

**İMPLANT KAYNAKLI ENFEKSİYON ETKENİ OLAN
Staphylococcus epidermidis'e ÖZGÜ APTAMER
GELİŞTİRİLMESİ VE APTAMERİN BİYOFİLM
OLUŞUMUNA ETKİSİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA
İNCELENMESİ**

**DEVELOPMENT OF SPECIFIC APTAMER FOR
Staphylococcus epidermidis WHICH CAUSES IMPLANT
RELATED INFECTIONS AND *İN VİTRO* INVESTIGATION
OF APTAMER'S EFFECT ON BIOFILM FORMATION**

EMİNE ALTUN

PROF. DR. HÜLYA YAVUZ ERSAN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Canım Ailem'e

ÖZET

İmplant kaynaklı enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus epidermidis*'e özgü aptamer geliştirilmesi ve aptamerin biyofilm oluşumuna etkisinin *in vitro* koşullarda incelenmesi

Emine ALTUN

Doktora, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Aralık 2022, 102 sayfa

Çeşitli hastalıklar ile birlikte kazalar sonucunda hasar alan ya da kaybedilen doku veya organların yerini alan biyomalzemelerle ilgili klinikte karşılaşılan en büyük sorunlardan biri enfeksiyon oluşumudur. Enfeksiyon oluşumuna biyofilm oluşturarak sebep olan etkenlerin başında *Staphylococcus epidermidis* gelmekte olup, bu bakteri normal deri florasının bir elemanı olmasına rağmen implantasyon sırasında vücut içerisine girerek patojen konuma geçmektedir. Biyofilm oluşumu sonrasında rutin antibiyotik tedavileri yeterli olmamakla birlikte, birçok dezavantajı da bulunmaktadır. Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabilecek veya destekleyici yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışması kapsamında implant kaynaklı osteomyelit oluşumuna neden olan *S. epidermidis* bakterisinin biyofilm ilişkili Aap (birikimle ilişkili protein) proteininin ait iki farklı bölgesine karşı SELEX (üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi) yöntemi ile aptamer seçilimi yapılmış ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri hem kitosan

ile kaplama yapılan hem de yapılmayan titanyum yüzeylerinde incelenmiştir. İlk aşamada A1.0, B1.0 ve B1.5 olmak üzere Aap proteininin farklı alt-kısımlarının kombinasyonları yapılarak rekombinant üretimi sağlanmıştır. A1.0 ve B1.0 adlı parçaları daha yüksek oranda ve miktarda saflaştırıldığı için, bu parçaların afinite immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada SELEX yönteminde kullanılacak olan aptamer kütüphanesi ve primerleri tasarlanarak sentezletirilmiştir. Primerler ile aptamer kütüphanesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve uygunluğunun belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sekiz SELEX döngüsü sonrasında elde edilen aptamer havuzunun klonlanarak dizi analizi yapılmış ve seçilen aday aptamerlerin ayrılma sabitleri ELONA (Enzime Bağlı Oligonükleotid Analizi) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. En son aşamada ise titanyum yüzeylerinin kitosan ile kaplanmasında farklı molekül ağırlığı ve derişimi kullanılmış olup, yüzeylerin karakterizasyonu SEM, EDX ve ATR-FTIR analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Seçilen aday aptamerlerin kitosan ile kaplama yapılan ve yapılmayan titanyum yüzeyler üzerindeki etkisi hem kristal viyole kullanılarak yapılan mikroplak testi hem de SEM analiz sonuçları ile tespit edilmiştir. Seçilen 6 aday aptamer içerisinde en yüksek bağlanma afinitesine (10,2 nM) sahip olan ve biyofilm oluşumu üzerinde en etkili olan aptamerin AC31 kodlu aptamer olduğu belirlenmiştir. AC31 aptameri varlığında, kaplama yapılmayan titanyum yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunu engelleme oranının en az 4-kat olduğu, kitosan ile kaplama yapılan titanyum yüzeylerde ise en az 2-kat olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *S. epidermidis* bakterisinin biyofilm ilişkili Aap proteinine ait iki farklı bölgesine karşı SELEX yöntemi ile aptamer seçilimi ilk kez bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir. AC31 aptamerinin, titanyum yüzeyler üzerinde *S. epidermidis*'in yapışma mekanizması üzerinde etkisini göstererek biyofilm oluşumuna engel olduğu gösterilmiş ve yapılacak *in vivo* çalışmaların ardından terapötik ajan olarak kullanımının önü açılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aptamer, Biyofilm, İmplant, Enfeksiyon, *Staphylococcus epidermidis*, Aap (Birikimle İlişkili Protein)

ABSTRACT

Development of specific aptamer for *Staphylococcus epidermidis* which causes orthopedic implant related infections and *in vitro* investigation of aptamer's effect on biofilm formation

Emine ALTUN

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

December 2022, 102 pages

One of the biggest problems encountered in the clinic regarding biomaterials that replace tissues or organs damaged or lost because of accidents along with various diseases is the occurrence of infection. *Staphylococcus epidermidis* is the leading cause of infection by forming a biofilm, and although this bacterium is an element of the normal skin flora, it enters the body during implantation and becomes a pathogen. While routine antibiotic treatments are not sufficient after biofilm formation, they also have many disadvantages. Therefore, alternative or supplemental methods to antibiotics are needed.

Within the scope of the thesis, aptamer selection was made against two different domains of the biofilm-associated Aap (accumulation associated protein) protein of *S. epidermidis*

bacteria, which causes the formation of implant-associated osteomyelitis, with the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) method and its effects on biofilm formation were investigated on both chitosan-coated and uncoated titanium surfaces. In the first stage, recombinant production was provided by making different combinations of Aap protein domains, A1.0, B1.0 and B1.5. Since the A1.0 and B1.0 domains were purified at a higher rate and amount, the immobilization process was carried out with these domains. In the next step, the aptamer library and primers to be used in the SELEX method were designed and synthesized. Polymerase chain reaction (PCR) optimization studies were carried out to amplify the primers and the aptamer library, and to determine their suitability. Sequence analysis was performed following cloning the aptamer pool obtained after 8 cycles of SELEX, and the dissociation constants of the selected candidate aptamers were determined using the ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay) method. In the last step, different molecular weights and concentrations were used in the coating of titanium surfaces with chitosan, and SEM, EDX and ATR-FTIR analyzes were used in the characterization of the surfaces. The effect of selected candidate aptamers on chitosan coated and uncoated titanium surfaces was determined by both microplate test using crystal violet and SEM analysis results. Among the 6 selected candidate aptamers, the aptamer with the highest binding affinity (10.2 nM) and the most effective on biofilm formation was determined to be the aptamer coded as AC31. In the presence of the AC31 aptamer, it was determined that the rate of preventing biofilm formation on uncoated titanium surfaces was at least 4-fold, and at least 2-fold on titanium surfaces coated with chitosan.

As a result, aptamer selection by SELEX method against two different domains of the biofilm-induced Aap protein of *S. epidermidis* bacteria was performed for the first time within the scope of this study. AC31 aptamer has been shown to prevent biofilm formation by showing its effect on the adhesion mechanism of *S. epidermidis* on titanium surfaces, and paved the way for its use as a therapeutic agent following *in vivo* studies.

