kontrolünü zorlaştırmıştır. Gittikçe artan dirençli MTB, HIV virüsü ile birlikte insanda hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüzden MTB'ye karşı geliştirilecek olan yeni ilaçlara ihtiyaç doğmuştur. Ayrıca bu ilaçların diğer mikobakteri ajanlarıyla tepkimeye de girmemesi gerekmektedir. Yeni mikobakteri ilacı bulmak amacıyla MTB'ye karşı aptamer seçimine gidilmiştir. Bu çalışmada tüm bakteri hücresi hedef olarak kullanılmıştır. Böylece seçilen aptamer bakterinin dış yüzeyinde bulunan yüzey proteinleri ile etkileşerek o bölgeyi kapatmıştır ve bakteri sayısında düşüşe neden olmuştur. Aptamerlerin yüzey proteinlerine bağlanması şu şekilde kanıtlanmıştır: Bakteri tripsin ve proteinaz K ile etkileştirilmiştir. Sonra seçilen aptamer ortama konmuştur fakat hiçbir bağlanma gözlenmemiştir. Ayrıca bu çalışmada SELEX aşamasında karşıt seçim olarak *Mycobacterium bovis* kullanılarak seçilen aptamerin özgünlüğü arttırılmıştır. Çünkü böylece karşıt hedefe bağlanan aptamerler ortamdan uzaklaştırılmıştır [Chen et al., 2007].

Staphylococcus aureus'a karşı yapılan aptamer seçimi de diğer bir “tüm hücreye karşı” seçime örnektir. *S. aureus* birçok hastalığa neden patojen bir bakteridir. Bakterinin de hızlı tayini bu yüzden çok önemlidir. Yapılan çalışmada karşıt seçim olarak *Streptococcus* ve *Staphylococcus epidermidis* kullanılarak hedef bakteriye karşı seçilmiş olan aptamerlerin özgünlükleri arttırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen 5 aptamer aynı anda kullanılarak tanı yapılmıştır. Bu aptamerlerin tek tek kullanılması ile 5 tanesinin aynı anda kullanılması sonuçları karşılaştırılmış ve aptamerlerin aynı anda kullanımıyla, hedefin diğer bakterilere nazaran daha net bir biçimde yakalanması gözlemlenmiştir. Ayrıca tek bir aptamerin kullanılmasının yalancı pozitif bir sonuç verebileceği vurgulanmıştır. 5 aptamerin bir arada kullanılmasıyla bu sorunun ortadan kalktığı belirtilmiştir. Çünkü farklı aptamerler bakterinin farklı bölgelerini tanımakta ve birbirinin bağlanmasına etki etmemektedir [Cao et al., 2009].

Campylobacter jejuni'ye karşı aptamer seçimi de “tüm hücreye karşı” seçime örnektir. Bu bakterinin tanısı için kullanılan diğer yöntemler hem çapraz tepkime verdiklerinden hem de pahalı ve uzun sürmesinden dolayı, hızlı ve keskin tanı için aptamer seçimine gidilmiştir. Daha önce *C. jejuni*'nin saflaştırılmış zar proteinine karşı aptamer seçilmiştir. Fakat bu durumun gerçek ortamı temsil etmediği de düşünülmektedir. Bu çalışmada tüm bakteriyi alıp aptamerle buluşturmak doğal bir ortam sağlamıştır, böylece daha gerçekçi bir ortamda aptamerlerin seçimi

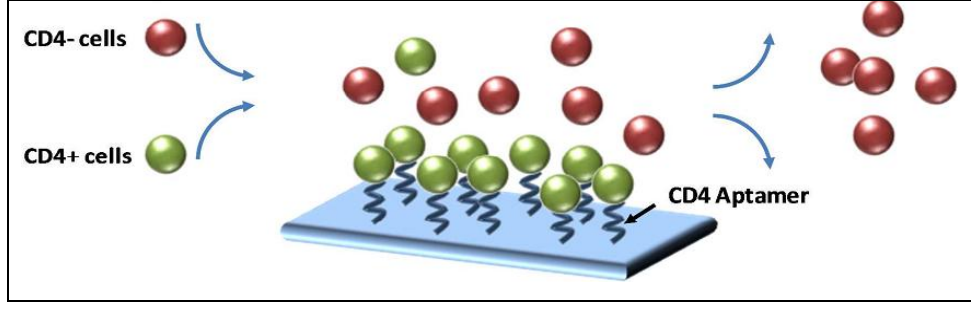
sağlanmıştır. Kullanılan aptamerler ise FAM işaretlidir. Bu çalışmada seçilen aptamerin diğer *C. jejuni* soylarını tanıdığı da bulunmuştur. Bu da soylar farklı olsa bile dış yüzeydeki bazı proteinlerin aynı olduğunu göstermiştir [Dwivedi et al., 2010].

Diğer bütün bakteri hücrelerine karşı seçilen aptamerlere örnek olarak *Shigella sonnei* [Masoudipour et al., 2011], *Streptococcus pyogenes* [Hamula et al., 2011], *Lactobacillus acidophilus* [Hamula et al., 2008] ve *Vibrio parahemolyticus* [Duan et al., 2012] verilebilir.

Bakteriler dışında diğer patojenik mikroorganizmalara karşı aptamer seçimleri de bulunmaktadır. Tek hücreli canlılardan (protozoalar) *Trypanosoma brucei*'ye karşı RNA aptamerleri seçilmiştir. HIV, SARS, hepatit C hastalıklarını ortaya çıkartan virüslere karşı da aptamer seçimi gerçekleştirilmiştir [Xian et al., 2012].

Patojen olmayan hedeflere karşı da aptamer seçimi yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada aptamerler, farklılaşmış PC12 hücrelerine karşı bağlanırken, normal PC12 hücrelerine bağlanmamaktadır. Bu da farklılaşmış hücreler için, örneğin kanser hücrelerinin basit ve hızlı tanısı için önemli gelişmelerdendir. Bu aptamer seçiminde normal PC12 hücreleri karşıt seçim için kullanılmış ve ona bağlananlar ayrılmıştır. Geriye kalan kütüphane ile farklılaşmış PC12 hücrelerine karşı seçim yapılmıştır [Wang et al., 2002].

Diğer bir bütün hücre çalışması CD4+ hücreleri için yapılmıştır. CD4+ hücreleri bağışıklık sisteminde çok önemli yer tutan hücrelerdir. Yeni üretilen lenfotik hücreleri ve sitokin üretimini denetlemektedir. Bu hücrelerin azlığı bağışıklık sisteminin zayıflamasına, alerjik hastalıkların ve AIDS hastalığının ortaya çıkmasına neden olur. Bu çalışmada aptamer temelli yüzeyler kullanarak CD4+ hücrelerini saptamıştır. Üstelik bu saptama anikorla saptama yönteminden daha iyi sonuç vermiştir [Zhou et al., 2012].



Şekil 2.3: Yüzeye tutundurulmuş aptamerler ile hedefin saptanması.

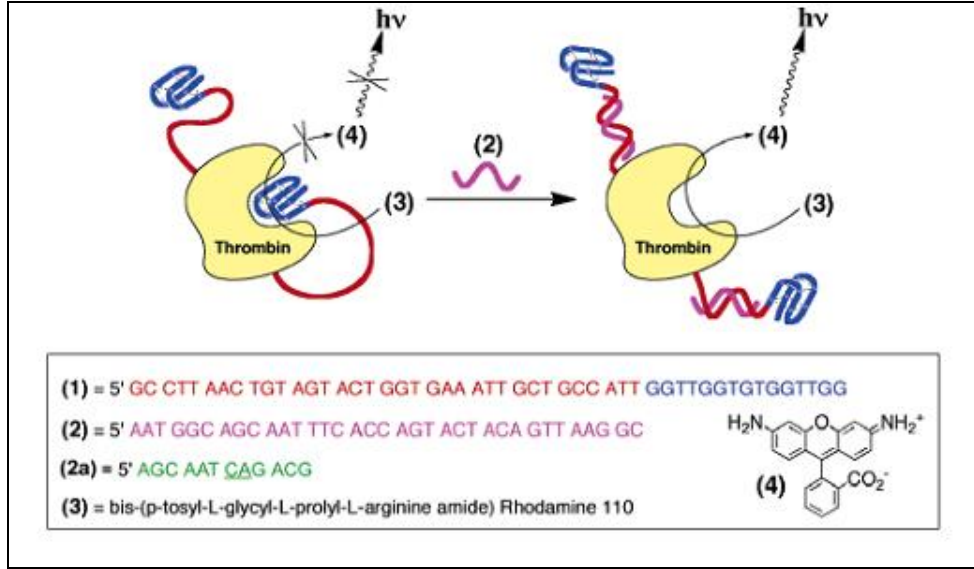
Bir diğer farklı çalışmada *Bacillus anthracis* sporlarına karşı aptamer seçimi yapılmıştır. Bu sporların daha önceden yüksek bağlanma yatkınlığı olan “antisera” antikorları ile tayin edildiği belirtilmiştir. Fakat bu antikorların yapımı için hem bağışıklık kazanan hayvan hem de zaman gerekmektedir. Bu bakteri biyolojik silahlarda kullanıldığından, büyük tehlike içerdiğinden ve hızlı bir şekilde sonuç alınabilmek istenmesinden dolayı bu çalışma yapılmıştır. Çalışmada otoklavlanmış sporlara karşı aptamer seçimine gidilmiştir. Seçilen aptamerin ve sporların tayini için aptamer-manyetik boncuk elektrokemiluminesans (AM-ECL) yöntemi kullanılmıştır. Böylece bu sporlara karşı seçilen aptamerler kullanılarak çabuk teşhisi çok önem gerektiren bir alanda çalışma yapılmıştır [Bruno and Kiel, 1999].

Bir başka çalışmada ise bir pestisit olan Acetamiprid’e karşı aptamer seçimi yapılmıştır. Pestisitler gıdaların güvenliğini, insan sağlığını ve çevre kirliliğini tehdit eden kimyasallardır. Özellikle insanların hastalanmalarını engellemek için hızlı bir şekilde tayin edilmeleri önemlidir. Pestisit tayini için antikor sistemlerinin uzun süredir kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Fakat zorlu koşulların, küçük moleküllere karşı antikor oluşturma ve antikorların kararsızlıklarının getirdiği olumsuz durumlar olması sebebiyle antikor ile tanı yönteminin geniş çaplı uygulanamadığından bahsedilmiştir. Tüm bunları aşmak için aptamer seçimi yapılmıştır. Aptamer seçiminde bağlananların bağlanmayanlardan ayrılması, seçim işleminin en önemli aşamasıdır. Bu amaçla kendisine karşı aptamer seçilecek hedeflerin, çeşitli matrikslere ya da manyetik boncuklara tutturulduğu belirtilmiştir. Fakat buradaki hedef molekül küçük olduğu için bunun mümkün olmadığı da açıklanmıştır. Bu yüzden bu çalışmada özel bir aptamer tasarımına gidilmiştir. Aptamerler başlangıçta tasarlanırken rastgele bölge içinde belli bir bölge sabit tutulmuştur. Bu sabit tutulan bölge biyotinli oligonükleotid tutucusunun eşleniği

olacak şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca aptamerler FAM ile işaretlenmişlerdir. Böylece oluşturulan aptamer kütüphanesi avidin kaplı yüzeylere tutturulmuştur ve hedef molekül olan acetamiprid ile etkileştirilmiştir. Böylece hem kritik olan ayırma işlemi başarıyla gerçekleştirilmiş hem de floresans ölçümleriyle bağlanmanın gerçekleşip gerçekleşmediği takip edilmiştir. Fakat böyle bir çalışmada pH, iyonik etkileşimler çok önemli olduğu için yalancı sonuçların çıkmasını engellemek amacıyla optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekliliği de vurgulanmıştır [He et al., 2011].

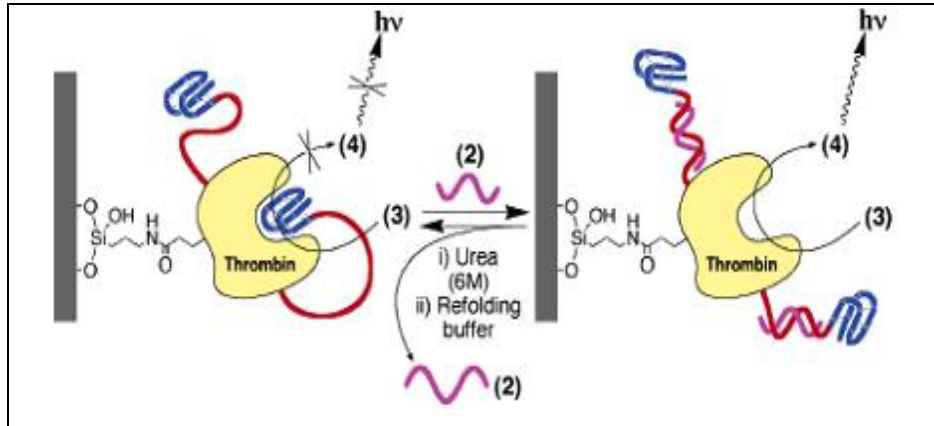
Aptamerlerin bağlandığı hedeflerin arasında proteinler de vardır. Özellikle bazı enzimatik aktivitesi olan proteinlere karşı aptamerler bağlanarak onların aktivitesini düşürebilmekte hatta bazen tamamiyle durdurabilmektedir. Yapılan bir çalışmada trombinin inhibisyonu sağlanmıştır. Trombin homeostasiste önemli yer tutan çoklu göreve sahip bir proteazdır. Kan pıhtılaşmasında fibrinojenleri hidrolizleyerek fibrin oluşumunda görev almaktadır. Normal koşullarda ise pıhtı önleyici olarak protein C'yi aktif hâle getirmede görev alır. Aptamer inhibisyonu çalışmalarında kalsiyum iyonlarının aptamer-protein kompleksine etki etmediği gözlemlenirken, magnezyum iyonlarının eksikliğinin zayıf aptamer-protein kompleksi oluşturduğu görülmüştür. Potasyum iyonlarının eksikliği ise aptamerin 3 boyutlu yapısının kararlı kalmasını sağlayamadığından K_d değerlerinde artış görülmüştür. Aptamer-trombin kompleksinin trombinin başlangıç seviyesine göre % 50 inhibisyon gösterdiği bulunmuş, artan aptamer-trombin derişiminin daha geç fibrin oluşmasına neden olduğu gözlemlenmiştir [Spiridonova et al., 2003].

Aptamerler ile yapılan diğer dikkat çekici bir çalışma ise DNA'nın floresans olarak tespitidir. Bu çalışmada trombin-aptamer kompleksi oluşturularak bir biyomoleküler makine yapılmıştır. Bu makinede aptamer trombine kovalent olarak bağlanmıştır. Bu aptamerin bir bölümü, analizi yapılacak olan DNA'nın eşleniği durumundadır. Floresans ışığa verecek olan madde ise rodamin 110'un bir türevidir.



Şekil 2.4: Thrombin-aptamer kompleksi bileşenleri ve sistemin genel görünümü.

Makine analizi yapılacak DNA ortama eklenmeden önce ilk şekilde görüldüğü gibi katalitik aktiviteye sahip değildir. Fakat DNA ortama eklendikten sonra rodamin türevi rodamine dönüştürülürken floresans ışıma vermektedir. Aynı durum biyomoleküler makinenin cam üzerine tutuklanmasıyla da denenmiş ve benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

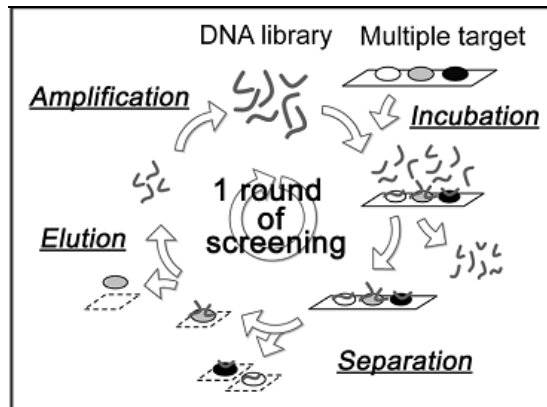


Şekil 2.5: Thrombin-aptamer kompleksinin mekanizması.

Böylece hem aptamerler kullanılarak DNA analizi yapılabilmektedir hem de biyomoleküler bir makinenin işleyişi hakkında bilgi vermiştir [Pavlov et al., 2005].