Keywords: Aptamer, Biofilm, Implant, Infection, Staphylococcus epidermidis, Accumulation Associated Protein (Aap)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yapmış olduğu eleştirilerle yol gösteren ve beni her koşulda destekleyip güven veren, her zaman yanımda olan danışmanlarım sayın Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN ve Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR' a,

Tez sürecim boyunca yönlendirmeleri ve destekleri için tez izleme komitemde yer alan sayın Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR ve Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR' a,

118Z798 numaralı 1001 projesi kapsamında tez çalışmalarımı maddi yönden destekledikleri ve bu projeden vermiş oldukları burs desteği için TÜBİTAK'a,

Analizlerdeki titiz çalışmalarından dolayı HÜNİTEK'e ve H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü Merkez Laboratuvarına,

Tanıştığım zamandan itibaren tez çalışmalarım aşamasında yanımda olup destek veren, birlikte güzel anlar paylaştığım arkadaşlarım Dr. İlkay Koçer Kuloğlu, Dilek Şahinbaş, Selen Cilasun, Neslişah Cihan ve tüm Araştırma Laboratuvarı 5 ile Araştırma Laboratuvarı 17'de çalıştığım, birlikte vakit geçirdiğim herkese,

Her türlü zorluğa rağmen beni destekleyen, her zaman arkamda olduklarını hissettiren, varlıkları ile bana güç veren, değerli annem ve abilerime verdikleri karşılıksız emek ve sevgi için,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Emine ALTUN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İmplantlar	5
2.1.1. Titanyum İmplantlar	5
2.1.2. Titanyum İmplant Kaynaklı Sorunlar	6
2.1.3. Biyofilm	6
2.1.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i> Kaynaklı Biyofilm Oluşum Mekanizması.....	9
2.2. Aptamerler.....	14
2.2.1. SELEX Yöntemi ile Aptamer Seçimi	15
2.2.2. Aptamer Uygulama Alanları.....	18
2.2.2.1. Tanı.....	18
2.2.2.2. Tedavi.....	19
2.2.2.3. Analitik Uygulamalar	19
2.3. Kitosan.....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	23
3.1. Rekombinant Aap Proteininin Elde Edilmesi	23
3.1.1. Rekombinant Aap Proteinini Üretimi için Vektör Tasarımı	23
3.1.2. Rekombinant Aap Proteinini Üretimi için Primer Tasarımı	24
3.1.3. Liyofilize Haldeki Suşun Canlandırılması ve Stokların Hazırlanması	24

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	25
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.1.6. Hedef (Gen Bölgelerinin) DNA'nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu	26
3.1.7. <i>E. coli</i> 'den Plazmid DNA'nın İzolasyonu	26
3.1.8. DNA'nın Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesimi	27
3.1.9. Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması	27
3.1.10. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon).....	27
3.1.11. <i>E. coli</i> 'nin CaCl ₂ Metodu ile Transformasyonu	28
3.1.12. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi.....	29
3.2. Aap Proteininin Saflaştırılması ve Analizi	29
3.2.1. Toplam Protein Derişimi	30
3.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	30
3.2.3. Western Aktarım (Blotting).....	30
3.2.4. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu	31
3.3. Aptamerlerin Hazırlanması.....	32
3.3.1. DNA Aptamer Kütüphanesi Tasarımı	32
3.3.2. Aptamerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Optimizasyon Deneyleri... ..	33
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Aptamerlerin Analizi	34
3.3.4. Üre-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Üre-PAGE)	34
3.3.5. ssDNA'nın Üre-PAGE Jelinden Ekstraksiyonu ve Etanol ile Çöktürülmesi	35
3.4. SELEX Deneyleri	35
3.4.1. Bağlama	36
3.4.2. Yıkama.....	36
3.4.3. Elüsyon	36
3.4.4. ssDNA Havuzunun Oluşturulması.....	37
3.5. ELONA (Enzim Bağlı Oligonükleotid Analizi)	37
3.6. Aptamer Havuzlarının Klonlanması, Dizi Analizi ve Karakterizasyonunun Yapılması	38
3.6.1. PZR, Agaroz Jel Elektroforezi ve PZR Sonrası Saflaştırma	39
3.6.2. Aptamerlerin Ucuna Adenin Bazı Eklenmesi.....	40
3.6.3. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon).....	40
3.6.4. Transformasyon	41

3.6.5. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi	42
3.7. Titanyum Disklerin Hazırlanması	42
3.7.1. Kitosan Kaplı Disklerin Hazırlanması	42
3.7.2. Kitosan ile Kaplanan Titanyum Yüzeylerin Karakterizasyonu.....	43
3.7.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	43
3.7.2.2. ATR-Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi.....	43
3.7.2.3. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (EDX)	43
3.8. Aptamerlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	43
3.8.1. Biyofilm İnhibisyon Testi (Mikroplak Yöntemi).....	43
3.8.2. SEM Analizi.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Rekombinant Aap Proteininin Elde Edilmesi	45
4.1.1. Rekombinant Aap Proteinini Üretimi için Vektör ve Primer Tasarımı.....	45
4.1.2. PZR ve Agaroz Jel Elektroforezi	45
4.1.3. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi	46
4.2. Aap Proteininin Saflaştırılması ve Analizi.....	48
4.2.1. Total Protein Derişimi.....	48
4.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	48
4.2.3. Western Aktarım (Blotting)	51
4.2.4. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu.....	52
4.3. Aptamerlerin Hazırlanması	54
4.3.1. DNA Aptamer Kütüphanesi Tasarımı.....	54
4.3.2. PZR Optimizasyon Çalışmaları ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	54
4.3.3. Üre-PAGE	60
4.4. SELEX Deneyleri.....	61
4.4.1. ELONA Testi	63
4.5. Aptamer Havuzlarının Klonlanması, Dizi Analizi ve Karakterizasyonunun Yapılması.....	64
4.5.1. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi	64
4.5.2. Aday Aptamerlerin Ayrılma Sabitlerinin Hesaplanması	67
4.6. Kitosan Kaplı Titanyum İmplantların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	72
4.6.1. SEM Analizi.....	72

4.6.2. ATR- FTIR Spektroskopisi.....	73
4.6.3. EDX Analizi	74
4.7. Aptamerlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	75
4.7.1. Biyofilm İnhibisyon Testi (Mikroplak Yöntemi)	75
4.7.2. SEM Analizi	78
5. YORUM.....	82
6. KAYNAKLAR	84
EKLER.....	94
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm oluşma evreleri [32].	7
Şekil 2.2. <i>S. epidermidis</i> 'in biyofilm oluşturmasında rol oynayan etkileşimler [34].	10
Şekil 2.3. Polisakkarit aracılı biyofilm oluşumunda rol oynayan PIA mekanizması [43].	11
Şekil 2.4. Aap proteinine ait bölgelerinin yapısı [43].	12
Şekil 2.5. Aap protein bölgelerinin <i>S. epidermidis</i> suşları arasındaki farklılık gösterme durumu [44].	12
Şekil 2.6. Aap proteininin A ve B bölgelerinin protein aracılı biyofilm oluşum mekanizmasındaki rolleri [44].	13
Şekil 2.7. SELEX yöntemi [54]	16
Şekil 3.1. Aap proteininin rekombinant olarak üretilen bölgelerinin gen kaseti görüntüsü.	23
Şekil 4.1. A1.0, B1.0 ve B1.5 gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü	46
Şekil 4.2. Restriksiyon enzimleri ile ikili kesim sonrası örneklerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1. kuyu, hedef gen; 2. kuyu, kesilmemiş plazmid; 3-7. kuyular, transformasyon sonrası seçilen kolonilere ait örnekler).	47
Şekil 4.3. B1.0, B1.5 rekombinant proteinlerinin periplazmik, A1.0 rekombinant proteinin ise sitoplazmik ortamda üretilmesi için a) 37°C, b) 30°C ve c) 20°C sıcaklıklarında IPTG ile indüklenmesi ile elde edilen SDS-PAGE görüntüsü	48
Şekil 4.4. B1.0 ve B1.5 rekombinant protein üretimlerinin sitoplazmik ortamda iki farklı konak hücrede a) 37°C, b) 30°C ve c) 20°C sıcaklıklarında IPTG ile indüklenmesi ile elde edilen SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; 1, boş pET-28a plazmidi; 2, 3, 4 <i>E. coli</i> BL21(DE3) B1.0; 6, 7, <i>E. coli</i> BLR(DE3) B1.0; 5, <i>E. coli</i> BL21(DE3) B1.5; 9, <i>E. coli</i> BLR(DE3) B1.5 bölgesi).	50
Şekil 4.5. B1.0, B1.5 ve A1.0 rekombinant protein bölgelerinin Western-aktarım görüntüsü	51

Şekil 4.6. A1.0 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon; E5, 5. elüsyon).....	52
Şekil 4.7. B1.0 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon; E5, 5. elüsyon).....	53
Şekil 4.8. B1.5 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon).....	53
Şekil 4.9. PZR yönteminde aptamer kütüphanesi-primer bağlanma sıcaklık taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	55
Şekil 4.10. PZR yönteminde primer miktarının taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	56
Şekil 4.11. PZR yönteminde Mg^{2+} miktarının taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	57
Şekil 4.12. PZR yönteminde farklı DNA polimeraz kullanımı sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	57
Şekil 4.13. PZR yönteminde döngü sayısı taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	58
Şekil 4.14. PZR yönteminde aptamer kütüphane miktarı taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	59
Şekil 4.15. aPZR yönteminde a) 10 döngü, b) 40 döngü sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.	60
Şekil 4.16. aPZR ürünlerinin üre-PAGE görüntüsü (1, aptamer kütüphanesi, 2-13 aPZR örnekleri).....	60
Şekil 4.17. a) A1.0 protein bölgesi ile etkileşen b) B1.0 protein bölgesi ile etkileşen ssDNA'ların aPZR ile çoğaltılması sonucu ürünlerinin üre-PAGE görüntüsü.	61
Şekil 4.18. SELEX döngüleri arasında A1.0 protein bölgesine ait ELONA test sonucu.	63
Şekil 4.19. SELEX döngüleri arasında B1.0 protein bölgesine ait ELONA test sonucu.	63

Şekil 4.20. Koloni PZR sonrası örneklerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü a) 1-14. kuyular, A1.0 protein bölgesi; b) 1-14. kuyular, B1.0 protein bölgesi ile etkileşen aptamer havuzunun transformasyonu sonrası seçilen kolonilere ait örnekler.....	65
Şekil 4.21. A1.0 protein bölgesi ile etkileşen aday aptamerlerin a) AC3, b) AC5, c) AC30, d) AC31 ikincil yapı tahminleri.	66
Şekil 4.22. B1.0 protein bölgesi ile etkileşen aday aptamerlerin a) BC2, b) BC5 ikincil yapı tahminleri.....	67
Şekil 4.23. A1.0 protein bölgesine aday aptamerin bağlanma durumları.	68
Şekil 4.24. B1.0 protein bölgesine aday aptamerlerin bağlanma durumları.	69
Şekil 4.25. AC31 aptamerinin farklı derişimlerde A1.0 protein bölgesine bağlanma durumu (ayrılma sabitinin hesaplanması).	69
Şekil 4.26. Seçilen aday aptamerlerin A1.0 protein bölgesine ve BSA proteinine bağlanma durumları.....	70
Şekil 4.27. Seçilen aday aptamerlerin B1.0 protein bölgesine ve BSA proteinine bağlanma durumları.	71
Şekil 4.28. AC31 aday aptamerinin serum ortamında stabilite testi sonrası üre-PAGE görüntüsü.....	72
Şekil 4.29. a) Kaplama yapılmamış titanyum yüzey, b) kitosan ile kaplama yapılmış yüzey.	72
Şekil 4.30. (a) kaplama yapılmamış titanyum yüzey (b) 1DMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (c) 2DMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (d) 1OMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (e) 2OMAK ile kaplanmış titanyum yüzey için FTIR spektrumları.	73
Şekil 4.31. Kaplanmamış titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.....	74
Şekil 4.32. IPTES ile muamele edilmiş titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.....	74
Şekil 4.33. GA ile muamele edilmiş titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.....	75
Şekil 4.34. Kitosan ile kaplama yapılmış olan titanyum yüzeye ait EDX spektrumu. ...	75
Şekil 4.35. Aday aptamerlerin kaplama yapılmayan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumu üzerine etkileri.	76
Şekil 4.36. AC31 aday aptamerin farklı derişimlerinin kaplama yapılmayan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumuna etkisi.	77
Şekil 4.37. AC31 aday aptameri eklenmeden ve eklenerek yapılan farklı derişimlerde kitosan ile kaplanan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumu.....	77

Şekil 4.38. Biyofilm inhibisyon çalışmalarına ait SEM görüntüleri (a) kaplama yapılmamış titanyum, (b) yalnız AC31 aptameri eklenmiş titanyum..... 78

Şekil 4.39. Biyofilm inhibisyon çalışmalarına ait SEM görüntüleri (a) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (b) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (c) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (d) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (e) 1OMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (f) 1OMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (g) 2OMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (h) 2OMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum..... 80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyofilm ilişkili enfeksiyon türleri ve neden olan mikroorganizmalar.....	9
Çizelge 2.2. Aptamer ile Antikor Karşılaştırılması [53]	15
Çizelge 2.3. Yıllara göre değişim gösteren SELEX yöntemlerinden örnekler [60].....	17
Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri.....	25
Çizelge 3.2. Restriksiyon enzimleri ile kesim işleminde kullanılan bileşenler.....	27
Çizelge 3.3. Ekleme reaksiyonunda kullanılan bileşenler.....	28
Çizelge 3.4. Tasarlanan aptamer kütüphanesi ve primer dizileri.	33
Çizelge 3.5. PZR tarama koşulları.	33
Çizelge 3.6. aPZR tarama koşulları.....	33
Çizelge 3.7. Üre-PAGE bileşenleri.	35
Çizelge 3.8. Optimize edilen PZR koşulları.....	39
Çizelge 3.9. A-bazı ekleme işleminde kullanılan bileşenler.	40
Çizelge 3.10. Ekleme reaksiyonunda kullanılan bileşenler.....	41
Çizelge 4.1. SELEX döngüleri sırasında kullanılan koşullar.....	62
Çizelge 4.2. Aday aptamerlerin ayrılma sabitleri.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
ng	Nanogram
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
M	Molar
V	Volt
s	Saniye
dk	Dakika
sa	Saat
K_d	Ayrılma sabiti
T_m	Erime sıcaklığı
kDa	Kilodalton