Diğer bir aptamer seçim çalışması ise prion proteinine karşı gerçekleştirilmiştir. Prion proteini (PrP), çoğunlukla memelilerin merkezi sinir

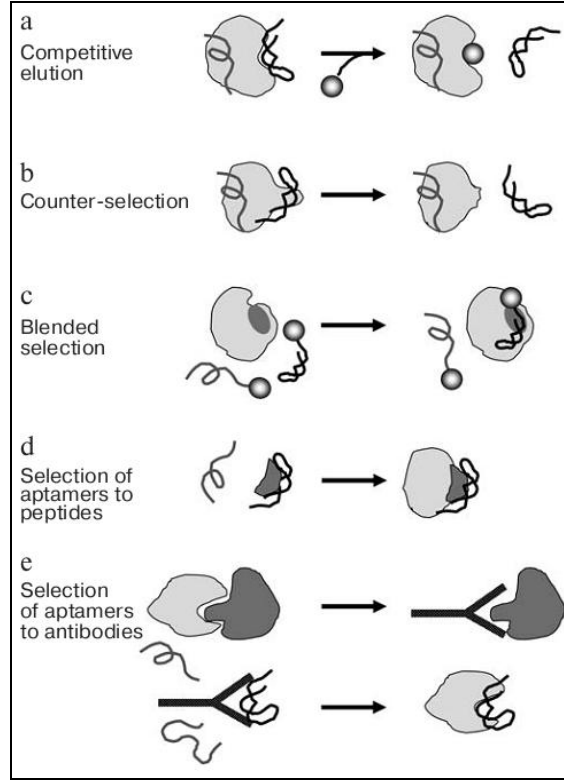
sisteminde bulunan proteindir. Fakat bu protein, normal hâlden (PrP^C) anormal hâle (PrP^{Sc}) dönüşünce hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıkların en bilinenleri deli dana hastalığı ve Creutzfeldt-Jakob hastalığıdır. PrP^C α heliks bakımından zengin iken PrP^{Sc} β katmanları bakımından zengindir ve PrP^{Sc} proteinazlara karşı dirençlidir. Ayrıca PrP^{Sc} ’ler oluşurken bir araya kümelenmekte ve amiloid fibrilleri oluşturmaktadır. Prion rahatsızlıkları için şu anda kullanılan yaygın yöntem antikor içeren tanı kitleridir. Diğer yandan aptamerin antikorlara karşı olan üstünlükleri göz önüne alındığında prionlar için de aptamer seçimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bu çalışmada öncelikle PrP^C ’nin izoformu olan α -PrP ve PrP^{Sc} ’nin izoformu olan β -PrP hazırlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada “yarışmalı SELEX” yöntemi de kullanılmıştır. Bu yöntemde bütün hedefler bir matriks üzerine tutturulmuştur. Sonra aptamer kütüphanesi hedeflerle buluşturulmuştur. Daha sonrasında asıl hedef ortamdan alınmış ve üzerine bağlanmış olan aptamerler geri kazanılıp bir sonraki SELEX döngüsünde kullanılmıştır. Bu SELEX yöntemiyle birlikte toplamda 4 döngüde aptamer ele geçmiştir. Yarışmalı SELEX yapılmak istendiği için ayrıca Zif268 adlı DNA bağlayıcı protein ve yüksek pozitif yüklü pirolokuinolin kuinon glikoz dehidrojenaz (PQQGDH) karşıt hedef olarak kullanılmıştır. Deneyler sonunda seçilen aptamerin hem α -PrP hem de β -PrP’ye bağlandığı gözlemlenirken Zif268 ve PQQGDH’ye bağlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar seçilen aptamerin prion rahatsızlıklarında kullanılabileceğini göstermiştir [Ogasawara et al., 2007].



Şekil 2.6: Prionlara karşı gerçekleştirilen aptamer seçim işlemi.

Aynı grubun bir başka çalışmasında aptamer bu kez α -sinüklein oligomerlerine karşı seçilmiştir. α -sinüklein oligomerleri Parkinson rahatsızlığına neden olan amiloidlerdir. Grup, bu çalışmasında da aynı yolu izleyerek α -sinüklein oligomerlerine karşı aptamer seçmiştir. Üstelik seçilen bu aptamerin aynı zamanda Alzheimer hastalığına sebep olan β -sinüklein oligomerlerine de bağlandığı görülmüştür. Bu da oligomerlerin aynı yapıya sahip olduğu hipotezini de desteklemektedir [Tsukakoshi et al., 2012].

Proteinlerin epitoplarına karşı aptamer seçerken farklı yöntemlere sahip olan “yönlendirilmiş seçim” yapılabilmektedir. Bunlardan ilki ve en basiti yarışmalı geri kazanım yöntemidir. Hedef bölgeye karşı seçilen aptamer, aynı bölgeyi tanıyan başka bir ligand sayesinde geri kazanılır. Diğer yöntem ise karşıt seçim yöntemidir. Burada aptamer kütüphanesi tüm proteinle etkileştirilir. Daha sonra seçilen aptamerler, asıl hedef bölgeyi içermeyen mutant bir protein ile etkileştirilir. Böylece hedef bölgeyi içermeyen proteine bağlanan aptamerler ayrılmış olur. Bir başka yöntem karışmış SELEX yöntemidir. Bu yöntemde hedef bölge ile etkileşebilen küçük molekül ağırlıklı ligand aptamer kütüphanesine katılır. Bu katılma, kovalent bağ ile ya da tamamlayıcı etkileşimler ile olabilir. Diğer yöntem ise peptitlere karşı seçimdir. Bu yöntemde aptamer ayrı bir peptide karşı seçilir. Bu peptit zaten büyük proteinde olduğu için peptitlere karşı seçilmiş aptamer ilgili hedefi de tanıyacaktır. Son olarak anti-idiotipik seçim yöntemi gelmektedir. Bu yöntemde ilk önce antikorları taklit eden moleküller oluşturulur. Sonra bunlara karşı aptamer seçimi yapılır [Kulbachinskiy, 2006].



Şekil 2.7: Proteinlere karşı gerçekleştirilen farklı seçim yöntemleri.

Enzimatik özelliklere sahip aptamerler de SELEX yöntemiyle seçilebilir. Bu aptamerler, hedef moleküle bağlandıklarında katalitik etkinlik göstermektedir. Bu tarz aptamerlere “aptazim” denilmektedir [Kulbachinskiy, 2006].

Aptamerlerin kullanılabileceği bir diğer alan ise kanser hücreleridir. Kanserli hücrelerin hızlı tanısı hem erken teşhis açısından hem de finansal açıdan çok önemlidir. Yapılan bir çalışmada lösemi hücrelerini tanıyabilen çift nano parçacıklı aptamer geliştirilmiştir. Böylece karmaşık karışımlar, hatta kanda bile kanserli hücreler tayin edilebilmiştir. Bu amaçla öncelikle lösemi hücrelerine karşı aptamer seçimi yapılmıştır. Daha sonra seçilen aptamerler kullanılarak 2 farklı nano parçacık hazırlanmıştır. Bunlardan ilki kanserli hücreleri ortamdan iyi bir şekilde ayırmaya yarayan aptamer modifiyeli manyetik nano parçacıklardır. Diğeri ise bu hücrelerin tespiti için kullanılacak olan aptamer modifiyeli floresans nano parçacıklardır. Bu floresans nano parçacıklar boya katkılı silika nano parçacıklarla hazırlanmıştır. Aptamer yoluyla hedefe bağlanan floresans nano parçacıklar, uyarılmalarıyla birlikte aynı anda floresans ışıma yaparak tek bir boya gözlemcisine (probuna) göre çok daha parlak bir sonuç vermiştir. Yapılan çalışmalar sonunda aptamer modifiyeli nano

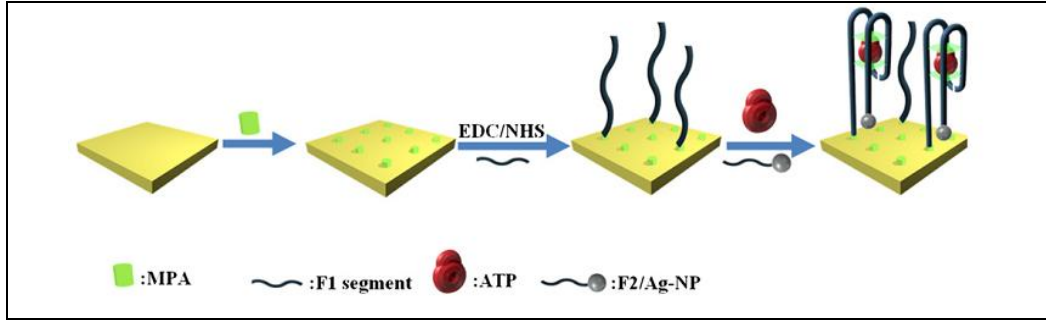
parçacıkların lösemi hücrelerine yüksek oranda bağlandıkları bulunmuştur. Aptamer modifiyeli çift parçacıklı bu tespit işleminin, diğer tanı yöntemlerine oranla çok hızlı olduğu belirtilmiştir. İmmünofenotipik ve PZT temelli analizlerin saatler aldığı bilinirken bu yeni tanı işleminin 1 saatten kısa bir sürede tamamlandığı belirtilmiştir [Herr et al., 2006].

Bir önceki çalışmayı yapan aynı grup bu sefer çoklu kanser hücrelerinin tanısı için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Burada Ramos hücreleri (Burkitt lenfoma), Toledo hücreleri (Hodgkin B hücresi lenfoma) ve lösemi hücreleri (CEM) kullanılmıştır. Çalışmanın başında hem Ramos hem de Toledo hücreleri için aptamer seçilmiştir. CEM için daha önceki seçilen aptamer kullanılmıştır. Ayrıca Ramos ve Toledo hücrelerinin tespiti için farklı renklerde boya kullanılarak floresans nano parçacıklar hazırlanmıştır. Aynı ortamda bulunan hücrelere kendi aptamerleriyle oluşturulmuş nano parçacıkların konulmasından sonra çeşitli deneyler yapılmıştır. Bu deneylerin sonucunda karmaşık ortamlarda bile çapraz tepkime vermeyen ve her sistemin kendi hücrelerini tanıdığı bir sonuç ortaya çıkmıştır. Bu sonuçların ışığında ortaya çıkan aptamer tabanlı nano parçacıkların kanserli hücreleri keskin ve hızlı bir biçimde tanınması durumu, ileride yapılacak olan daha karmaşık çalışmalar için umut verici olmaktadır [Smith et al., 2007].

Başka bir kanser hücresi çalışmasında Ramos hücrelerine karşı aptamer seçimi yapılmıştır. Seçilen aptamerlerin büyük olasılıkla hücre zarı proteinleri ile etkileştikleri düşünülmüştür [Tang et al., 2007].

Aptamerler ATP tipindeki moleküllere karşı da kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada ATP'nin elektrokimyasal olarak saptanabilmesi için aptamer bağlı gümüş nano parçacıklar (SNP) kullanılmıştır. SNP'ler redoks tepkimesi vererek elektrokimyasal aptasensör oluşumu sağlamıştır. Bu aptasensörü yaparken ATP'ye karşı seçilmiş olan aptamer 2 kısma bölünmüştür. İlk kısım amino işaretlidir. Böylelikle bu parça 3-merkaptopropiyonik asit modifiyeli altın elektrot yüzeyine karbodiimit bağıyla kovalent olarak tutturulmuştur. SNP modifiyeli 2. parça ise, ortamda ATP varlığında 1. parça ile etkileşim içine girmektedir. Bu etkileşim sandviç şeklinde gerçekleşmektedir. SNP'li parçada meydana gelen oksidasyon bir sinyal vermektedir ve bu sinyal de analitik sinyale dönüştürülerek ATP'nin saptanmasında kullanılmaktadır. Böylece uygun bir sinyal alımı ve iyi bir geri dönüş süresi elde edilmiştir. Sensör, mikromolar düzeyde ATP derişimlerini, istenilen

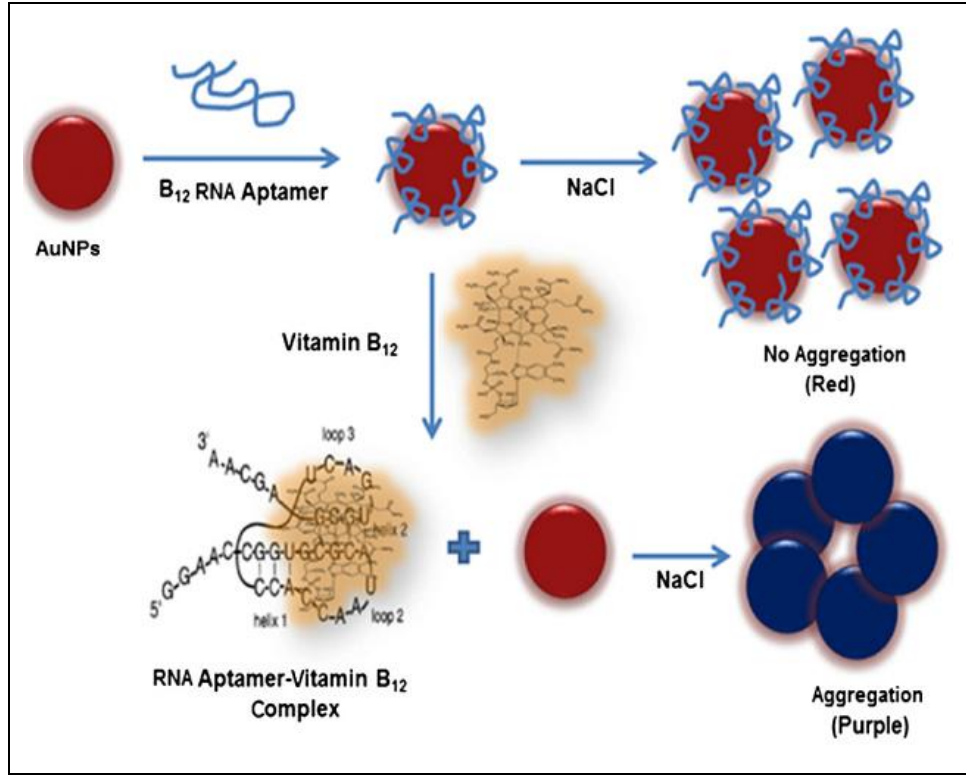
kararlılıkta ve uygun koşullarda saptayabilmektedir. Ayrıca ATP'nin analogları olan GTP, UTP ve CTP ciddi bir çapraz tepkime vermemiştir. Böylece bu sensörün, insan kan plazması gibi daha karmaşık bir sistemde kullanılabileceği savunulmuştur [Kheyraadi and Mehrgardi, 2012].



Şekil 2.8: Gümüş nano parçacık tabanlı aptasensörün yapılışı ve işleyişi.

Kendisine karşı aptamer seçilen ve saptanması için aptasensör oluşturulan diğer bir molekül B₁₂ vitaminidir. Geliştirilen aptasensör kolorimetrik temel üzerine kurulmuştur. B₁₂ ile aptamerin buluşması sonucu, oluşan renk değişimi çıplak gözle bile görülecek seviyede olduğundan hızlı tanı için büyük avantaj da sağlamaktadır. Bu aptasensör geliştirilmeden altın nano parçacıklardan (AuNP) yararlanılmıştır. Ayrıca daha önce seçilmiş olan RNA aptamerini nükleazlara karşı dayanıklı kılmak için pirimidin nükleotitlerindeki 2'-hidroksi grupları floro gruplarıyla değiştirilmiştir. Ortaya çıkan 2'-floro RNA aptamerleri nükleazlara karşı dayanıklı olmalarının yanında ayrıca normal hâle göre daha sağlam durumdadır. Çünkü içte bulunan heliksler ikincil yapıyı daha kararlı hâle getirmişlerdir. Normal RNA'lar kısa sürede bozunurken modifiyeli RNA'lar 15 saat civarı kararlı olarak kalmışlardır. Ayrıca oluşturulan bu modifiyeli RNA aptamerleri PZT için de bir sorun teşkil etmemektedir. AuNP'lerin kullanılmasının sebebi mesafeye bağlı değişen optik özelliklerinden dolayıdır. AuNP'ler çözelti içerisinde özel ve büyüklüğe bağlı yüzey plazmon rezonansından dolayı kırmızı renkte görülmektedirler. Ortama tuz katıldığında negatif yüklü AuNP'ler arasında oluşan elektrostatik itmeler ve Van der Waals etkileşimleri AuNP'lerin bir araya kümelenmesine ve rengin kırmızıdan mora kaymasına neden olur. Bütün bu özellikler göz önüne alınarak aptasensör işleyişi şu şekilde olmaktadır: Modifiye edilmiş RNA aptamerleri AuNP ile etkileştirilmiştir.

Ortama sadece tuz ilave edilmiştir. Yüzeye bağlı aptamerlerden dolayı AuNP'ler kümeleşip renk değişimi gerçekleştirememişlerdir. Fakat aynı ortama B₁₂ vitamini katıldığında Aptamerler AuNP'nin yüzeyinden ayrılarak B₁₂'ye bağlanmışlardır. Boş kalan AuNP'ler kümelenip renk değiştirmişlerdir. Böylece B₁₂ vitamininin varlığında renk değiştiren bir sistem elde edilmiştir [Selvakumar and Thakur, 2012].



Şekil 2.9: RNA aptameriyle B₁₂ vitamininin renksel tayin mekanizması.

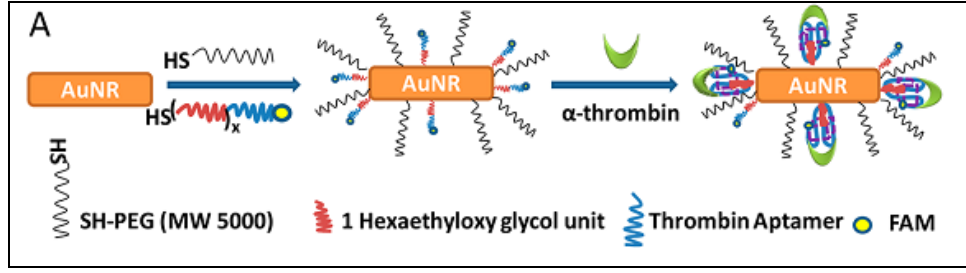
AuNP-RNA aptameri ile yapılan bir diğer çalışma ise aminoglikozitlere (AMG) karşı olmuştur. AMG'ler RNA bağlatıcı antibiyotikler olup ortak bir yapıya sahiptirler. Bakteri ribozomuna bağlanarak anlamsız peptitler ortaya çıkmasına ve en sonunda hücrenin ölümüne neden olurlar. Fakat özellikle kulağa ve karaciğere olan zehirli yan etkilerinden dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte düşük fiyatlarından dolayı hâlâ hayvancılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu da yemek zincirinde bu moleküllerin olabileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle hızı bir şekilde tayinleri büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada seçilen RNA aptamerleri tek bir hedefi değil, genel olarak AMG'leri tanıyabilen aptamerler olmuşlardır. Kullanılan RNA aptamerleri bir önceki çalışmadaki gibi 2'-floro modifiyeli.

Kolorimetrik yöntem ise bir önceki yöntemle aynıdır. Böylece hızlı ve ucuz şekilde çokça karşılaşılan AMG'lerin tanısı yapılabilmektedir [Derbyshire et al., 2012].

Aptamerler ile yapılan diğer bir çalışma türü ise bakteri proteinlerine karşı seçimdir. Bakterilerin dış yüzeyinde bulunan proteinler saflaştırılarak bu proteinlere karşı aptamer seçimi yapıp, daha sonra bu aptamerler ile bakterinin denemesi yapılmaktadır. Böyle bir çalışma enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) K88 için yapılmıştır. Bu mikroorganizma *E. coli* cinsi içinde tek K88 fibrili üreten bakteridir. Bakteri bu fibrillerin yardımıyla ince bağırsağa tutunur. Bu fibriller yenidoğanlarda birçok hastalığa ve ishâle sebep olur. Teşhis için yıllardır yapılan tanı yöntemleri yavaş işlemektedir. Bu yüzden bakterinin hızlı tanısı önemlidir. Bu çalışmada SELEX aşamasında karşıt seçim olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Ayrıca seçilen aptamerler bakterinin ince bağırsağa tutunmasını engelleyerek hastalığın oluşmasını da önlemiştir [Li et al., 2011].

Dış yüzey proteinlerine karşı yapılan diğer bir çalışma ise *Salmonella enterica* bakterisine karşı olmuştur. *Salmonella* cinsi gıda zehirlenmelerinde çokça görülmektedir. Seçilen aptamerler ile birlikte hızlı tanı konularak gıda zehirlenmelerinin önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada karşıt seçim olarak *E. coli* dış yüzey proteinleri ve lipopolisakkaritler kullanılmıştır [Joshi et al., 2008].

Aptamerler ile yapılabilecek bir diğer örnek ise az miktardaki proteinlerin zenginleştirilmesi ve saptanmasıdır. Buradaki amaç, insan kanında ya da tampon çözeltilerde az miktarda bulunan proteinlerin, aptamer bileşimli altın nano çubuklar ile etkili bir biçimde tayini ve zenginleştirilmesidir. Çünkü bu az miktardaki proteinlerin miktarlarındaki ya da yapılarındaki değişimler genellikle hastalıkların ortaya çıkışıyla ilgilidir. Bu değişikliklerin hemen saptanması erken teşhis yolunu da açabilecektir. Altın nano parçacıklar, kolayca modifiye olmalarından ve büyüklüğe bağlı olarak renk farklılıkları oluşturdıklarından dolayı DNA ve proteinlerin saptanmasında etkin olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden bu çalışmada hedef proteinlerin yakalanması ve izolasyonu için aptamer bağımlı altın nano çubuklar (AuNR) kullanılmıştır. Bu çubukların yüzeyine 15 nükleotit uzunluğunda trombin aptamerleri tutturulmuştur. Bağlanmayı arttırmak için trombin aptamerleri farklı uzunluklardaki hekzaetiloksi glükol (EG₆) ile modifiye edilmiştir. Böylece çok az miktardaki proteinler (ppb düzeyinde) güçlü, duyarlı ve etkin bir biçimde saptanabilmişlerdir [Yasun et al., 2012].



Şekil 2.10: Aptamer destekli altın nano çubukların oluşturulması.

Yapılan diğer bir çalışmada küçük moleküllerin saptanması için tek zincirli DNA bağlayıcı proteine (SSB) bağlı aptamer düzeneği kullanılmıştır. Bu düzenden gelen veriler floresans polarizasyonu (FP) yöntemiyle okunmuştur. SSB, FP için sinyal arttırıcı olarak kullanılmıştır. SSB, aptamerin hedefe bağlanmış hâline bağlanamazken, serbest hâline bağlanmaktadır. Ayrıca bu düzenek, aptamerin hedefe ve SSB proteinine bağlanması durumunda açığa çıkan yüksek düzeyde eşyönsüz floresans sinyalinin oluşumuna izin vermektedir [Zhu et al., 2012].

Biyosensörler hedef molekülün tanısı için kullanılan, biyotanıyıcı ve sinyal dönüştürücü parçalarını içeren yapılardır. Aptasensörler de biyosensör sınıfına girmektedirler. Aptasensörler hedef molekülün tanınabilmesi için farklı özelliklerde olabilirler. Çünkü aptamer ile hedef arasındaki etkileşimin etkilenmemesi ve oradan gelecek değer en az kayıpla çevrimi, aptasensörlerde aranan temel özelliklerdir. Bu amaçla çeşitli özelliklerde aptasensörler ortaya çıkmıştır. Bunlardan ilki elektrokimyasal aptasensörlerdir. Aptamerler öncelikle elektrot üzerine tutturulur. Daha sonra hedef molekül ile etkileşen aptamer, elektrot yüzeyinde değişime neden olur ve bir elektrokimyasal sinyal oluşur. İkinci olarak optik aptasensörler gelmektedir. Optik aptasensörler 4 farklı sınıfa ayrılmaktadır: *Yüzey plazmon rezonans (SPR) aptasensörü*; aptamerlerin SPR çipleri üzerine tutturulmasıyla oluşur. *Yüzeysel geliştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) aptasensörü*; Raman spektrum dağılımını kullanan bir diğer biyosensördür. *Kemilüminesans aptasensörü*; aptamer ile hedef molekülünün bağlanmasıyla açığa çıkan kemilüminesans ışımaya ölçer. *Floresans aptasensörler*; aptamer ile hedef molekülünün etkileşmesiyle açığa çıkan floresans polarizasyonunu ya da floresans ışımada değişimini ölçer. Üçüncü ve son olarak piezoelektrik kristal aptasensörleri gelmektedir. Burada aptamerler kuvarz kristallerine tutturulur. Aptamer ile hedef etkileşimi olurken, sistem dışsal bir

elektiriksel alana maruz bırakılır ve sinyal değişimi ölçölür [Xian et al., 2012], [Iliuk et al., 2011].

2.6. Tezin Amacı

S. pneumoniae'nın tanısında geleneksel tanı yöntemleri kullanılarak sonuç elde etmek için 1-1,5 gün beklemek gerekmektedir. Ayrıca belli yöntemlerin sonuçlarının diğer bir yöntemle doğrulaması da yapılmalıdır. Bu bağlamda *S. pneumoniae*'nın hızlı ve doğru tanısına bu bağlamda ihtiyaç duyulmuştur.

Bu amaç doğrultusunda bu tez çalışmasında, *S. pneumoniae* bakterisine karşı aptamer seçimi çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Seçilecek aptamerlerin daha özgül olması için yine aynı cins içinde yer alan *S. sanguinis* bakterisi karşıt seçim olarak kullanılmıştır.

Daha önce literatürde *S. pneumoniae* bakterisine karşı seçilmiş aptamer çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmayla birlikte hem bu boşluk doldurulmak, hem de ileride yapılacak olası bir ilaç ya da tanı tedavisinde alternatif bir yol ortaya çıkartılması hedeflenmiştir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar şunlardır: Glycerol GR (1.04092.2500), Hydrochloric acid fuming 37% (1.00317.2501), Ethidium bromide (1.11608.0030), Agar (1.01614.1000), Yeast extract granulated (1.03753.0500), Brain heart infusion broth (1.10493.0500), Ammonia solution 32% (1.05426.2500), Barium chloride (1.01716.0050), Sulfuric acid 95-98% (1.00713.2500) Merck'ten; Müller-Hinton broth (MHB20500) Biolab'dan; Kanlı agar (MP325) Salubris'ten; Optochin discs (74042-50DISCS-F), Sephadex® G-25 DNA grade (S5772-100G), Sodium bicarbonate (S7277-250G), Orange G (O7252,25G), GenElute plasmid midi prep kit (PLD-100) Sigma Aldrich'ten; Bovine serum albumin fraction V (10735078001), SYBR green I master (04707516001) Roche'dan; Sodium chloride (27810.295) VWR'dan; 2X PCR mix (#K0171), Dream Taq 2X PCR master mix (#K1071), Glycogen (#R0561), 50 bp DNA ladder (#SM0373), 100 bp DNA ladder (#SM0243), InsTAclone™ PCR cloning kit (#K1214) Fermentas'tan; Ethanol absolute (8006) J. T. Baker'dan; Tryptone (7351A) Acumedia'dan; Tris (A2264,1000), Potassium chloride (A2939,0500), Magnesium chloride hexahydrate (A4425,1000), Tween® 20 (A4974,1000), Boric acid (A2940,1000), Ampicillin sodium salt (A0839,0025), EDTA disodium salt dihydrate (A2937,1000), Sodium acetate anhydrous (A4555,1000), di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (A2943,1000), Potassium dihydrogen phosphate (A2946,1000) Applichem'den, Amicon ultra 0.5 centrifugal filter with ultracel-50 membrane (UFC505096) Millipore'dan, *Streptococcus pneumoniae* (10368), *Streptococcus sanguinis* SK 36 (BAA-1455) ATCC'den satın alınmıştır. Klonlama için gerekli olan DH5α hücreleri UME Biyoanaliz Laboratuvarları'ndan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Elektro-mag M 420 BP 37°C'lik etüv, Zhicheng ZHWY-200B çalkalamalı etüv, Sigma 3-18 K soğutmalı santrifüj, Beckman Coulter Allegra X-15 R soğutmalı santrifüj, Beckman Coulter Microfuge 22 R soğutmalı santrifüj, Labnet VX-200 vorteks, VWR vorteks, Roche Light Cycler 480 gerçek zamanlı PCR cihazı, Applied Biosystems Veriti ısıtıl döngü PCR cihazı, Kendro Holten HH 0,9 Plus PCR kabini, Esco PCR-4A1 PCR kabini, Bioautomation Corporation Mermade 192 DNA sentezleyici, BD FACSJazz akış sitometri, Thermo Savant SPD131DDA vakumlu santrifüj, Scotsman AF 100 buz makinası, Vilber Lourmat Biovision 1000/20M UV jel görüntüleyici, Thermo EC 250-90 elektroforez güç kaynağı, Vestel MD-GDX30 mikrodalga fırın, VWR elektroforez tankları, Nanodrop ND1000 spektrofotometre, VLM EC 1 ısı bloku, Heidolph MR Hei Standart manyetik karıştırıcı, Hangzhou Allsheng Thermo Shaker ısıtılmalı çalkalayıcı, Mettler Toledo Seven Compact S220 pH metre, Heatrow Scientific Sprout mini santrifüj, LMS MCF-2360 mini santrifüj, Teknomar Chemocell LRCX-UV biyogüvenlik kabini, Denver Instrument MXX-412 tartı, Millipore Milli-Q-Elix saf su sistemi, Elga PureLab Pulse saf su sistemi, Siemens +4°C/ -20°C buzdolabı, New Brunswick Scientific U570 -86°C derin dondurucu, Şenocak +4°C buzdolabı, Sanyo Biomedical Freezer -30°C derin dondurucu, Siemens -20°C derin dondurucu, Liebherr +4°C/ -20°C buzdolabı, Axygen Thermo, Gilson, Brand, Transferpette marka farklı hacimlerdeki mikropipetler kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Aptamer Kütüphanesinin, Bakterilerin ve Tüplerin Hazırlanması

3.2.1.1. Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanışı

Primer bölgeleriyle birlikte 75 baz uzunluğunda tasarlanan aptamer kütüphanesi, TÜBİTAK UME Biyoanaliz Laboratuvarları bünyesindeki DNA Sentezleyici cihaz tarafından "katı fazlı oligonükleotid sentezi" yöntemiyle sentezlendi. Aptamerin primer bölgeleri arasında kalan rastgele dizi (Şekil 2.1) için A, T, C, G nükleotitleri eş hacimlerle bir şişede birleştirildi. Bu bölgeye konulacak nükleotitler alet tarafından bu şişeden çekilerek konuldu. Böylece rastgele dizi bölgesi oluşumu sağlandı. Sentezlenen aptamer kütüphanesi, 600 µL %32'lik amonyak yardımıyla sentezlendiği kolonundan ayrılıp 37°C sıcaklığında 3 saat boyunca amonyak içinde bekletildi. Amonyak, kolona tutunmuş olan oligonükleotitleri kolondan koparmak ve sentezlenmiş oligonükleotitlerin baz ve fosfatlarında bulunan koruyucu grupları ortadan kaldırmak için gereklidir. 3 saat sonunda vakumlu santrifüjde amonyak uçuruldu. Hemen sonrasında 500 µL çift damıtık suyla amonyağı uçmuş katı hâldeki kütüphane sulandırıldı. Sulandırılan bu kütüphanenin tamamı (500 µL) daha önceden hazırlanmış olan Sephadex G-25 kolonuna koyuldu ve yaklaşık 30 µL hacimlerde tüplere toplandı. Toplanan bu örnekler spektrofotometre yardımıyla ölçüldü ve amonyak tuzundan uzaklaşmış olan hacimler bir araya toplanarak deneyde kullanılmaya hazır hâle geldi.

Sentezlenen örneğin doğru bir şekilde sentezlendiğinden emin olmak için, saflaştırılan kütüphanenin 5 µL'si polimeraz zincir tepkimesi (PZT) için kullanıldı. Negatif kontrol amacıyla 5 µL DNA yerine 5 µL saf su kullanılarak kontrol örnekleri de PZT için hazırlandı [Mullis et. al., 1986]. PZT sonrası elde edilen örnekler %2'lik agaroz jelde koşturularak kütüphanenin istenilen 75 baz uzunluğunda olduğu görüldü [Aaij and Borst, 1972].

3.2.1.2. Bakterilerin Hazırlanması

ATTC'den liyofilize olarak gelen bakteriler beraberinde gelmiş olan yönergeye bağlı kalınarak hazırlandı. Bu bağlamda gelen bakterilerin üzerine 1 mL Brain Heart Infusion (BHI) sıvı besiyeri eklendi ve 37°C'lik etüvde 16 saat boyunca canlandırılmaya bırakıldı. Ardından % 5 koyun kanı içeren kanlı agar besiyerine ekildi ve tekrardan 37°C'lik etüvde 16 saat boyunca bekletildi. Buradan alınan bakteriler % 50 gliserol ve % 50 BHI besiyeri içeren karışıma konularak stoklanarak -80°C'de saklanmıştır.