Kısaltmalar

Aap	Accumulation associated protein
aPZR	Asimetrik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ATR-FTIR	ATR-Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi
BSA	Bovin serum albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit

CIP	Calf Intestinal Phosphatase
dH ₂ O	Distile su
dsDNA	Çift zincirli DNA
EB	Elüsyon Tamponu
EDX	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
ELONA	Enzim Bağlı Oligonükleotid Analizi
GA	Gluteraldehit
IPTES	3-izosiyanotopropiltrioksisilan
IPTG	İzopropil tiyogalaktozit
LB	Lizojenik broth
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SELEX	Üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SOB	Zengin içerikli besiyeri
ssDNA	Tek zincirli DNA
TBE	Tris-Borate-EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
TSB-TSA	Tryptic soy broth-agar
Üre-PAGE	Üre-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosit

1. GİRİŞ

Yaşlılık, hastalık ve oluşan kazalara bağlı olarak yaşanan doku kayıplarında görülen artış, kaybedilen canlı dokunun yerini alabilecek biyomalzemelerin önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle günümüzde, biyolojik sistemlerle etkileşime geçtiğinde uyum sağlayabilen, kaybedilen veya hasarlı olan dokunun görevlerini yerine getirebilen, sentetik ya da doğal biyomalzemelerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Her yıl milyonlarca insanın etkilendiği kırıklarda, kemik ve eklemlerin dejeneratif hastalıklarında, doğuştan ve edinsel kemik rahatsızlıkların tedavisinde ortopedik implantlardan yararlanılmaktadır. Bu konuda sıklıkla kullanılan biyomalzemeler, mekanik dayanımlarının yüksek olması nedeniyle metalik malzemelerdir. Kullanılan metalik implant malzemelerinin başında titanyum, titanyum alaşımları, paslanmaz çelikler ve kobalt ile krom alaşımları gelmektedir [1]. Titanyum ve titanyum alaşımları yüksek dayanım, yüksek korozyon direnci, düşük özgül ağırlığı, vücut içerisinde inert bir yapı sergilemesi ile kemik ve diğer dokularla bütünleşebilme özelliklerinden dolayı ortopedide sıklıkla tercih edilen implant malzemeleridir [2, 3]. Titanyum implantlar ortopedik uygulamalarda diz, kalça, omurga, ayak bileği gibi eklem protezi olarak kullanılabilirler gibi plaka, vida, çivi gibi kemik sabitleme malzemeleri olarak da kullanılmaktadırlar.

Titanyum implant malzemelerinde karşılaşılan en büyük sorunlar, implant kaynaklı enfeksiyon oluşumu ve implantın kemikle yeterince bütünleşememesidir [4]. Titanyum ve titanyum alaşımı biyomalzemelerin, uzun dönem kullanımlarında bu özelliklerini arttırmak amacıyla çeşitli yüzey modifikasyonları uygulama çalışmaları yapılmaktadır [5]. Bu amaçla, bakterisid özelliğini aktif antimikrobiyal ajan salınımı yaparak gösteren antibiyotik içerikli modifikasyon çalışmaları [6, 7] yapılmakla birlikte, gümüş gibi inorganik antimikrobiyal ajanların çeşitli şekillerde modifiye edildiği çalışmalar [8] da yapılmaktadır. Ayrıca kitosan gibi polikatyonik özelliği nedeniyle, hem bakteri yapışması ve çoğalmasını engelleyecek hem de kemik doku hücrelerinin yapışmasını sağlayacak potansiyele sahip polimerlerle de kaplama çalışmaları yapılmaktadır [9]. Bu çalışmalarda kitosan tek başına kullanılabilirliği gibi başka polimerlerle birlikte de kullanılabilir [10].

Özellikle ortopedik implant uygulamalarında klinikte karşılaşılan en büyük sorun enfeksiyon oluşumudur. İmplantasyon sırasında kullanılan steril operasyon teknikleri, implantların cerrahi ameliyat öncesi rutinine bağlı olarak sterilize edilmesi veya ameliyat bölgesinin temizlenmesi enfeksiyon oluşumunu engellemek için yeterli olmamaktadır. Kemik dokuyla beraber çevre dokunun da hasarı ile sonlanan osteomyelit olarak isimlendirilen mikrobiyal enfeksiyon nedeni ile implant kaybı yaşanmakta ve buna bağlı olarak hastalar için maddi kayıpları da beraberinde getirmektedir. İmplant kaynaklı osteomyelit oluşumuna biyofilm oluşturarak neden olan ve klinik enfeksiyonlarda en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus epidermidis* gelmekte olup, bu bakteri normal deri florasının üyesi olmasına rağmen implantasyon sırasında vücut içerisine girerek enfeksiyon oluşumuna neden olmaktadır [11, 12]. Enfeksiyon oluşumu sırasında bakteri biyomalzeme yüzeyine tutunarak yüzeyde çoğalmaya başlamakta ve süreç biyofilm oluşumu ile sonlanmaktadır. Bu süreçte etkili olan yapı biyofilm oluşumu ile ilgili olan proteinlerdir. *S. epidermidis* için bu proteinlerden en önemlisi Aap (Accumulation associated protein) olup, bu protein hem bakteri hücrelerinin biyomalzeme yüzeyine yapışmasında hem de hücrelerin hücre-hücre etkileşimi kurarak biyofilm üretmek üzere birleşmesinde rol oynamaktadır [13].

Biyofilm tabakası, mikroorganizmaların kendilerini çeşitli mekanizmalar ile korumak için ürettikleri yapı olup enfeksiyonlarda organizmanın virülansına etki eden en önemli faktördür [14]. Biyofilm oluşumu gerçekleştikten sonra uygulanan rutin antibiyotik tedavileri implant kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engellemek için yeterli olmamakla birlikte birçok dezavantajı da beraberinde getirmektedir [15, 16]. Sistemik dolaşıma verilen yüksek antibiyotik dozları, hedeflenen bölgelerdeki enfeksiyonlara etkili olmakta yetersiz kalmakta ve vücutta bulunan normal bakteri florası üzerine de olumsuz etki göstermektedir [12]. Alınan yüksek doz antibiyotik hem flora elemanlarının hem de enfeksiyon etkeninin direnç kazanmasına neden olabilmekte ve tedavisi zor olan hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır [17]. Ayrıca metabolize edilemeden vücuttan atılabilme durumu olan antibiyotiklerin çevreye yayılması bu ortamlarda bulunan mikroorganizma gruplarının değişmesi ya da olumsuz etkilenmesi ile sonuçlanmaktadır [18]. Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabilecek yöntemlerle ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İmplant kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için en

etkili yöntem implant yüzeyinde biyofilm oluşumunu tamamen engellemek olup bu amaçla biyofilm oluşumu ile ilgili olan moleküllerin hedef olarak seçildiği uygulamalardan yararlanılabilir.