Bakterilerin doğru gelip gelmediklerini test etmek amacıyla kanlı agarlara bakteriler ekildikten sonra optokin diskleri yerleştirildi. 16 saat boyunca 37°C'de beklemeye bırakılmıştır. Bir sonraki gün yapılan gözlemlerde *S. pneumoniae*'nin optokin diskinin etrafında çoğalmadığı gözlemlenirken, *S. sanguinis*'in optokin diskinden etkilenmediği gözlemlendi. Böylece gelen bakterilerin doğrulanması yapılmış oldu.

Doğrulukları yapılan bakteriler, deneyde kullanılmaya hazır hâle getirilmek için bağlanma tamponu içinde çözüldü. Bulanıklık referansı olarak Mc Farland çözeltileri kullanıldı ve hazırlanan bakteri çözeltilerinin 0,5 ya da 1 Mc Farland bulanıklığında olması amaçlanmıştır. [Mc Farland, 1907].

Bu amaçla 3 mL bağlanma tamponu ve cam boncuk içeren tüplere yeni büyütülmüş bakteriler eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra daha önceden hazırlanmış olan 0,5 ve 1 Mc Farland çözeltileri ile karşılaştırılarak istenilen bulanıklığa gelmesi sağlanmıştır.

3.2.1.3. Tüplerin Hazırlanması

Yapılacak olan deneyler aşamasında, aptamerlerin bakterilerle buluştuğu zaman tüpe bağlanmasını en aza indirmek amacıyla 1,5 mL'lik santrifüj tüpleri özel işlemlerden geçirildi. Bu amaç doğrultusunda öncelikle tüplere 1,4 mL NaHCO₃ tamponu eklendi ve 1 saat boyunca, oda sıcaklığında, 900 rpm hızda çalkalamaya konuldu. Bu süre sonunda tüplerden sıvılar atıldı ve tüplerin üzerine 1,4 mL PBS-T tamponu eklenerek 4 kere yıkama yapıldı. Son basamakta boş tüplere 1,4 mL BSA

içeren tampon eklenerek oda sıcaklığında, 900 rpm’de, 1 saat çalkalamaya bırakıldı. En sonunda tüplerin içindeki tampon atıldı ve +4°C’ye konuldu.

3.2.2. Aptamer Seçim Deneyleri (SELEX İşlemi)

Saflaştırılmış aptamer kütüphanesinden 500 µL alındı ve üstüne 500 µL bağlanma tamponu eklendi ve normal tüpte karıştırıldı. Bu 1000 µL’lik karışım 95°C’de 5 dakika tutuldu ve sonra 15-20 dakika buzda bekletildi. Daha sonra bu 1000 µL’lik karışımın 500 µL’si, 500 µL hacminde ve 1 McFarland bulanıklığındaki (3×10^8 CFU/mL) *S. sanguinis* bakteri çözeltisi ile birleştirildi. Diğer 500 µL için de aynı şey yapıldı. Bu birleşmeler BSA kaplı tüplerde gerçekleştirildi. 37°C’de, 30 dakika ve 1300 rpm’de bu tüpler çalkalanmaya bırakıldı ve 15. dakikada daha iyi bir karışım olması için pipet yardımıyla karıştırma işlemi yapıldı. Bu 1000 µL’lik 2 karışım 2 ayrı, özel süzgeçli tüplerden 500 µL’lik hacimlerde geçirildi. Her süzgeçten geçiş aşamasında 14000xg’de, 3-5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Aşağıya geçen sıvılar 2 farklı tüpte toplandı. Bu tüpler 1a ve 1b olarak işaretlendi ve bu şekilde 1. seçim (Karşıt-SELEX) işlemi tamamlandı.

Her biri yaklaşık 1000 µL sıvı içeren 1a ve 1b tüpleri 500 µL’lik hacimlere bölünerek 4 ayrı BSA kaplı tüpe konuldu. Bu 4 farklı tüpe 500’er µL hacminde, 1 McFarland bulanıklığındaki *S. pneumoniae* bakterisi eklenerek aptamer ve bakteri karışımı elde edildi. Bu karışım 30 dakika boyunca, 37°C ve 1300 rpm’de çalkalamaya bırakıldı ve 15. dakikada pipet yardımıyla karıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra bu 4 tüp 2 farklı süzgeçli tüpten 500’er µL’lik hacimlerde süzüldü, alta geçen sıvı atıldı. Bu 2 süzgeçli tüp 5 defa yıkama tamponu ile 500’er µL’lik hacimlerde yıkandı ve defasında alta geçen sıvılar atıldı. Bu işlemlerin sonunda süzgeçler temiz tüplere aktarıldı ve üzerlerine önce 200 µL hacminde geri kazanım tamponu eklenerek 1 dakika sonra santrifüj yapıldı. Alta geçen sıvılar 2ag-1 ve 2bg-1 olarak adlandırılarak farklı tüplere konuldu. Daha sonra aynı süzgeçlere geride kalmış olabilecek aptamerleri de almak için yine geri kazanım tamponu konuldu ve 1 dakika beklendi. Aynı şekilde santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve alta geçen sıvılar 2ag-2 ve 2bg-2 olarak adlandırıldı ve farklı tüplere konuldu. Her süzgeç aşamasında 14000xg’de, 3-5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Deney sonunda elde edilen 2ag-1, 2bg-1, 2ag-2, 2bg-2 geri kazanım sıvılarının her birinin 200 µL’si, yani tamamı PZT

için kullanıldı. Bu geri kazanım tüplerinin bütün hacimlerinin kullanılmasının nedeni farklı aptamerler içerebileceklerinden dolayıdır. 100 μL hacminde PZT karışımı için gerekli olan DNA (aptamer) miktarı 25 μL olarak hesaplanmıştır. Bir geri kazanım tüpü 200 μL sıvı içermektedir. Tüm hacim PZT için kullanılınca her bir tüp için 25 μL gerektiğinden 8 ayrı tüp oluşmuştur. Bu da 4 tane geri kazanım tüpünün tamamının kullanılmasıyla birlikte toplamda 32 örnek yapmaktadır. PZT koşulları Tablo 3.1’de verilmiştir. PZT karışımı için 1 tüp içinde bulunan miktarlar ise Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Seçim işlemlerinde kullanılan PZT’nin koşulları.

1 döngü	30 döngü	1 döngü
95°C’de 1 dakika	95°C’de 15; 60°C’de 15; 72°C’de 30 saniye	72°C’de 7 dakika

Tablo 3.2: Tek örneğin PZT’si için gereken bileşen miktarları.

Bileşenler	Hacim(μL)
Su	5
İleri Primer (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$)	10
Geri Primer (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$)	10
SYBR Green Mix	50
DNA	25
Toplam	100

PZT sonrasında bu 32 örneğin her birinden 20 μL alınarak bir karışım tüpü oluşturuldu. Böylece tüm tüplerin temsilcileri bir tüpte toplanmış oldu. PZT sonucu çift zincirli hâle gelen aptamerleri, bir sonraki seçimde kullanılmak üzere tek zincirli hâle getirmek için bu karışım tüpünden 10 μL alındı ve toplam 100 μL hacime sahip PZT karışımı oluşturuldu. Bu PZT karışımından “Eş Olmayan (asimetrik) PZT” yapıldı. Eş olmayan PZT yaparken 10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ derişime sahip ileri primer ile 0,1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ derişime sahip geri primer kullanılmıştır. 1 tüp içinde bulunan bileşen

miktarları Tablo 3.3'te verilmiştir. Eş olmayan (asimetrik) PZT koşulları ise Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Tek örneğin eş olmayan PZT'si için gereken bileşen miktarları.

Bileşenler	Hacim(μ L)
Su	20
İleri Primer (10 $pmol/\mu$ L)	10
Geri Primer (0,1 $pmol/\mu$ L)	10
SYBR Green Mix	50
DNA	10
Toplam	100

Tablo 3.4: Seçim işlemlerinde kullanılan eş olmayan PZT'nin koşulları.

1 döngü	30 döngü	1 döngü
95°C'de 1 dakika	95°C'de 15; 64°C'de 15; 72°C'de 30 saniye	72°C'de 7 dakika

PZT sonrası bu toplam 100 μ L'lik PZT karışımının 5 μ L'si jele yüklenerek doğruluğu kontrol edildi. Geri kalan 95 μ L etanolle saflaştırıldı. Etanolle saflaştırma işleminde öncelikle gerekli karışım hazırlandı. Tek örnek için bu karışımın bileşenlerinin miktarı Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5: Tek örneğin etanol saflaştırması için gereken bileşen miktarları.

Bileşenler	Hacim(μ L)
3M Na-Asetat	2
0,1 M EDTA	2
Glikojen	1
Toplam	5

PZT sonundaki örnekler temiz 0,5 mL'lik tüplere alındı. Çöktürme aşamasının ilk basamağında her tüpün üzerine 5 µL hacminde hazırlanmış olan karışım ilâve edildi. Daha sonra tüplerin üzerine -20°C'de bekletilmiş olan % 98'lik etanolden 60 µL eklendi. +4°C'de 15 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüjlendi. Pipetle dikkatlice üst sıvılar alındı ve tüpler ters çevrilerek tüp çeperine yapışan sıvıların uçması sağlandı. Son basamakta çökelti üzerine 50 µL ddH₂O katılarak çökelti çözündü. Böylece 2. seçim (SELEX) işlemi tamamlanmış oldu.

2. seçimin sonunda yapılan eş olmayan (asimetrik) PZT örneğinin etanolle saflaştırılması sonrasında oluşturulan 50 µL hacmindeki örnek alındı. Üzerine 50 µL bağlanma tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika bekletildi. Ardından buzda belli bir süre soğumaya bırakıldı. Kanlı agarda taze büyütülmüş *S. sanguinis* bakterisinden, 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu 0,5 McFarland bulanıklığındaki çözeltiliden alınan 500 µL ile buzda bekletilen 100 µL hacmindeki aptamer karışımının tamamı BSA'lı tüpte karıştırıldı. Karıştırma 37°C'de 1300 rpm'de 30 dakika süresince yapıldı. Yarı sürede pipetle karıştırma işlemi yapıldı. Süzgeçten geçirilerek yaklaşık olarak 600 µL toplandı. Her süzgeçten geçiş aşamasında 14000xg'de, 3-5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlemler sonunda 3. seçim (Karşıt-SELEX) tamamlanmış oldu.

Bir önceki seçimde toplanan 600 µL ile taze hazırlanmış 1 McFarland bulanıklığındaki *S. pneumoniae* çözeltilisinden gelen 600 µL hacim BSA'lı tüpte birleştirildi. İnkübasyon 37°C'de 1300 rpm'de 30 dakika süresince yapıldı. Yarı sürede pipetle karıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra bu 1200 µL hacime sahip olan aptamer-bakteri karışımı süzgeçten 400 µL'lik hacimlerde geçirildi. Devamında süzgeç, yıkama tamponuyla 5 kere 500 µL'lik hacimlerde yıkandı ve santrifüj işlemleri yapıldı. Yıkama işlemleri oda sıcaklığında yapıldı. Yıkamalardan sonraki geri kazanım aşamasında süzgece önce 200 µL geri kazanım tamponu eklendi ve 1 dakika beklendi. Daha sonra santrifüj yapıldı ve alta geçen sıvı 4g-1 olarak adlandırılarak tüpe konuldu. Aynı geri kazanım işlemi bir kere daha tekrarlandı ve alta geçen sıvı 4g-2 olarak adlandırılarak tüpe konuldu. Her süzgeç aşamasında 14000xg'de, 3-5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Sonrasında bu iki örneğin her biri için 100 µL hacminde PZT karışımı hazırlandı ve sonrasında PZT yapıldı. Bu PZT sonunda elde edilen iki ürün etanol ile saflaştırıldı. Devamında her bir örnek 25 µL ddH₂O'da çözündürüldü ve nanodrop cihazında derişimleri ölçüldü. Sonrasında bu iki

örnek 9 ng/ μ L'ye seyreltildi ve eşit hacimlerde birleştirilerek tek bir tüpte toplandı. Daha sonrasında eş olmayan PZT işlemi gerçekleştirildi. Eş olmayan PZT işleminden sonra PZT ürünü etanolle saflaştırıldı, 50 μ L'de çözüldü ve kontrol için jelde koşturuldu. Bu işlemle birlikte 4. seçim (SELEX) işlemi tamamlanmış olundu.

Bundan sonraki 5. ve 7. seçim işlemleri 3. seçimin (karşıt-SELEX'in) tekrarı olurken, 6. seçim (SELEX) işlemi ile 8. seçim işleminin PZT işlemine kadar olan kısmı ise 4. seçimin (SELEX) tekrarı olmuştur.

8. seçim işleminin sonunda elde edilen geri kazanım örnekleri son seçim işleminde elde edildikleri için girecek oldukları PZT işleminde bir takım değişiklikler yapıldı. Ayrıca bu seçim işlemi son seçim olduğu için diğer seçimlerde yapılan eş olmayan PZT aşaması bulunmamaktadır. Sadece PZT aşaması bulunmaktadır. Bu PZT sonrasında elde edilecek örnekler ligasyon işlemine sokulacağından dolayı ve yapılan PZT'nin ligasyonu etkilememesi için PZT işlemi, "SYBR Green Mix" ile yapılmadı. Bunun yerine deneme amacıyla 2 farklı karışım kullanıldı. Bunlar "2X PCR Master Mix" ile "DreamTaq 2X PCR Master Mix" oldu. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak 8. seçim sonrası elde edilen iki örnek için toplam 50 μ L'lik hacimlere sahip 4 tane (her mix için 2 örnek olduğundan) PZT karışımı oluşturularak PZT yapıldı ve ligasyon işlemine geçildi. PZT koşulları Tablo 3.6'da verilmiştir. 1 tüp içinde bulunan miktarlar ise Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.6: Ligasyon işlemi öncesinde yapılan PZT'nin koşulları.

1 döngü	35 döngü	1 döngü
95°C'de 1 dakika	95°C'de 15; 60°C'de 15; 72°C'de 30 saniye	72°C'de 30 dakika

Tablo 3.7: Ligasyon işlemi öncesinde yapılan PZT'de tek örnek için gereken bileşenler.

Bileşenler	Hacim(μ L)
Su	7
İleri Primer (10 $pmol/\mu$ L)	4
Geri Primer (10 $pmol/\mu$ L)	4
2X/Dream Mix	25
DNA	10
Toplam	50

3.2.3. Ligasyon, Klonlama, Transformasyon ve Dizi Analizi İşlemi

3.2.3.1. Ligasyon ve Klonlama

8. seçim sonunda yapılan PZT sonucunda “DreamTaq 2X PCR Master Mix” ile yapılan örneklerin iyi sonuç vermesinden dolayı bu örnekler ligasyon işlemi için kullanıldı. Ligasyon işleminde kullanılacak karışımın miktarları Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8: Tek örneğin ligasyonu için gereken bileşen miktarları.

Bileşenler	Hacim(μ L)
5X Ligasyon Tamponu	3
Vektör (pTZ57R/T)	1,5
T4 DNA Ligaz	0,5
Su	5
Toplam	10

Hazırlanan bu karışım tüplere dağıtıldı. 2 örnek için 2 tüpe 5 µL DNA, pozitif örnek için kitle gelen “PCR Control Fragment” ve negatif örnek için su eklenerek iyice karıştırıldı. Toplamda 4 örneğin ligasyonu yapıldı. +4°C’de gece boyu tutuldu.

3.2.3.2. Transformasyon

Daha önceden hazırlanmış olan ve ampisilin içeren katı LB besiyerleri klonlama öncesi 37°C’lik etüve konuldu. -80°C’de donmuş hâlde bulunan *E. coli* DH5α yetkin (kompetent) hücreleri çıkartılarak buz üzerinde çözülmeye bırakıldı. Eridikten hemen sonra önceden hazırlanmış olan ligasyon karışımları bakterilere eklenip iyice karıştırıldı. Bu karışım buz üzerinde 15 dakika boyunca bekletildi. Ardından karışımlar, 42°C’ye ayarlanmış PZT cihazında tam 2 dakika tutulup hemen ardından 5 dakikalığına buza yerleştirildi. Pozitif örnek için pBluescript plazmidi eklenmiş *E.coli* bakterisi kullanılmıştır. Sonrasında bu karışımlar klonlama öncesi konulan etüvden çıkartılmış olan besiyerlerine ekilip 16 saat boyunca büyümeye bırakıldı. 16 saat sonunda büyümüş olan kolonilerin taraması için M13 primerleri ile PZT yapıldı. Aynı anda bu kolonilerin daha sonra kullanılmak üzere stokları da hazırlandı. Tek örnek için PZT karışımının bileşenleri Tablo 3.9’da verilmiştir. PZT koşulları ise Tablo 3.10’da verilmiştir. PZT ile koloni taraması sonucunda dizi analizine gönderilecek 50 örnek belirlendi.

Tablo 3.9: Koloni tarama PZT’inde tek örnek için gereken bileşen miktarları.

Bileşenler	Hacim(µL)
Su	5,5
İleri Primer	1
Geri Primer	1
2X PCR Master Mix	12,5
DNA	5
Toplam	25

Tablo 3.10: Koloni taraması aşamasında kullanılan PZT'nin koşulları.

1 döngü	35 döngü	1 döngü
95°C'de 3 dakika	95°C'de 15; 55°C'de 30; 72°C'de 30 saniye	72°C'de 7 dakika

3.2.3.3. Dizi Analizi

Dizi analizine gidecek örneklerin saf olarak gitmesi amaçlandı. Bu nedenle, belirlenen 50 örneğin daha önceden hazırlanmış olan stok besiyerleri kullanılarak bakteriler tekrar büyütüldü. Büyüyen bakteriler, plazmit saflaştırma kiti ile saflaştırılarak plazmitler elde edildi. Daha sonra bu plazmitler tekrardan PZT'ye konuldu ve 50 örnek dizi analizine gönderildi. Dizi analizi yapılan bu 50 örnekten 4 tanesinin istenilen büyüklükte olduğu tespit edildi.

3.2.4. Bağlanma Deneyleri (Akış Sitometri Deneyleri)

Dizi analizi sonucu istenilen büyüklükte olduğu görülen 4 tane aptamer 5' ucunda FAM işaretli olacak şekilde IDT (Iowa, ABD) firmasından sipariş edildi. Gelen bu 4 aptamer stok derişimi 100 µM olacak şekilde sulandırıldı. Bu 100 µM'lık çözeltiler ana stok çözeltileri olarak kullanıldı.

Akış sitometri cihazında (BD FACSJazz) okuma yapmak için öncelikle örnek hazırlama işlemi gerçekleştirildi. Bu hedefle *S. pneumoniae* bakterisinden 1 Mc Farland bulanıklığında bakteri çözeltisi hazırlandı. FAM işaretli 4 aptamerin stok (100 µM) çözeltilerinden sırasıyla 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM derişime sahip ek stok çözeltiler hazırlandı. Kontrol amaçlı olarak aptamer içermeyen bakteri çözeltisi kullanıldı.

Bakteri çözeltisinden 100 µL alındı ve BSA kaplı tüplere aktarıldı. Üzerlerine ek stok olarak hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki aptamerlerden 10 µL eklendi (her derişim için farklı tüp kullanıldı). Toplam hacmi 150 µL'ye tamamlamak için ek olarak 40 µL 1X bağlanma tamponu da tüpe konuldu. Böylece her bir farklı tüpte bulunan 150 µL'nin içinde son aptamer derişimleri sırasıyla 666 nM, 333 nM, 167 nM, 83 nM ve 42 nM oldu. Daha sonra bu tüpler 1 saat boyunca 1300 rpm'de oda

sıcaklığında karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra örnekler santrifüj edilerek üst sıvıları atıldı. Sonra yıkama tamponuyla bir kere yıkandı, santrifüjlenerek üst sıvıları atıldı. Çökeltiler tekrar bağlanma tamponunda çözdürüldü. Böylece örnekler akış sitometri cihazında okunmaya hazır hâle getirildi. Bu deneyler 4 aptamer için de yapılarak 4 kere tekrar edildi.

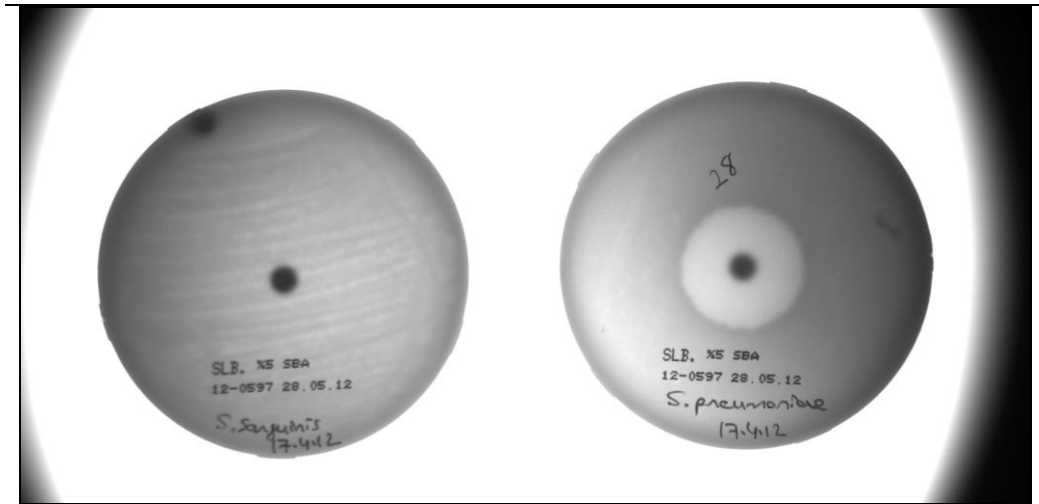
Yapılan ön çalışmalarda 333 nM altındaki derişimlerde herhangi bir veri elde edilemedi. Kalan 333 ve 666 nM'lık son derişimlerde ise en iyi bağlanma gösteren B40 aptameri oldu.

Bu sonuçlar ışığında daha iyi bir veri için B40 aptamerinin 80 μ M, 60 μ M, 40 μ M, 20 μ M ve 10 μ M derişimlerindeki ek stok çözeltileri hazırlandı. Referans olarak aptamer içermeyen bakteri çözeltilisi kullanıldı. Taze hazırlanmış olan 1 McFarland bulanıklığındaki bakteri çözeltilisinden 100 μ L alındı ve BSA'lı tüplere konuldu. Her farklı tüpe, ek stok olarak hazırlanmış olan farklı derişimdeki aptamerden 10 μ L eklendi. 150 μ L'ye tamamlamak amacıyla ek olarak 40 μ L 1X bağlanma tamponu ilave edildi. Bunun sonucunda her farklı tüpte bulunan, toplam 150 μ L'lik hacmin içindeki son aptamer derişimleri sırasıyla 5333 nM, 4000 nM, 2666 nM, 1333 nM ve 666 nM oldu. Hazırlanmış olan bu bakteri-aptamer karışımlarına yukarıdaki işlemlerin aynısı uygulandı ve akış sitometri cihazında ölçümleri gerçekleştirildi. Bu örneklerin ölçümleri, sadece bakteri içeren çözelti (yani hiç aptamer içermeyen çözelti) kullanılarak oluşturulmuş olan referans noktasına dayandırılarak yapıldı. Her örneğin ölçümü 3-4 dakika sürdü.

4. SONUÇLAR

4.1. Bakteriler

ATCC'den gelen bakterilerin doğrulaması optokin disk testiyle yapıldı. Kısım 2.4.1'de belirtildiği bu test tanı amaçlı kullanılmaktadır. Şekil 4.1'de görüleceği üzere optokin testi sonucu *S. pneumoniae* bakterisinin ekili olduğu besiyerinde bulunan optokin diskinin etrafındaki belli bir dairesel bölgede üreme olmazken, *S. sanguinis* bakterisinin ekili olduğu besiyerinde bulunan optokin diskinde herhangi bir inhibisyon bölgesi gözlemlenmemiştir. Böylece bu test sonucunda bakterilerin doğrulaması yapılmıştır.

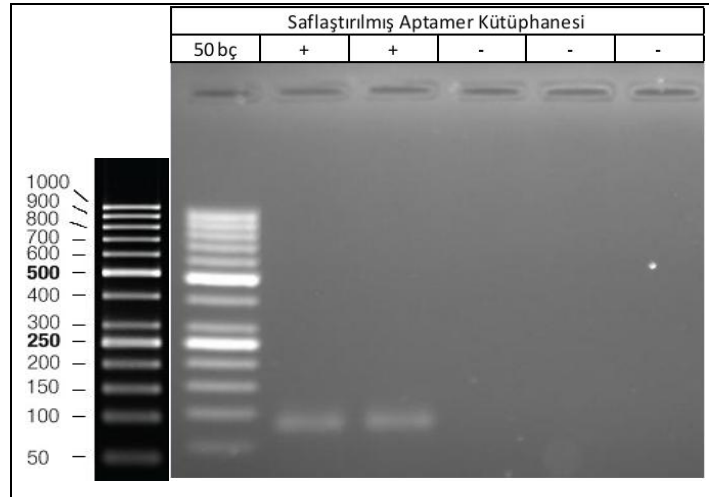


Şekil 4.1: Optokin testi: *S. sanguinis* (solda) ve *S. pneumoniae* (sağda) bakterileri. Bakteriler % 5 koyun kanı içeren agarlı petri besiyerlerine ekilmiştir. Deney şartları Bölüm 3.2.1.2'de verilmiştir.

4.2. Aptamer Kütüphanesi Oluşturulması ve Seçim Deneyleri

4.2.1. Aptamer Kütüphanesi Oluşturulması

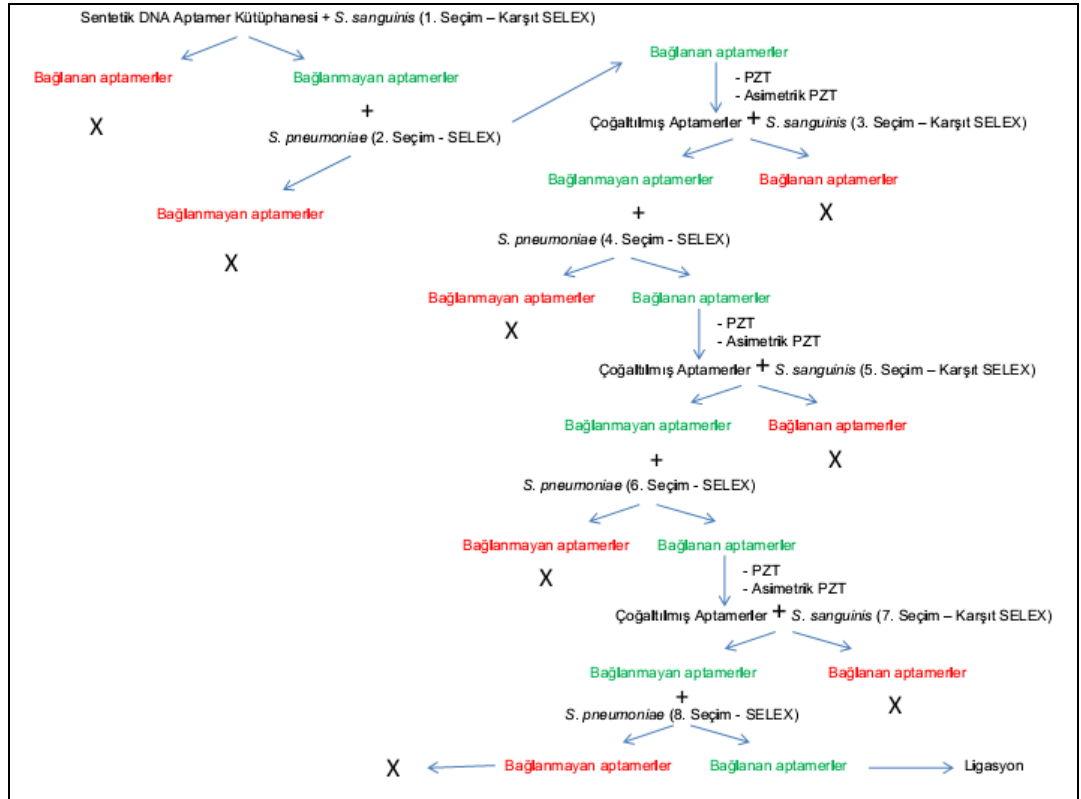
Kısım 3.2.1.1'de belirtildiği gibi sentezlenmiş ve amonyakla saflaştırılmış aptamer kütüphanesinin 75 bazlık uzunluğunda olup olmadığı PZT deneyleri ile doğrulandı. PZT deneyleri sonucunda elde edilen ürünler % 2'lik agaroz jelde analiz edildi (Şekil 4.2). Aynı zamanda PZT deneylerinde sentetik aptamer kütüphanesi yerine su eklenerek negatif kontroller de yapıldı. Şekil 4.2'den de görüleceği gibi sentetik olarak elde edilen aptamer kütüphanesi sonucunda beklenildiği gibi sadece 75 baz uzunluğunda ürünler oluşmuştur. Negatif örneklerde ise beklenildiği gibi herhangi bir bant gözlenmemektedir.



Şekil 4.2: 75 bazlık aptamer kütüphanesinin PZT ile analizi sonucunda elde edilen ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. Pozitif (+) örnekler aptamer kütüphanesi varlığında, negatif (-) örnekler ise aptamer kütüphanesi yerine su eklenerek PZT'ye sokulan örneklerin PZT sonucu oluşan ürünlerini göstermektedir. “50bç” işaret (marker) DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.1.1'de verilmiştir.

4.2.2. Seçim (SELEX) Deneyleri

Kısım 3.2.2'de belirtildiği gibi yapılan deneyler ışığında seçim (SELEX) ve karşıt-seçim (karşıt-SELEX) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her SELEX işleminin sonrasında ilk olarak PZT, sonrasında eş olmayan (asimetrik) PZT yapılmıştır. Fakat karşıt-SELEX işlemlerinin sonunda PZT işlemi uygulanmamıştır. Eş olmayan PZT işleminde primerlerin derişimleri birbirlerinden farklıdır; ileri primerin derişimi geri primerin derişiminden 100 kat daha fazladır (ileri primer 10 pmol/μL, geri primer ise 0,1 pmol/μL). Dolayısıyla eş olmayan PZT sonucunda elde edilen ürünler %99 oranında tek zincirlidir. Bu deneylerin şemasal gösterimi Şekil 4.3'te verilmiştir.



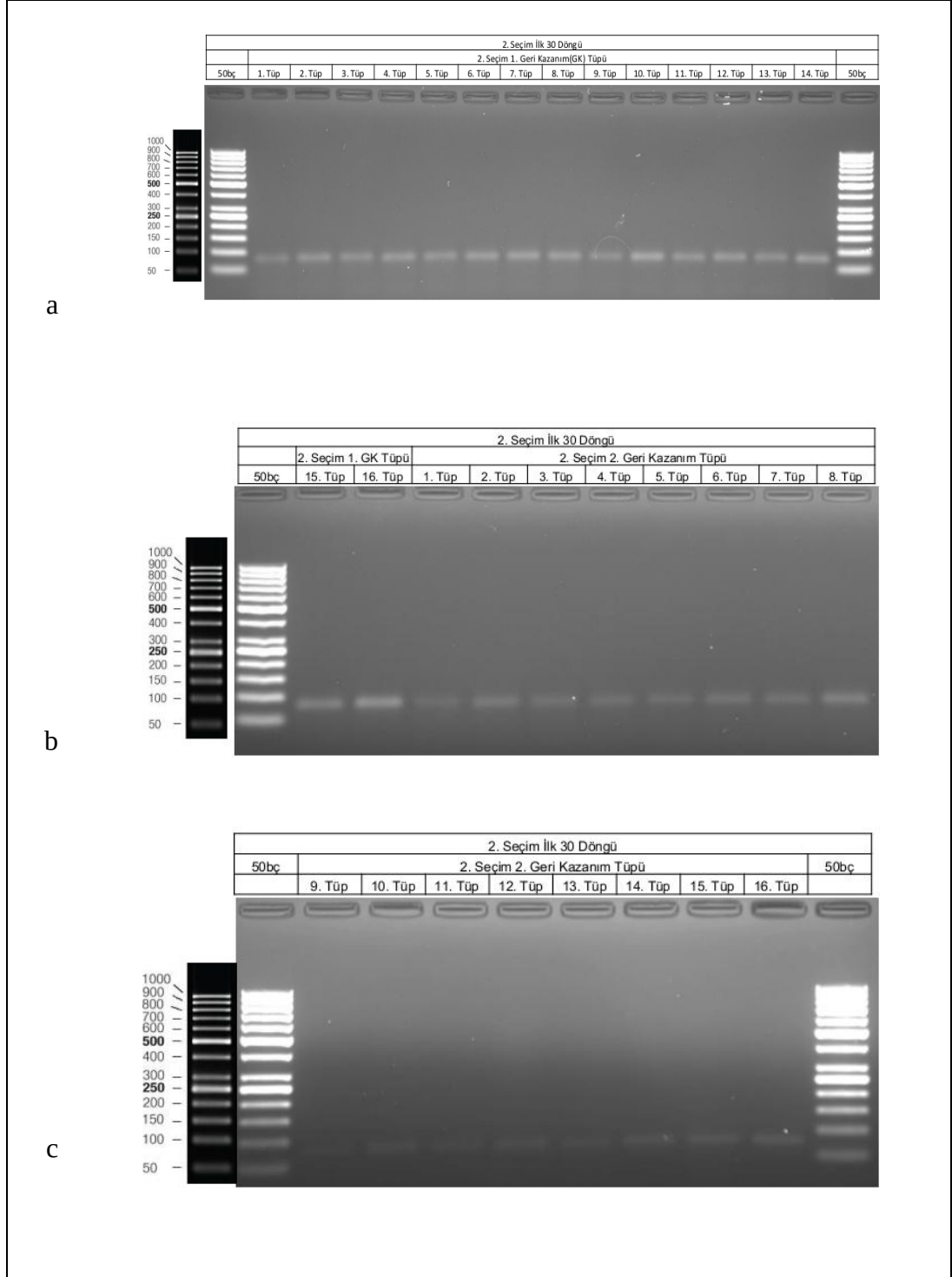
Şekil 4.3: Seçim (SELEX) ve karşıt-SELEX işlemlerinin şema ile gösterimi.