Aptamerler, üç boyutlu yapıları sayesinde hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikle bağlanabilen tek zincirli RNA veya DNA (ssDNA) oligonükleotidleridir [19, 20]. Metal iyonları, organik moleküller, proteinler, kanser hücreleri, bakteriler ve virüsler olmak üzere çok geniş bir hedef kitlesine bağlanma kapasitesine sahiptirler [21, 22]. Oluşturulan DNA kütüphanesinden hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikte bağlanabilme özelliğine sahip aptamerlerin seçimi SELEX yöntemi ile gerçekleştirilir. SELEX yöntemi canlı organizmalardan bağımsız şekilde *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntem birbirini takip eden bir seri işlemi kapsamakta olup bunlar; hedef molekül ile DNA kütüphanesinin inkübe edilerek uygun DNA zincirlerinin hedef bölgeye bağlanması, bağlanmayan moleküllerin ortamdan uzaklaştırılarak bağlanmış DNA moleküllerinin geri toplanması ve çoğaltılmasıdır [23, 24]. Aptamerler antikolar ile karşılaştırıldıklarında boyutlarının küçük olması, non immünolojik ve toksik ajanlara karşı üretilibilmeleri, farklılık göstermeyecek şekilde ve ucuz üretim prosesi ile sentezlenebilmeleri nedeniyle pek çok avantaja sahiptirler [24].

Tez çalışması kapsamında, implant ilişkili osteomyelit oluşumuna neden olan *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturma ile ilişkili proteini olan Aap'nin ilk aşamada A1.0, B1.0 ve B1.5 alt-kısımları olmak üzere farklı kombinasyonları yapılarak rekombinant üretimi sağlanmıştır. Üretimi sağlanan protein bölgeleri arasından en yüksek saflaştırma yüzdesine sahip olan A1.0 ve B1.0 ile aptamer seçilimi çalışmalarına devam edilmiş bunun için kobalt bağlı agaroz reçineler kullanılarak rekombinant proteinler üzerinde yer alan 6xHis etiketleri ile immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. SELEX yönteminde kullanılacak olan aptamer kütüphanesi ve primerleri tasarlanarak sentezlettirilmiş ve primerler ile aptamer kütüphanesinin PZR ile çoğaltılması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. En son SELEX döngüsünün ardından elde edilen aptamer havuzu klonlanarak dizi analizi yapılmış ve seçilen aday aptamerlerin ayrılma sabitleri (K_d) ile birlikte ikincil yapıları Mfold programı aracılığıyla belirlenmiştir. Titanyum yüzeylerinin kitosan ile kaplanması aşamasında iki farklı molekül ağırlığı ve derişimi kullanılmıştır. Kaplama

yapılan yüzeylerin karakterizasyonunda SEM, EDX ve ATR-FTIR analizlerinden yararlanılmıştır. Seçilen aday aptamerlerin kitosan ile kaplama yapılan ve yapılmayan titanyum yüzeyler üzerindeki etkisi hem kristal viyole kullanılarak yapılan mikropalak testi hem de SEM analiz sonuçları ile tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmplantlar

Çeşitli kazalar, hastalıklar sonucunda doku ve organların işlevlerini kaybetmesi nedeniyle kaybedilmiş olan bu doku ve organların yerini alabilecek biyomalzemelerin kullanımı her geçen gün daha fazla yaygınlaşmaktadır. Biyomalzemeler, insan vücudundaki kaybedilen ya da hasar gören doku ya da organların görevlerini yerine getirmek için kullanılan malzemeler olup uygulamalarda kullanılacak olan malzemelerin özellikle toksik olmaması, vücut içerisinde enflamasyona ya da herhangi bir alerjik reaksiyona neden olmaması dolayısıyla biyouyumluluk özelliğinin yüksek olması gerekmektedir [25]. Ayrıca bu tür uygulamalarda, mekanik özelliklerinin uygulanacak dokuya yakın olması, düşük korozyon ve aşınma dayanımına sahip olması, malzeme yüzeyinin çevre doku ile bütünleşmesi özelliğine sahip olması tercih edilme durumunu belirlemektedir. Metalik malzemeler diğer malzemelerle karşılaştırıldığında mekanik özellikler açısından daha üstün bir yapıya sahiptir. Bu sebeple kobalt krom alaşımları, paslanmaz çelik ile titanyum, titanyum alaşımları gibi metalik malzemeler, implant malzemesi olarak tercih edilmektedir [26]. Ayrıca titanyum ve titanyum alaşımlarının sahip olduğu yüksek korozyon direnci ve doku uyumu özellikleri uygulamalarda kullanımlarını arttırmaktadır [27].

2.1.1. Titanyum İmplantlar

Titanyum ve titanyum alaşımları yüksek korozyon direnci, vücut dokusunda inert olması ile dokulara yüksek uyum gösterebilme özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen metalik malzemelerdir [28]. Alüminyum (Al), vanadyum (V), molibden (Mo), zirkonyum (Zr) ve kalay (Sn) gibi elementler içerecek şekilde hazırlanan çeşitli Ti alaşımları bulunmakta ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Özellikle saf titanyum ile Ti-6Al-4V alaşımları ortopedik implant uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir [29].

Titanyumun vücut dokusunda göstermiş olduğu inert olma durumu, korozyon direnci ile sahip olduğu biyouyumluluk özelliği, yüzeyinde yer alan oksit katmanının yapısından kaynaklanmaktadır [30, 31]. Bu tabaka, titanyum yüzeyine protein, hücre gibi yapıların yapışması ile implantın kemikle bütünleşmesinde rol oynamaktadır.

2.1.2. Titanyum İmplant Kaynaklı Sorunlar

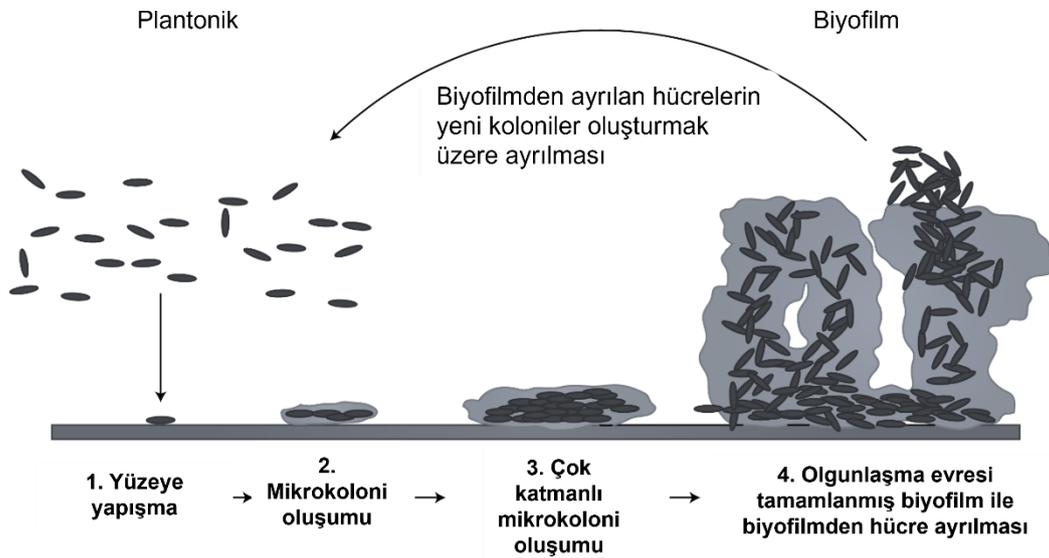
Titanyum implant malzemelerinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri implant kaynaklı enfeksiyon oluşumudur. Ortopedik implant uygulamalarında sıklıkla kullanılan titanyum ve titanyum alaşımlarında meydana gelen enfeksiyon oluşumu; ikincil bir operasyonla ile birlikte implant kaybına ek olarak maddi kayıplar ve enfeksiyonun sistemik dolaşımı etkilemesi sonucu ölüme kadar gidebilecek pek çok önemli sorunu da beraberinde getirmektedir. Titanyum ve titanyum alaşımı biyomalzemelerin, uzun dönem kullanımlarında bu özelliklerini arttırmak amacıyla çeşitli yüzey modifikasyonları yapılmaktadır. Bu amaçla antibakteriyel özelliğini, aktif antimikrobiyal ajan salınımı yaparak gösteren antibiyotik içerikli modifikasyon çalışmaları ile birlikte kitosan gibi hem antimikrobiyal özelliği olan hem de kemik doku hücrelerinin yapışmasını sağlayacak potansiyele sahip polimerlerin tek başına ya da konjuge edilerek kullanıldığı kaplama çalışmaları bulunmaktadır [10].