2. SELEX işlemi sonunda *S. pneumoniae* bakterisine bağlanan aptamerler geri kazanım tamponuyla elüye edilerek geri kazanıldıktan sonra (toplam hacim 800 μL) herbiri farklı dizine sahip bu aptamerleri çoğaltmak için PZT yapıldı (Şekil 4.4). Ancak bu 800 μL hacmi tek bir PZT reaksiyonuyla çoğaltmak mümkün olmadığı için 25'şer μL örnek kullanarak 32 farklı PZT reaksiyonu kuruldu. Şekil 4.4 herbir PZT

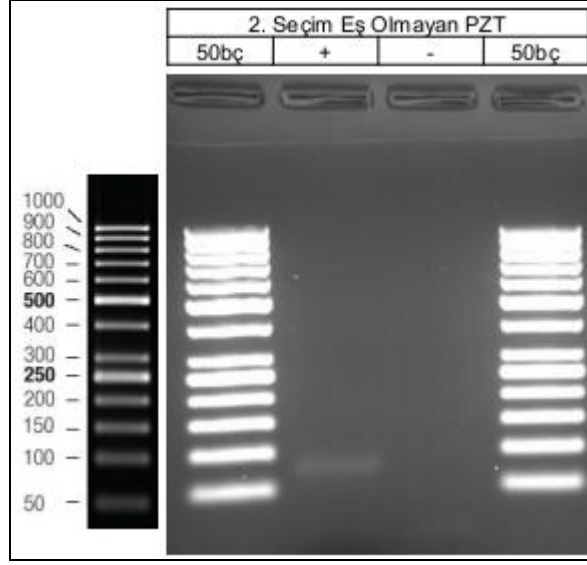
reaksiyonu sonucu elde edilen örneklerin agaroz jel analiz sonucunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre her bir PZT reaksiyonu istenilen 75 baz uzunluğunda ürün vermiştir.

Daha sonra, doğrulaması yapılan bu 32 örneğin her birinden 20 μ L alınarak bir karışım oluşturuldu. PZT sonucu çift zincirli hâle gelen bu aptamerleri tekrar tek zincirli yapmak için, bu karışımdan 10 μ L örnek kullanılarak eş olmayan PZT gerçekleştirildi; agaroz jel analizinde oluşan PZT ürünün 75 baz uzunluğunda olduğu görüldü (Şekil 4.5). Yukarıda da belirtildiği gibi eş olmayan PZT ürününün %99'u tek zincirli DNA'lardan oluşmaktadır, ancak %1'i çift zincir yapıdadır.

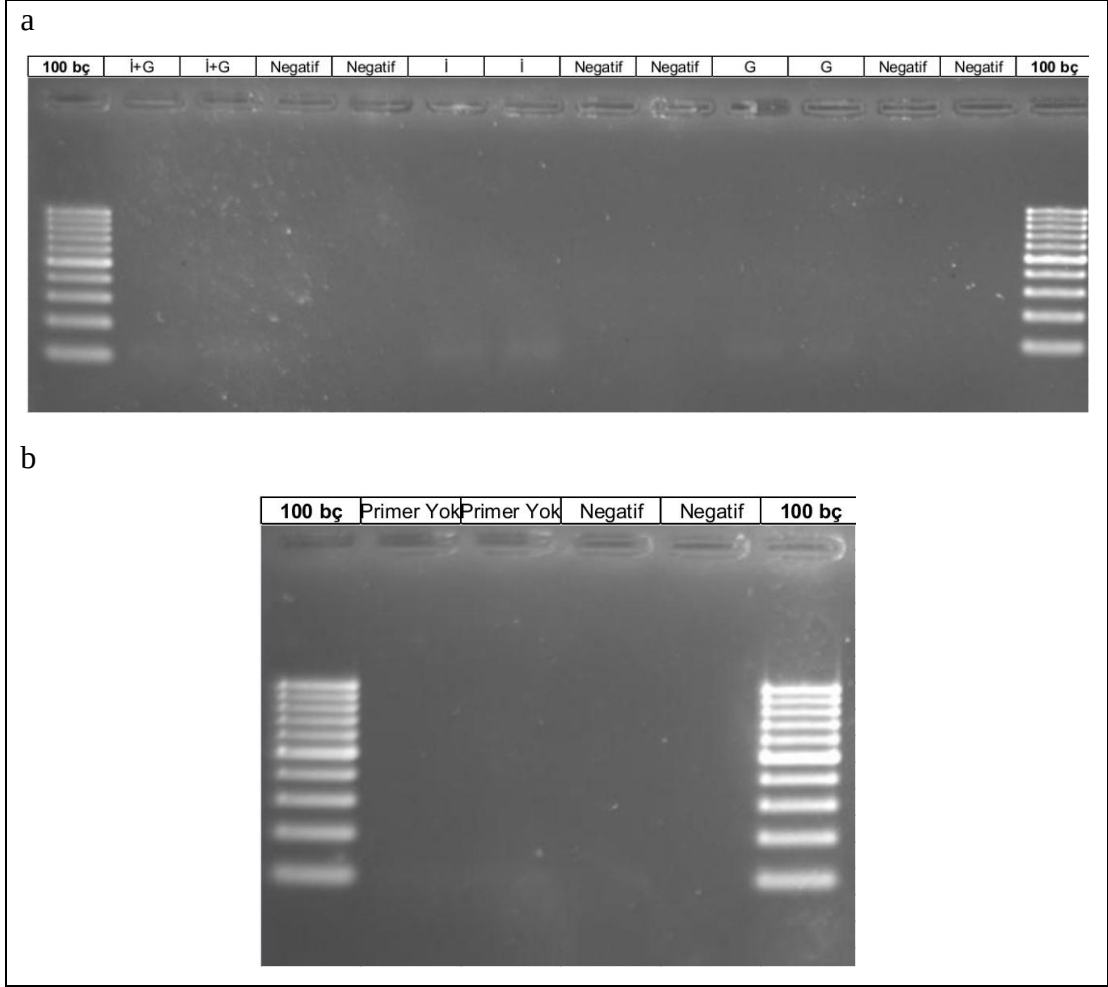
Şekil 4.5'te görülen silik bant, bu bandın sadece %1'lik çift zincirden mi kaynaklandığı ve tek zincirli DNA'nın agaroz jelde görüntülenip görüntülenemeyeceği sorularını akla getirdi. Bunun cevabını bulmak için 4 farklı PZT karışımı hazırlandı: Bu karışımlardan birincisi her iki primeri (ileri primer 10 pmol/ μ L, geri primer ise 0,1 pmol/ μ L), ikinci karışım sadece ileri primeri (10 pmol/ μ L), üçüncü karışım sadece geri primeri (0,1 pmol/ μ L) içerirken, dördüncü karışım ise hiç bir primer içermemektedir. Bu deneylerde, her bir örnek için kalıp DNA olarak, satın alınmış 75 baz uzunluğunda bir aptamer (20 ng) kullanılmıştır; böylece oluşacak olan PZT ürünlerinin sadece 75 baz uzunluğunda olması hedeflenmiştir. Deney sonucunda ileri ve geri, sadece ileri ve sadece geri primer bulunan örneklerde 75 bazlık ürün gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Bu sonuçlar bu şartlarda tek zincirli DNA'nın da görüntülendiğini göstermektedir; ancak bantlar silik gözükmemektedir. Bu durumun, DNA'yı görüntülemek için kullanılan etidyum bromürün tek zincirli DNA'ya, çift zincirliye göre daha zayıf bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [Vardevanyan et. al., 2003]. Bu sonuçların ardından bir sonraki SELEX döngüsüne geçildi.



Şekil 4.4: 2. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ile çoğaltılması sonucunda oluşan ürünlerinin agaroz jel (%2) görüntüsü. a) geri kazanım tüplerinin tüm hacimlerinin PZT'ye sokulmasıyla oluşan ve doğrulanmak istenen ilk 14 örnek; b) geri kazanım tüplerinin PZT ürünlerinin devamı olan 10 örnek; c) 2. seçim geri kazanım tüplerinin PZT ürünlerinden son 8 örnek. “50bç” işaret (marker) DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.



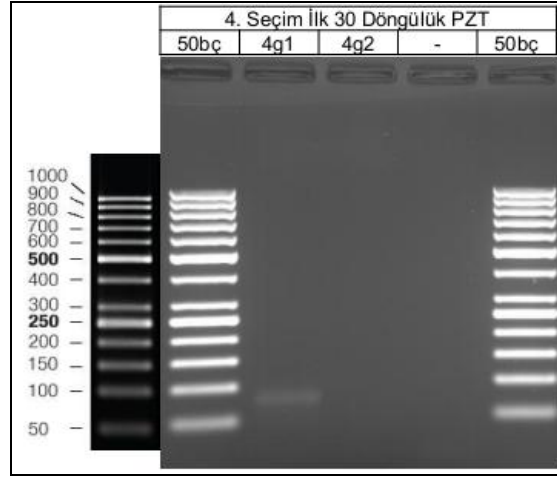
Şekil 4.5: 2. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan (asimetrik) PZT ürünlerinin agaroz jel (%2) görüntüsü. Pozitif (+) örnek, doğrulanmak istenen DNA'nın PZT karışımına eklenip PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürünü göstermektedir. “50bç” işaret (marker) DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.



Şekil 4.6: Tek primer kullanılarak yapılan PZT örneklerinin agaroz jel görüntüsü. PZT reaksiyonları Kısım 3.2.2’de belirtildiği şekilde sadece ileri veya geri primer kullanılarak yapıldı. Kontrol olarak, asimetrik PZT deneylerinde kullanılan primerlerin her ikisini de (ileri primer/geri primer 10/0,1 pmol/μL oranında) içeren ve hiçbir primer içermeyen karışımların da PZT’si gerçekleştirildi. a) "I+G" her iki primeri içeren, "I" sadece ileri primer içeren, "G" sadece geri primeri içeren örnekleri gösterirken; b) "Primer Yok" her iki primeri de içermeyen örnekleri göstermektedir. "Negatif" örnekler ise kalıp DNA yerine su eklenerek PZT'ye sokulan örneklerin PZT sonucunu oluşturan ürünlerini göstermektedir. "100 bç" işaret (marker) DNA’yı göstermektedir.

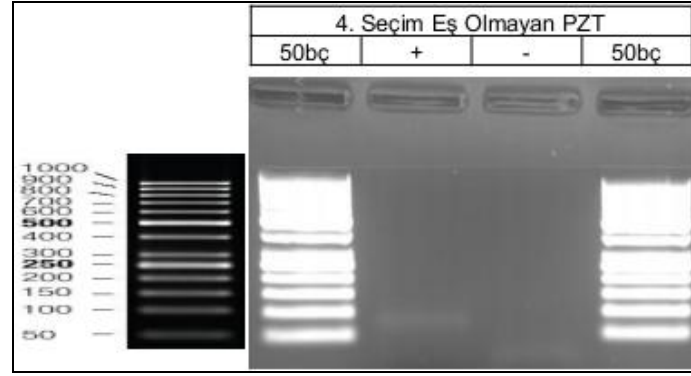
4. SELEX işlemi sonunda *S. pneumoniae* bakterisine bağlanan aptamerler “geri kazanım tamponu” ile elüye edildi. Geride kalmış olabilecek olan aptamerleri de toplamak için ikinci elüsyon yapıldı. Daha sonra, elde edilen aptamerler PZT ile çoğaltıldı. Şekil 4.7’de 4g-1 ve 4g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir. 4g-1 de 75 bazlık bir bant gözürken 4g-2’de bir bant gözükmemektedir. 4g2’de bir ürünün gözükmemesi, ilk eklenen geri kazanım tamponuyla tüm aptamerlerin geri

kazanıldığını ve ikinci elüsyonda ortamda hemen hemen hiçbir aptamerin kalmadığını göstermektedir.



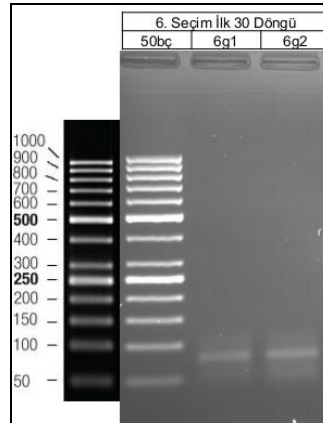
Şekil 4.7: 4. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 4g-1 ve 4g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını gösterirken, negatif (-) örnek ise DNA yerine su eklenerek PZT'ye sokulan örneğin ürününü göstermektedir. “50bç” işaret DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.

Yukarıda elde edilen aptamerler PZT ile çoğaltıldıktan sonra tekrar tek zincirli yapmak için eş olmayan PZT uygulandı. Şekil 4.8 eş olmayan PZT ile elde edilen ürünün agaroz jel analiz sonucunu göstermektedir; beklenildiği gibi 75 baz uzunluğunda bir ürün oluşmuştur. Daha önce de belirtildiği gibi eş olmayan PZT %99 tek zincirli DNA içerdiğinden dolayı bant silik gözükmemektedir.



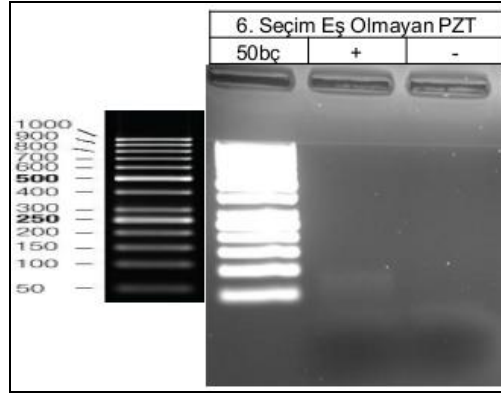
Şekil 4.8: 4. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. Pozitif örnek (+) doğrulanmak istenen DNA'nın PZT karışımına eklenip PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü göstermektedir. “50bç” işaret DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2'de verilmiştir.

6. SELEX işlemi sonunda da hedef bakteriye bağlanan aptamerler elüye edildi. Geride kalmış olabilecek olan aptamerleri toplamak için ikinci elüsyon gerçekleştirildi. Daha sonra, elde edilen aptamerler PZT ile çoğaltıldı. Şekil 4.9'da 6g-1 ve 6g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.9: 6. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 6g-1 ve 6g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir. “50bç” işaret DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2'de verilmiştir.

Geri kazanılıp PZT ile çoğaltılan aptamerleri tekrar tek zincirli yapmak için eş olmayan PZT uygulandı. Şekil 4.10 eş olmayan PZT ile elde edilen ürünün agaroz jel analiz sonucunu göstermektedir; beklenildiği gibi 75 baz uzunluğunda bir ürün oluşmuştur.



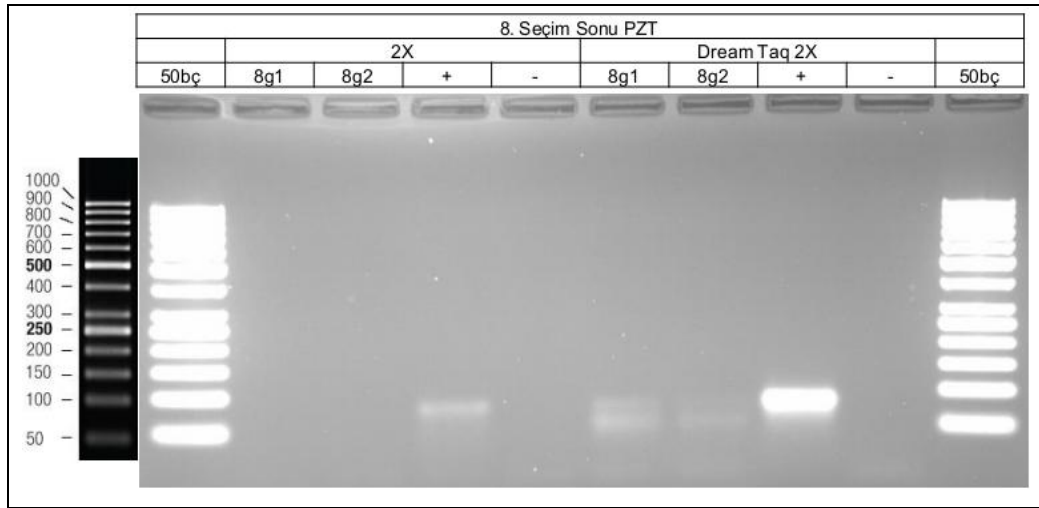
Şekil 4.10: 6. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin eş olmayan PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. Pozitif (+) örnek doğrulanmak istenen DNA'nın PZT karışımına eklenip PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü gösterirken, negatif (-) örnek DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT'ye sokulması sonucu oluşan ürününü göstermektedir. "50bc" işaret DNA'yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2'de verilmiştir.

8. SELEX sonunda elde edilen aptamerleri çoğaltmak için PZT uygulandı. 8. SELEX son seçim olduğundan dolayı bu basamakta eş olmayan (asimetrik) PZT bulunmamaktadır. Buraya kadar yapılan PZT işlemlerinde SYBR Green Mix kullanılmıştı. Fakat 8. SELEX'ten sonra ligasyon işlemine gidileceği için PZT deneyleri, SYBR Green Mix yerine 2X Master Mix ve DreamTaq 2X Master Mix ile yapılmıştır. Örnekler her iki Mix'le paralel olarak PZT işlemine tabi tutulmuştur. Mix'lerin çalışıp çalışmadığının kontrolü amacıyla, ticari olarak satın alınmış 75 bazlık aptamerle de aynı işlemler aynı anda gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11'de 8g-1 ve 8g-2 geri kazanım tamponuyla elde edilen aptamerlerin birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir; pozitif (+) örnek ticari aptamerin PZT sonucunu gösterirken, negatif (-) örnek ticari aptamer ve geri kazanılan örneklerin yerine su içeren örneğin PZT sonucunu göstermektedir.

"2X PCR Mix" ile PZT'ye sokulan 8g-1 ve 8g-2 örneklerinin PZT ürünlerinde herhangi bir bant görülmemekle birlikte pozitif örnekte silik bir bant görülmektedir. Negatif üründe ise beklediği gibi herhangi bir bant görülmemektedir. "DreamTaq 2X

Master Mix” ile PZT’si gerçekleştirilen 8g-1 ve 8g-2 örneklerinin PZT ürünlerinde ve pozitif örnekte beklenildiği gibi 75 bazlık bant gözlemlenirken negatif örnekte yine beklenildiği gibi herhangi bir bant gözlemlenmemiştir.

Mix’lerin sonuçları arasındaki bu farklılığın nedeninin Taq Polimeraz enzimi olduğu düşünülmektedir. Çünkü DreamTaq 2X Master Mix'te bulunan "DreamTaq DNA polimeraz" enzimi 2X PCR Mix'te bulunan "Taq DNA polimeraz" enzimine göre daha yüksek hassaslıkta ve verimlilikte çalışmaktadır. Şekil 4.11’den de görüleceği üzere DreamTaq 2X Master Mix ile elde edilen sonuçlar daha iyi çıkmıştır. Bu sonuçların ışığında bir sonraki adım olan ligasyon işlemine Dreamtaq 2X Master Mix örnekleri ile devam edilmiştir.



Şekil 4.11: 8. seçim (SELEX) sonunda elde edilen aptamerlerin PZT ürünlerinin agaroz (%2) jel görüntüsü. 8g-1 ve 8g-2, geri kazanım tamponuyla elde edilen birinci ve ikinci fraksiyon örnekleriyle kurulan PZT sonuçlarını göstermektedir. Pozitif (+) örnekler, ticari olarak satın alınmış, büyüklüğü 75 baz olarak bilinen aptamerin PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürünleri, negatif (-) örnekler ise DNA yerine suyun PZT karışımına eklenerek PZT’ye sokulması sonucu oluşan ürünleri göstermektedir. “50bç” işaret DNA’yı göstermektedir. Diğer deney şartları Bölüm 3.2.2’de verilmiştir.

4.3. Ligasyon, Klonlama, Transformasyon ve Dizi Analizi

4.3.1. Ligasyon, Klonlama ve Transformasyon

Kısım 3.2.3.1 ve 3.2.3.2'de belirtildiği gibi 8. seçim sonunda elde edilen PZT ürünleri kullanılarak ligasyon, klonlama ve ardından transformasyon yapılmıştır. Daha sonra 150 ürünün koloni taraması gerçekleştirilmiştir. Koloni taraması sonrasında 50 örnek seçilerek dizi analizine gönderilmiştir.

4.3.2. Dizi Analizi

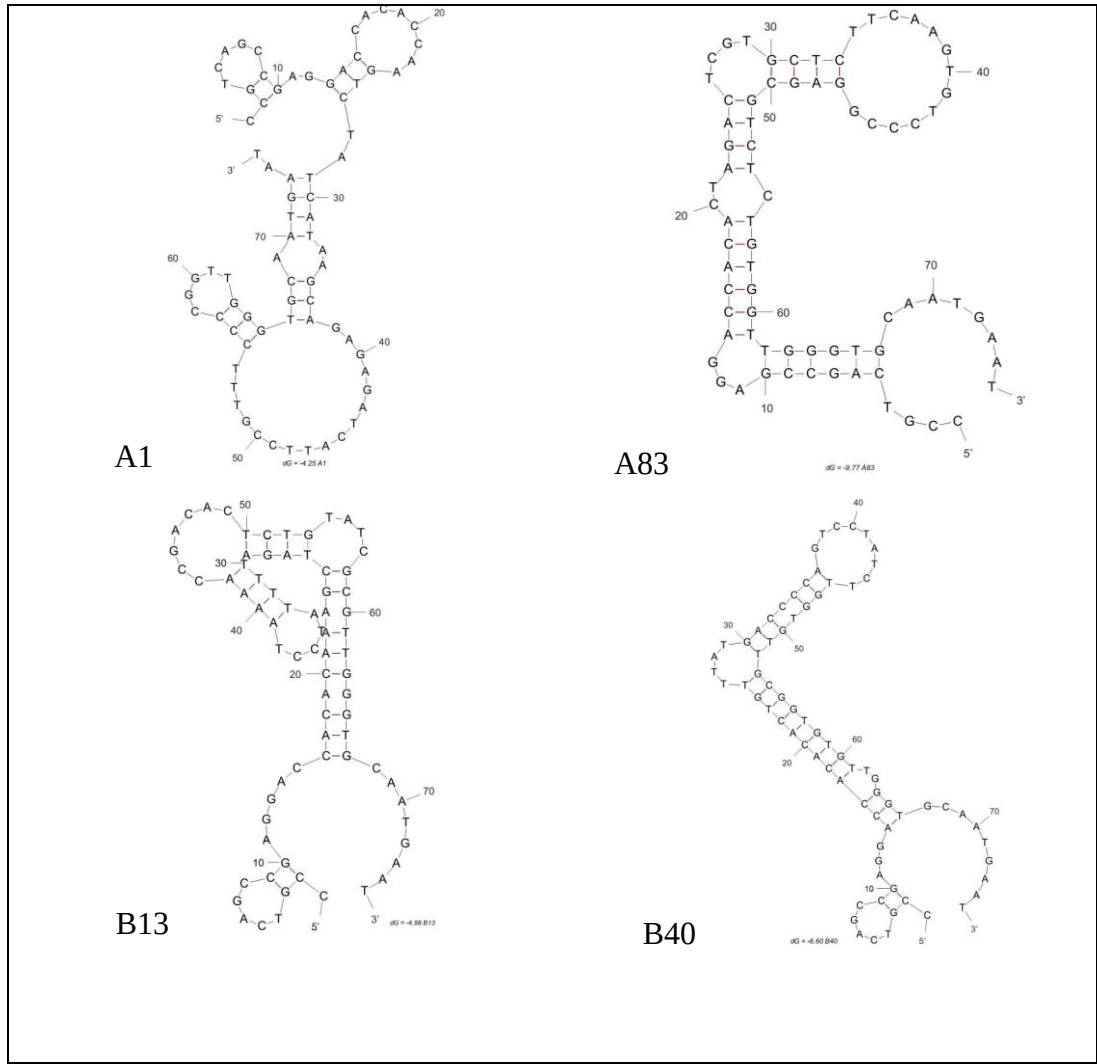
Dizi analizine giden 50 örnekten 4 tanesi tam olarak 75 baz uzunluğunda çıkmıştır. Bu örnekler A1, A83, B13 ve B40 örnekleri oldu. Bu örneklerin dizinleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: SELEX ve Karşıt-SELEX işlemleri sonucunda elde edilen aptamerlerin DNA dizinleri.

Aptamer Adı	Aptamer Dizini
A1	<u>CCGTCAGCCGAGGACCACACCAAGTCTATCATAAGCAGAGAGATCATTC</u> CGTTTCCCGGTTGGGTGCAATGAAT
A83	<u>CCGTCAGCCGAGGACCACACTAGACTCGTGCTCTTCAAGTGTCCCGGAGCGTCTCTGTGGT</u> TGGGTGCAATGAAT
B13	<u>CCGTCAGCCGAGGACCACACAAAGCTAGATTTTATCCTAAAACGACACTCTGTATCGCGT</u> TGGGTGCAATGAAT
B40	<u>CCGTCAGCCGAGGACCACACTGTTTATGACCCAGTCCTATCTTGGTGTGCGGTGTGTTGGGT</u> GCAATGAAT
Altı çizili bölgeler primer bölgelerini göstermektedir. İleri primer 20 baz, geri primer 15 baz uzunluktadır. Arada kalan bölge 40 baz uzunluğunda olup aptamerin toplam uzunluğu 75 bazdır.	

4.4. Aptamerlerin İkincil (Sekonder) Yapıları

Aptamerlerin tahmini sekonder yapıları Mfold programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca herbir yapı için aynı program tarafından hesaplanan termodinamik parametreleri ve T_m değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Tanı kitlerinde kullanma potansiyeli olan aptamerlerin oda sıcaklığındaki (25 °C) yapılarının bilinmesi, bakteri veya hücreyle olan etkileşimlerinin tahmin edilebilmesi açısından önem arz etmektedir. Tablo 4.2’de verilen sonuçlar, oda sıcaklığında elde edilen 4 aptamerin sekonder yapılarının kararlı olduğunu ve bakteriyle olan etkileşimde bu yapılarının önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12: Aptamer A1, A83, B13, B40'ın Mfold programı ile elde edilen tahmini ikincil (sekonder) yapıları.

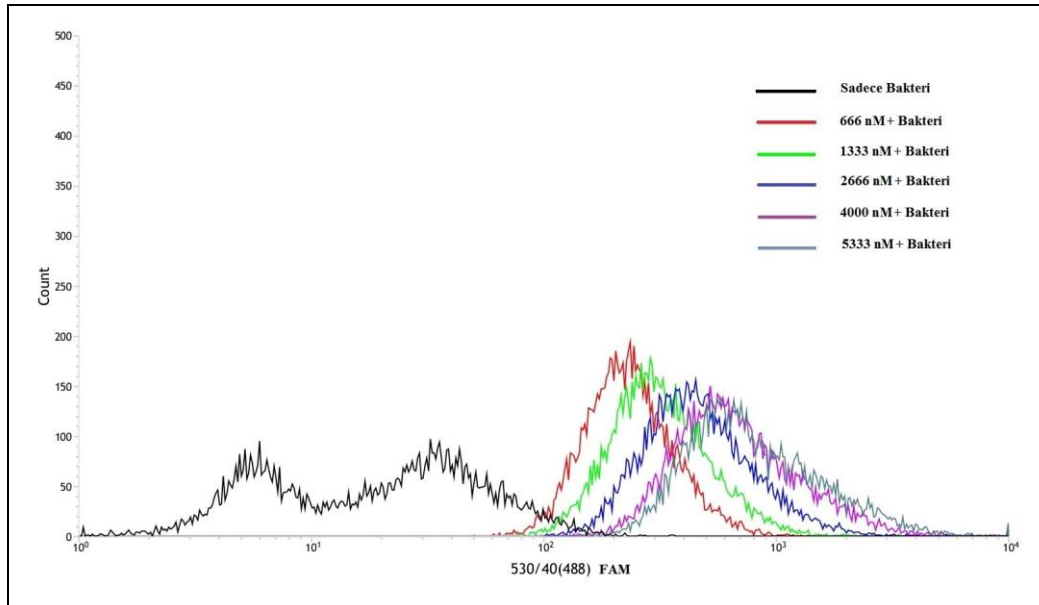
Tablo 4.2: Aptamer A1, A83, B13, B40'ın Mfold programı ile elde edilen tahmini ikincil yapılarının T_m ve termodinamik değerleri.

Aptamer Adı	T_m (°C)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/(K.mol))
A1	49	- 4,25	- 113,3	- 351,6
A83	61,7	- 9,77	- 132	- 394,1
B13	51,3	- 4,88	- 110,3	- 339,9
B40	57,1	- 6,60	-108,1	-327,2

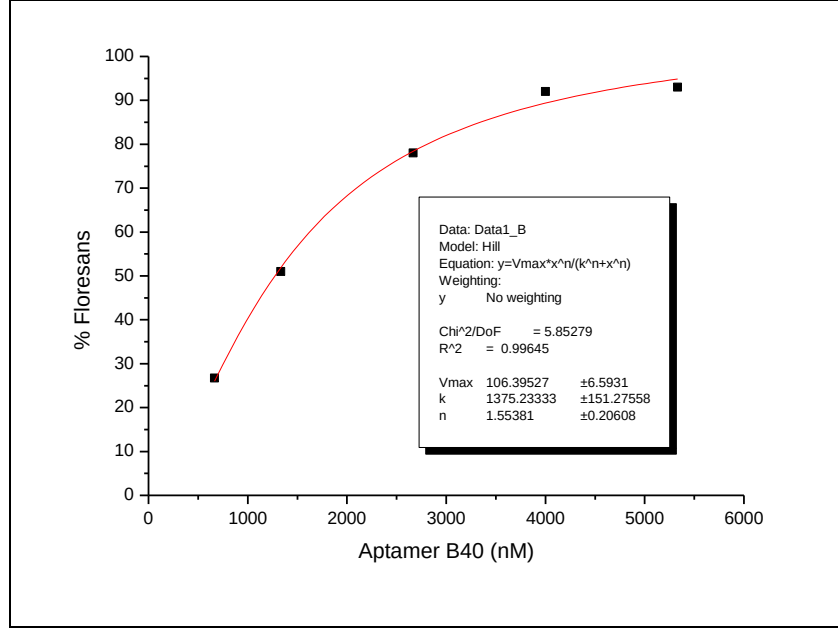
4.5. Bağlanma Deneyleri (Akış Sitometri Deneyleri)

Elde edilen 4 aptamerin (A1, A83, B13, B40) *S. pneumoniae* bakterisine bağlanma özellikleri akış sitometri ile analiz edilmiştir. Aptamer konsantrasyonları 666-5333 nM aralığında değiştirilirken bakteri miktarı sabit (3×10^8 CFU) tutulmuştur. Aptamer A1, A83 ve B13 ile yapılan ölçümler, sadece bakteri (hiçbir aptamer içermeyen) ile yapılan ölçümlerle aynı sonuç vermiştir (veri gösterilmedi). Bu da bize bu aptamerlerin *S. pneumoniae* bakterisine bağlanmadığını göstermiştir.

Aptamer B40 ile yapılan çalışmalarda aptamer konsantrasyonuyla birlikte floresans şiddetinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Bu sonuçlar aptamer B40'ın *S. pneumoniae* bakterisine bağlandığını göstermektedir. Şekil 4.13'ten elde edilen değerler Hill denklemiyle analiz edildiğinde yarı-doygunluk konsantrasyonu (K_d değeri) 1375 ± 151 nM ve Hill katsayısı (n değeri) ise 1.55 ± 0.20 olarak bulunmuştur (Şekil 4.14). Hill katsayısının, $n > 1$ olması aptamer bağlanmasında pozitif kooperativite olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.13: FAM-işaretli aptamer B40'ın *S. pneumoniae* bakterisine bağlanma deneylerinden elde edilen akış sitometri analiz sonuçları. Aptamer B40'ın konsantrasyonları grafikte verilen değerlerde kullanılmıştır. Bakteri miktarı sabit (3×10^8 CFU) tutulmuştur. Diğer şartlar Kısım 3.2.4.1'de verilmiştir. Y eksen (count) bakteri sayısını, X eksen floresans şiddetini göstermektedir.