2.1.3. Biyofilm

Biyofilm tabakası, mikroorganizmaların kendilerini zorlu çevre koşullarına, antibiyotiklere ve antikora karşı korumak için ürettikleri yapı olup, enfeksiyonlarda organizmanın virulansına etki eden en önemli faktördür [14]. Biyofilm tabakası, mikroorganizma yüzeye yapıştıktan sonra oluşan mikrokoloniler ile üretilen hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler ile organik ve inorganik maddeleri içerisine çok katmanlı bir tabakadır.

Biyofilm oluşum süreci temel olarak serbest halde bulunan planktonik halde hücrelerin yüzeye yapışması, hücre-hücre arası etkileşimler sağlanarak mikrokolonilerin oluştuğu birikim evresi, hücre katmanlarının arttığı olgunlaşma evresi ve son aşamada ise planktonik hücrelerin yeni bölgelerde biyofilm oluşması ile sonlanacak olan ayrılma evresi olmak üzere dört aşamadan meydana gelmektedir [32]. Mikroorganizmaların doku ya da hücre ile canlı olmayan (vücuda implante edilen biyomalzeme yüzeyi) yüzeylere yapışması spesifik ya da spesifik olmayan etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Spesifik olmayan etkileşim türünde hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ya da Van der Waals etkileşimi ile geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Spesifik olan etkileşim türünde ise hücre-hücre ya da hücre-yüzey arasında polisakkaritler, hücre dışı DNA ya da

proteinler aracılığıyla geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. Birikim evresinde ise yüzeye tutunan mikroorganizmalar bölünerek çoğalır ve süreç mikrokolonilerin oluşumu ile sonlanır. Olgunlaşma evresinde mikrokoloni sayısının arttığı, oluşan kanallar aracılığı ile besin difüzyonunun sağlandığı ve mikroorganizmanın etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasına sağlayan Quorum Sensing (QS) sinyal sistemi rol oynayabilmektedir. Son evrede ise olgunlaşma evresi tamamlanan biyofilm tabakasının üst kısmından hücreler koparak yeni bölgelerde biyofilm oluşturmak üzere ayrılırlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşma evreleri [32].

Biyofilm tabakası, oluşum yerine göre canlı doku veya vücuda implante edilen biyomalzeme yüzeyi olarak ikiye ayrılabilir. Canlı dokularda oluşan biyofilm tabakasında mikroorganizmalar canlı dokulara tutunarak çoğalır ve süreç biyofilm oluşumu ile sonlanır. Canlı doku mikroorganizmaların spesifik yolla tutunması için uygun proteinlere sahip olmasının yanında mikroorganizmaların besin ihtiyaçlarını karşılayabilecek olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunarak biyofilm oluşumunu başlatan mikroorganizmalar uygun koşullar nedeniyle hızlı bir şekilde çoğalıp kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Normal flora elemanlarından olan mikroorganizmalar da patojenik hale geçerek biyofilm oluşturabilmektedir. Fırsatçı

patojen olarak isimlendirilen bu tür mikroorganizmalar normalde buldukları ortamdan farklı olan bir bölgeye geçerek yerleşmeleri durumunda patojen olma özelliği kazanmaktadır.

Hasarlı olan doku ya da organın yerini alan biyomalzemeler, mikroorganizmaların yapışması için de uygun ortam olabilmektedir. İmplantasyon sonrası yüzeyin çeşitli proteinlerle kaplandığı ya da vücut hücrelerinin malzemeyi tutunma özelliğini arttırmak için fibronektin gibi bağlayıcı proteinler kullanıldığı durumda bu proteinlere mikroorganizmalar da çeşitli etkileşimler ile tutunabilmektedir. Biyomalzemeye mikroorganizmalar temelde iki farklı yol ile ulaşabilmektedir. Birinci yol, implantasyon işlemi sırasında malzemenin mikroorganizmalarla kontamine olması sonucunda enfekte olarak vücuda yerleşmesidir. İkinci yol, vücut içerisinde yer alan ya da vücudun dış ortama açık kısımlarından mikroorganizmaların vücut sıvıları yoluyla malzemeye ulaşması yoluyla gerçekleşebilmektedir. İmplantların vücut tarafından reddedilmesini engellemek amacıyla implantasyon sonrasında bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanların kullanılması ise enfeksiyon riskinin daha da artmasına neden olmaktadır.

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, vücudun savunma sisteminden etkilenmemeleri ve antibiyotik tedavisine karşı direnç göstermeleridir. Biyofilm oluşumu tamamlandıktan sonra uygulanan antibiyotik tedavileri implant kaynaklı enfeksiyon oluşumunu engellemek için yeterli olmamakta birlikte vücutta bulunan normal bakteri florası üzerine olumsuz etki gösterebilmektedir [12]. Uygulanan yüksek doz antibiyotik tedavileri hem flora elemanlarının hem de enfeksiyon etkeninin direnç kazanmasına neden olabilmekte ve süreç tedavisi zor olan hastalıkların ortaya çıkması ile sonlanabilmektedir [17]. Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabilecek yöntemlerle ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyofilm oluşumu ile ilişkili olan birçok enfeksiyon çeşidi bulunmakla birlikte bu enfeksiyonlarda rol oynayan mikroorganizma türleri de değişiklik göstermektedir (Çizelge 2.1) [33].

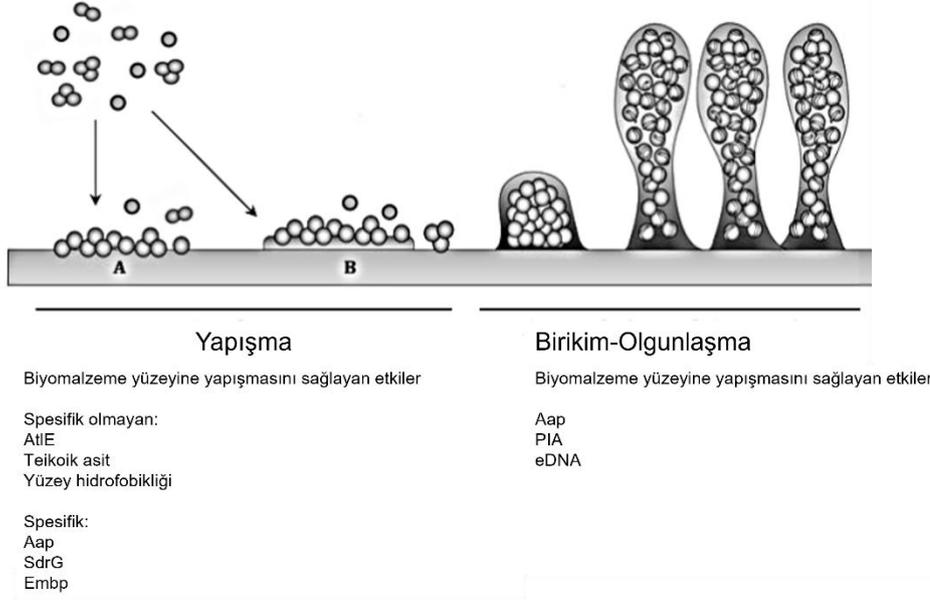
Çizelge 2.1. Biyofilm ilişkili enfeksiyon türleri ve neden olan mikroorganizmalar [33].