Şekil 4.14: Aptamer B40’ın *S. pneumoniae* bakterisine bağlanma eğrisi. Akış sitomeri analiz sonuçlarından elde edilen veriler Hill denkleminde nonlineer fit edilerek bu eğri elde edildi. “Fitting” sonuçları grafik içinde verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *S. pneumoniae* bakterisine karşı aptamer seçimi gerçekleştirilmiştir. Seçim işleminde tüm bakteri hücresi kullanılarak, bakteri üzerindeki hedef moleküllerin önceden saflaştırılması ve bir matrikse bağlanması gibi ek işlemlerden kaçınılmıştır. Ayrıca, seçim işleminde aynı cinsten olan *S. sanguinis* bakterisi kullanılarak karşıt-SELEX işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece SELEX sonunda elde edilecek aptamer(ler)in *S. pneumoniae*'ya karşı özgünlüğünün artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca karşıt-SELEX uygulandığında daha az SELEX döngüsü yapılmaktadır. SELEX işlemlerinde normalde 15-20 döngü uygulanırken karşıt-SELEX uygulandığında toplamda 7-10 SELEX döngüsü yeterli gelmektedir. Bu çalışmada da karşıt-SELEX işlemi uygulanarak toplamda 8 SELEX döngüsü yeterli görülmüştür.

Her bir SELEX işleminden sonra geri kazanılan aptamerler PZT ile çoğaltılıp, beklenildiği gibi sadece 75 baz uzunluğunda ürün elde edilmiştir. Daha sonra, eş olmayan PZT işlemi uygulanarak aptamerler %99 oranında tek zincirli hale getirilerek bir sonraki SELEX işlemine geçilmiştir. SELEX işlemleri bittikten sonra ise ligasyon, klonlama ve transformasyon adımları izlenerek seçilen örnekler dizi analizine gönderilmiş ve sadece 4 tane aptamerin (A1, A83, B13, B40) istenilen 75 baz uzunluğunda oldukları görülmüştür. Bu 4 aptamer bağlanma çalışmalarında kullanılmak üzere FAM işaretli olarak satın alınmıştır. Aptamerlerin hedef bakteriye bağlanma özellikleri akış sitometri ile analiz edilmiştir. Akış sitometri analizleri sonucunda sadece aptamer B40'ın zayıf bağlandığı ($K \approx 1375 \pm 151$ nM) diğerlerinin ise hemen hemen hiç bağlanmadığı bulunmuştur. Literatürde bakterilere karşı seçilen aptamerlerin bağlanma değerleri (K_d) genelde 10-300 nM arasında verilmektedir [Hamula et al., 2008], [Dwivedi et al., 2010], [Duan et al., 2012]. Bu sonuçlar doğrultusunda bulunan K değeri yüksek kalmaktadır.

Yapılan SELEX ve karşıt-SELEX işlemlerinden sonra *S. pneumoniae* bakterisine spesifik ve kuvvetli bağlanan bir aptamerin elde edilememesinin farklı nedenleri olabilir. Nedenlerden biri olarak en başta karşıt-SELEX işlemi akla gelmektedir. Karşıt-SELEX her ne kadar başlangıç aşamasında aptamer adaylarının sayısını düşürse de, ilk karşıt-SELEX işleminde karşıt hedefe (*S. sanguinis*) zayıf ya

da kuvvetli bağlanan tüm aptamerler elenebilmektedir. Bu durumda da karşıt hedefe zayıf bağlanan ama asıl hedef bakteriye (*S. pneumoniae*) güçlü bağlanabilecek olan aptamer adaylarının da elenme ihtimâli bulunmaktadır. Çalışmada karşıt-SELEX işlemini yapmak yerine hem asıl hedefe hem de karşıt hedefe seçim işlemi paralel olarak gerçekleştirilebilirdi. Böylece potansiyel aday kaybı ortadan kaldırılabilirdi. Fakat bu durumda da seçiciliği arttırmak için SELEX döngü sayısının artması gerekecekti. Bunun neticesinde de bu paralel seçimler sonunda hem elde edilecek aptamer adaylarının sayısı fazlalaşacaktı hem de bu adayların her birini bağlanma çalışmasında denemek üzere FAM işaretli olarak satın almak gerekecekti. Tek bir aptamer adayının ticari olarak satın alınan FAM işaretli saf hâli 1000 TL'nin üstünde olduğundan bu kadar adayın bağlanma çalışmasında denenmesinin maliyeti çok büyük olacaktı.

Kuvvetli bağlanan bir aptamerin elde edilememesinin diğer bir nedeni olarak ise geri kazanım (elüsyon) aşaması düşünülmektedir. Bu aşamada *S. pneumoniae* bakterisine bağlanmış olan aptamerler geri kazanılmaktadır. Geri kazanım işlemleri genellikle yüksek tuz veya denaturant (SDS, üre vb.) içeren elüsyon tamponu ve yüksek sıcaklık (95 °C) ile gerçekleştirilmektedir [Mascini, 2009]. Bu çalışmada filtreli tüplerle çalışıldığından dolayı geri kazanım işlemlerinde yüksek sıcaklık kullanılmamıştır; sadece yüksek Mg^{2+} (20 mM) içeren tampon (100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH 8.3) kullanılmıştır. Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi divalent metal iyonları, DNA'nın fosfat gruplarına bağlanarak DNA'nın hedef moleküllerle yaptığı iyonik etkileşimlere engel olmaktadır. Ancak, bazı durumlarda da (örneğin hedef üzerindeki negatif yüklü gruplarla) bu metal iyonları köprü görevi yaparak etkileşimi artırabilmektedir. Bu ikinci durumda, bağlanan aptamerlerin elüsyonu kullanılan tamponla mümkün olmayacaktır. Bu durum başta düşünülememiştir. En azından, geri kazanım tamponunun içine SDS ve üre gibi proteinleri denatüre edici maddeler eklenmiş olsaydı daha güçlü bir geri kazanım işlemi gerçekleştirilebilirdi.

Ortaya çıkan sonuçların ışığında tartışılması gereken bir diğer nokta da yalancı pozitif sonuçlardır. Elde edilen 4 aptamerden sadece 1 tanesinin zayıf bağlanması ve diğer 3 tanesinin hemen hemen hiç bağlanmaması, SELEX işleminin yalancı pozitif sonuç verebileceğini de göstermektedir. Bunun olası nedeni olarak, bağlanma koşullarından dolayı (pH, aptamer-bakteri derişimi, sıcaklık) aptamerlerin asıl hedefin haricinde tüp çeperlerine veya çeperleri kaplamak için kullanılan BSA'ya da

bağlanmış olabileceği ihtimâli söylenebilir. Ayrıca, her ne kadar bağlanmayan aptamerler en az 5 sefer yıkanarak uzaklaştırılsa bile, ortamda bir tane bile kalması PZT ile çoğaltılmasına yetmektedir. Bunu engellemek için filtreli tüp kullanmak yerine hedef moleküller bir yüzeye tutundurulabilirdi [He et al., 2011], [Ogasawara et al., 2007]. Böylece yıkama işleminde hedef moleküle bağlanmış olan aptamerler ortamda kalırken bağlanmayan aptamerler ortamdan uzaklaştırılarak daha keskin bir ayırıştırma sağlanabilirdi. Fakat bu işlemler hem ek süre gerektirecekti hem de ekstra maddi külfete neden olacaktı.

Gelecekte tüm bu noktalar göz önünde bulundurularak daha etkin SELEX işlemi gerçekleştirilebilir. Böylece hedef moleküle yüksek özgünlükte bağlanan aptamerler elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Aaij C., Borst P., (1972), "The gel electrophoresis of DNA", *Biochimica Et Biophysica Acta*, 269 (2), 197-200.
- Armengol C. E., Schlager T. A., Hendley J. O., (2004), "Sensitivity of a Rapid Antigen Detection Test for Group A Streptococci in a Private Pediatric Office Setting: Answering the Red Book's Request for Validation", *Pediatrics*, 113 (4), 924-926.
- Bozkaya E., (2005), "Tıbbi Mikrobiyoloji -2- İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları", 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi
- Bruno J. G., Kiel J. L., (1999), "In vitro Selection of DNA Aptamers to Anthrax Spores with Electrochemiluminescence Detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (5), 457-464.
- Cao X., Li S., Chen L., Ding H., Xu H., Huang Y., Li J., Liu N., Cao W., Zhu Y., Shen B., Shao N., (2009), "Combining Use of a Panel of ssDNA Aptamers in The Detection of *Staphylococcus aureus*", *Nucleic Acids Research*, 37 (14), 4621-4628.
- Chen F., Zhou J., Luo F., Mohammed A. B., Zhang X. L., (2007), "Aptamer from Whole-Bacterium SELEX as New Therapeutic Reagent Against Virulent *Mycobacterium tuberculosis*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357 (3), 743-748.
- Cortes P. R., Orio A. G. A., Regueira M., Pinas G. E., Echenique J., (2008), "Characterization of In Vitro-Generated and Clinical Optochin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Argentina", *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1930-1934.
- Derbyshire N., White S. J., Bunka D. H. J., Song L., Stead S., Tarbin J., Sharman M., Zhou D., Stockley P. G., (2012), "Toggled RNA Aptamers Against Aminoglycosides Allowing Facile Detection of Antibiotics Using Gold Nanoparticle Assays", *Analytical Chemistry*, 84 (15), 6595-6602.
- Duan N., Wu S., Chen X., Huang Y., Wang Z., (2012), "Selection and Identification of a DNA Aptamer Targeted to *Vibrio parahemolyticus*", *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 60 (16), 4034-4038.
- Dwivedi H. P., Smiley R. D., Jaykus L. A., (2010), "Selection and Characterization of DNA Aptamers With Binding Selectivity to *Campylobacter jejuni* Using Whole-Cell SELEX", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (6), 2323-2334.
- Ellington A. D., Szostak J. W., (1990), "In vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands", *Nature*, 346 (6287), 818-822.

Hamula C. L. A., Le X. C., Li X. F., (2011), "DNA Aptamers Binding to Multiple Prevalent M-Types of *Streptococcus pyogenes*", *Analytical Chemistry*, 83 (10), 3640–3647.

Hamula C. L. A., Zhang H., Guan L. L., Li X. F., Le X. C., (2008), "Selection of Aptamers Against Live Bacterial Cells", *Analytical Chemistry*, 80 (20), 7812–7819.

He J., Liu Y., Fan M., Liu X., (2011), "Isolation and Identification of the DNA Aptamer Target to Acetamiprid", *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59 (5), 1582–1586.

Herr J. K., Smith J. E., Medley C. D., Shangguan D., Tan W., (2006), "Aptamer-Conjugated Nanoparticles for Selective Collection and Detection of Cancer Cells", *Analytical Chemistry*, 78 (9), 2918-2924.

Iliuk A. B., Hu L., Tao W. A., (2011), "Aptamer in Bioanalytical Applications", *Analytical Chemistry*, 83 (12), 4440–4452.

Joshi R., Janagama H., Dwivedi H. P., Kumar T. M. A. S., Jaykus L. A., Scheifers J., Sreevatsan S., (2008), "Selection, Characterization, and Application of DNA Aptamers for the Capture and Detection of *Salmonella enterica* Serovars", *Molecular and Cellular Probes*, 23 (1), 20-28.

Kaijalainen T., (2006), "The Identification of *Streptococcus pneumoniae*", *Publications of the National Public Health Institute*, A (11), 16-34.

Kheyraadi L. K., Mehrgardi M. A., (2012), "Aptamer-Conjugated Silver Nanoparticles for Electrochemical Detection of Adenosine Triphosphate", *Biosensors and Bioelectronics*, 37 (1), 94-98.

Kulbachinskiy A. V., (2007), "Methods for Selection of Aptamers to Protein Targets", *Biochemistry-Moscow*, 72 (13), 1505-1518.

Li H., Ding X., Peng Z., Deng L., Wang D., Chen H., He Q., (2011), "Aptamer Selection for the Detection of *Escherichia coli* K88", *Canadian Journal of Microbiology*, 57 (6), 453-459.

Mascini M., (2009), "Aptamers In Bioanalysis", 1st Edition, Wiley & Sons, Inc. Publication.

Masoudipour E., Mousavi S. L., Basiri M., (2011), "Specific Detection of *Shigella sonnei* by Enzyme-Linked Aptamer Sedimentation Assay", *Progress in Biological Sciences*, 1 (1), 11-15.

McFarland, J., (1907), "The Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.", *Journal of The American Medical Association*, 49 (14), 1176.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., (1986), "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51 (1), 263-273.

Ogasawara D., Hasegawa H., Kaneko K., Sode K., Ikebukuro K., (2007), "Screening of DNA Aptamer Against Mouse Prion Protein by Competitive Selection", Landes Bioscience, 1 (4), 248-254.

Pavlov V., Shlyahovsky B., Willner I., (2005), "Fluorescence Detection of DNA by the Catalytic Activation of an Aptamer/Thrombin Complex", Journal of The American Chemical Society, 127 (18), 6522-6523.

Pikis A., Campos J. M., Rodriguez W. J., Keith J. M., (2001), "Optochin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, Significance, and Clinical Implications", Journal of Infectious Diseases, 184 (5), 582-590.

Ryan K. J., Ray C. G., Sherris J. C., Champoux J. J., Neidhardt F. C., Drew W. L., Plorde J. J., Marchalonis J. J., Falkow S., Robinovitch M. R., (2004), "Sherris Medical Microbiology", 4th Edition, McGraw-Hill Medical Publishing.

Selvakumar L. S., Thakur M. S., (2012), "Nano RNA Aptamer Wire for Analysis of Vitamin B₁₂", Analytical Biochemistry, 427 (2), 151-157.

Smith J. E., Medley C. D., Tang Z., Shangguan D., Lofton C., Tan W., (2007), "Aptamer-Conjugated Nanoparticles for the Collection and Detection of Multiple Cancer Cells", Analytical Chemistry, 79 (8), 3075-3082.

Spiridonova V. A., Rog E. V., Dugina T. N., Strukova S. M., Kopylov A. M., (2003), "Aptamer DNA: A New Type of Thrombin Inhibitors", Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 29 (5), 495-498.

Tang Z., Shangguan D., Wang K., Shi H., Sefah K., Mallikratchy P., Chen H. W., Li Y., Tan W., (2007), "Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells", Analytical Chemistry, 79 (13), 4900-4907.

Tsukakoshi K., Abe K., Sode K., Ikebukuro K., (2012), "Selection of DNA Aptamers That Recognize α -Synuclein Oligomers Using a Competitive Screening Method", Analytical Chemistry, 84 (13), 5542-5547.

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

Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T., (2003), "The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures", Experimental and Molecular Medicine, 35 (6), 527-533.

Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M., Shen B., Shao N., (2003), "Single-Stranded DNA Aptamers That Bind Differentiated But Not Parental Cells: Subtractive Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment", *Journal of Biotechnology*, 102 (1), 15-22.

Xian W. Y., Zhong Y. Z., Yan S. C., Bin Y. Y., (2012), "Application of Aptamer Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microorganisms", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40 (4), 634-642.

Yasun E., Gulbakan B., Ocsoy I., Yuan Q., Shukoor M. I., Li C., Tan W., (2012), "Enrichment and Detection of Rare Proteins with Aptamer-Conjugated Gold Nanorods", *Analytical Chemistry*, 84 (14), 6008-6015.

Zhou Q., Liu Y., Shin D. S., Silangcruz J., Tuleuova N., Revzin A., (2012), "Aptamer-Containing Surfaces for Selective Capture of CD4 Expressing Cells", *Langmuir*, 28 (34), 12544-12549.

Zhu Z., Ravelet C., Perrier S., Guieu V., Fiore E., Peyrin E., (2012), "Single-Stranded DNA Binding Protein-Assisted Fluorescence Polarization Aptamer Assay for Detection of Small Molecules", *Analytical Chemistry*, 84 (16), 7203-7211.

ÖZGEÇMİŞ

Özgür GÖKMEN, 1986 yılında Düzce’de doğmuştur. İlköğretim eğitimini Körfez Petkim İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini Yarımca Süper Lisesi’nde tamamlamıştır. 2005 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümüne kaydolup 2009 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans öğrenimine başladı.