Enfeksiyon Türleri/Yerleri	Mikroorganizma Türleri
Diş taşı	Gram pozitif koklar (<i>Streptococcus sp.</i>)
İskelet kas enfeksiyonu	Gram pozitif koklar (<i>Staphylococcus</i>)
Safra kanalı iltihabı	Enterik bakteriler (<i>E. coli</i>)
Ameliyat iplikleri	<i>S. epidermidis</i> ve <i>S. aureus</i>
Ortopedik malzemeler	<i>S. epidermidis</i> ve <i>S. aureus</i>
Damar kateterleri	<i>S. epidermidis</i> ve birçok tür
Kontakt lensler	<i>P. aeruginosa</i> ve Gram pozitif koklar
Mekanik kalp kapakları	<i>S. epidermidis</i> ve <i>S. aureus</i>

Birçok biyomalzeme yüzeyi ile birlikte implant kaynaklı osteomyelit oluşumuna biyofilm oluşturarak neden olan etkenlerin başında *Staphylococcus epidermidis* gelmekte olup uygulanan sterilizasyon işlemleri ile birlikte implantasyon sonrası uygulanan antibiyotik tedavileri ile implant kaynaklı enfeksiyon oluşumlarını engellemekte yeterli gelmemekte, bu durum implant malzemelerindeki en önemli problemlerden biri olma özelliğini korumaktadır.

2.1.4. *Staphylococcus epidermidis* Kaynaklı Biyofilm Oluşum Mekanizması

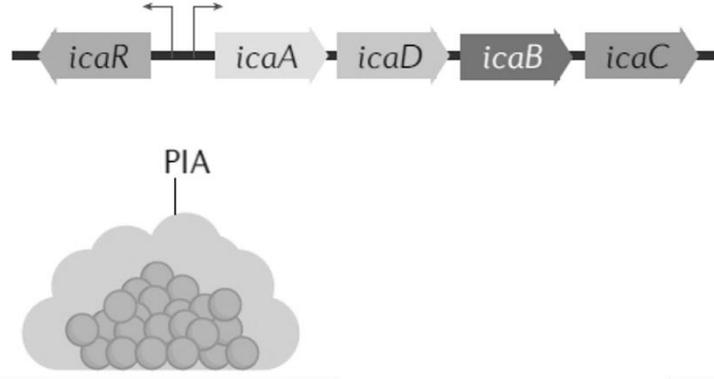
Klinik enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan ve enfeksiyon oluşumuna biyofilm oluşturarak neden olan *S. epidermidis*, normal deri florasının bir üyesi olmasına rağmen implantların hasarlı bölgeye yerleştirilmesi sırasında vücut içerisine girerek enfeksiyon oluşumuna sebep olmaktadır. Enfeksiyon oluşumu sırasında bakteri biyomalzeme yüzeyine tutunarak yüzeyde çoğalmaya başlar ve süreç biyofilm oluşumu ile sonlanır. Bu süreçte bakterinin yüzeye yapışmasında hem spesifik hem de spesifik olmayan etkileşimler rol oynarken, yapışma gerçekleştikten sonraki birikim ve olgunlaşma evresinde spesifik etkileşimler daha çok katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.2) [34].



Şekil 2.2. *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturmada rol oynayan etkileşimler [34].

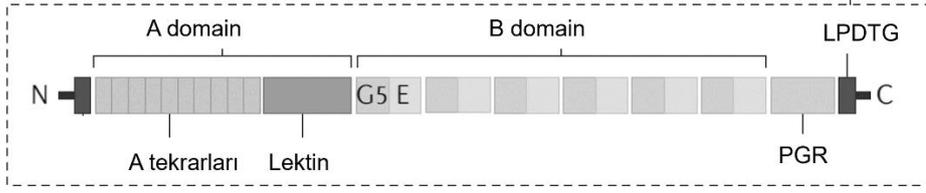
S. epidermidis'in biyofilm oluşturma mekanizması temelde iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan ilki polisakkarit aracılı PIA (hücrelerarası adhezyon polisakkariti) ya da PNAG (poli-N-asetil glukozamin) olarak isimlendirilen biyofilm oluşturma mekanizmasıdır. PIA aracılı biyofilm oluşmasında *ica* gen bölgesi tarafından sentezlenen ürünler görev almaktadır. *icaADBC* gen bölgesinin kodlamış olduğu IcaA ve IcaD transmembran proteinleri sayesinde aktif hale gelen polisakkarit zincirini hücre dışına IcaC proteini iletirirken, IcaB proteini ise asetil gruplarını zincirden uzaklaştırarak polisakkaritin katyonik özellik kazanmasına neden olmaktadır [35]. *icaADBC* gen bölgesinin yakınında yer alan *icaR* gen bölgesi ise regülatör protein kodlanmasını sağlamakta ve polisakkarit üretimini inhibe ederek etkili olmaktadır [36]. PIA mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalarda polisakkarit yapısının biyofilm oluşma aşamasının birikim evresinde daha etkili olduğu belirtilmiştir [37, 38]. PIA aracılı biyofilm oluşmasının tek başına yeterli olmadığını [39], polisakkariti kodlayan gen bölgelerinin bulunmasına rağmen PIA aracılı biyofilm oluşturmeyen gruplar bulunduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [40]. Bunun yanında bu gen bölgesinin çeşitli koşullar altında indüklenebildiği, daha çok bakteriler yüzeye yapışıp biyofilm oluştuktan sonra biyofilm yapısının korunması amacıyla bu mekanizmanın çalıştığı gösterilmiştir [41, 42].

Polisakkarit aracılı biyofilm oluşumu-PIA

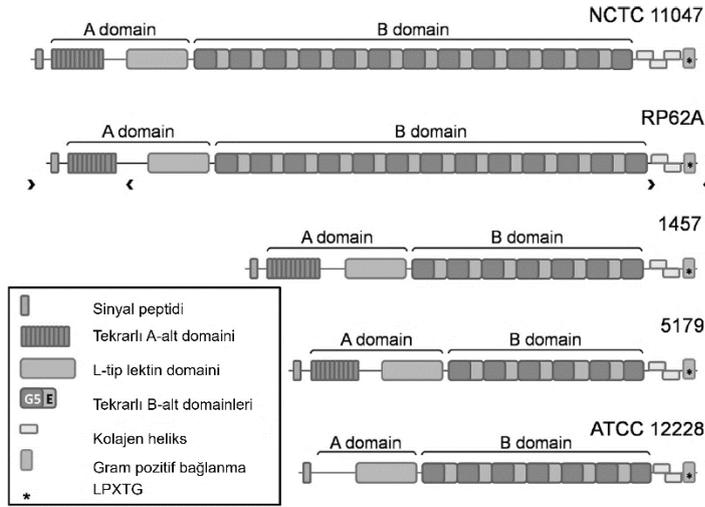


Şekil 2.3. Polisakkarit aracılı biyofilm oluşumunda rol oynayan PIA mekanizması [43].

Biyofilm oluşturma mekanizmalarından ikincisi ise protein aracılı olup bu proteinlerden en önemlisi Aap (Birikimle İlişkili Protein-Accumulation Associated Protein)'dir. Bu protein hem bakteri hücrelerinin biyomalzeme yüzeyine yapışmasında, hem de hücrelerin hücre-hücre etkileşimi kurarak biyofilm oluşturmak üzere birleşmesinde rol oynamaktadır [44, 45]. Aap proteini *S. epidermidis* bakterisinin hücre yüzeyinde bulunan bir protein olup, prolin ve glisince zengin olan bölge ile A ve B bölgelerinden meydana gelmektedir. A-kısmı bakteri hücrelerin deri hücrelerine ve yüzeylere yapışmada rol oynarken [44, 46], B-kısmı ise hücrelerin birbiri ile etkileşime geçerek biyofilm oluşmasında rol almaktadır [47]. A-kısmı 16 amino asitten (aa) oluşan tekrarlayan alt birimler ile korunmuş 222-aa'den oluşan L-tip lektin bölgesinden meydana gelmektedir. B-kısmı ise 128-aa'den oluşan tekrarlayan alt birimlerden oluşmakta olup, bunlar 78-aa'den oluşan G5 alt-kısmı ile 50-aa'den meydana gelen E alt-kısımıdır (Şekil 2.4). G5 bölgesi asıl katlanmadan sorumlu olan alt kısım iken E bölgesi ise G5 alt kısımlarının doğru katlanmasından sorumlu olan bölgelerdir [48]. B bölgesini oluşturan alt kısımların sayısı ise *S. epidermidis* türleri arasında sayıca farklılık göstermektedir [44] (Şekil 2.5).

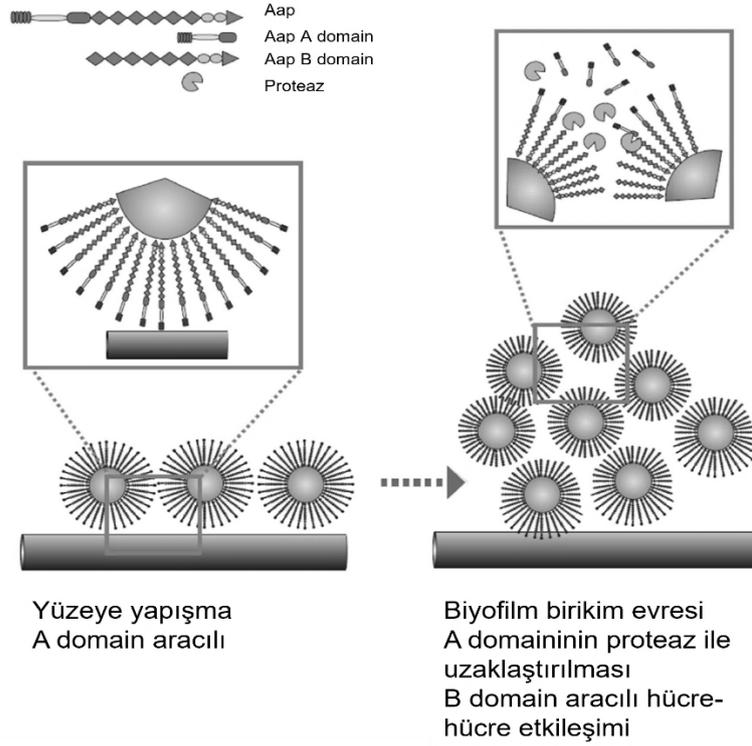


Şekil 2.4. Aap proteinine ait bölgelerinin yapısı [43].



Şekil 2.5. Aap protein bölgelerinin *S. epidermidis* suşları arasındaki farklılık gösterme durumu [44].

Protein aracılı biyofilm oluşma mekanizmasında Aap rol oynamakta olup sahip olduğu ikili işlev sayesinde hem hücrelerin yüzeye yapışma aşamasında hem de hücre-hücre etkileşimini sağlayarak biyofilmin birikim aşamasında rol oynamaktadır. A bölgesi aracılığı ile yüzeye ya da hücrelere tutunma sağlaması nedeniyle biyofilm oluşumunun ilk aşamasında yer almaktadır. Yapışma sonrasında A kısmının konak ya da bakteri hücresi tarafından salınan proteaz enizmi ile uzaklaştırılmasını takiben B kısımlarının birbiri ile etkileşimi sonucunda biyofilm oluşumunun birikim aşamasında görev almaktadır (Şekil 2.6) [44].



Şekil 2.6. Aap proteininin A ve B bölgelerinin protein aracılı biyofilm oluşum mekanizmasındaki rolleri [44].

İmplant kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için en etkili yöntem, implant yüzeyinde biyofilm oluşumunu engellemek olup bu amaçla biyofilm oluşumu ile ilgili olan moleküllerin hedef olarak seçildiği uygulamalardan yararlanılabilir. Literatürde yer alan bir çalışmada *S. epidermidis* bakterisinin biyofilm oluşturması ile ilgili olan Aap proteinine karşı monoklonal antikolar sentezlenmiştir [49]. Oluşturulan monoklonal antikoların biyofilm oluşumunu tek başlarına kullandıklarında düşük seviyelerde engellediği, ancak 3 farklı antikor kullanıldığında bu oranda artış olduğunun gösterildiği belirtilmiştir ancak bu durum uygulamalarda kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Literatür incelendiğinde, aptamerlerin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin incelenmesi için yapılan çalışmaların sayısının çok az olduğu görülmekte ve bu çalışmalarda da belirtildiği gibi aptamerlerin biyofilm inhibisyon etkilerinin olması, onları antibiyotik tedavilerine alternatif olabilecek adaylar haline getirmektedir. Söz konusu çalışmalardan biri Ning ve arkadaşları [50] tarafından yapılmış olup, *Salmonella choleraesuis* bakterisinin hareket etmesinden sorumlu olan flagellasına özgü aptamer geliştirmiş ve aptamerin flagella ile etkileşimine bağlı olarak bakterinin hareket etmesini kısıtlayarak biyofilm oluşturma

yeteneğinin azaldığını göstermişlerdir. Diğer bir çalışma ise [51] zatürre etkeni olan *Streptococcus pneumoniae* bakterisinin tespit ve hedeflenmesine yönelik olarak geliştirdikleri aptamerin biyofilm oluşumu üzerine etkilerini incelediklerinde aptamer eklenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Lyd-3 aptamerinin 1 µM oranında kullanıldığında biyofilm oluşumunu %100'den %35'e düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmada, benzer bir mekanizma ile biyofilm oluşmasını engellemede antibiyotiklere alternatif ya da destek olabilecek, antikora kıyasla birçok avantajı bulunan, aptamerlerin kullanımı hedeflenmiştir.

2.2. Aptamerler

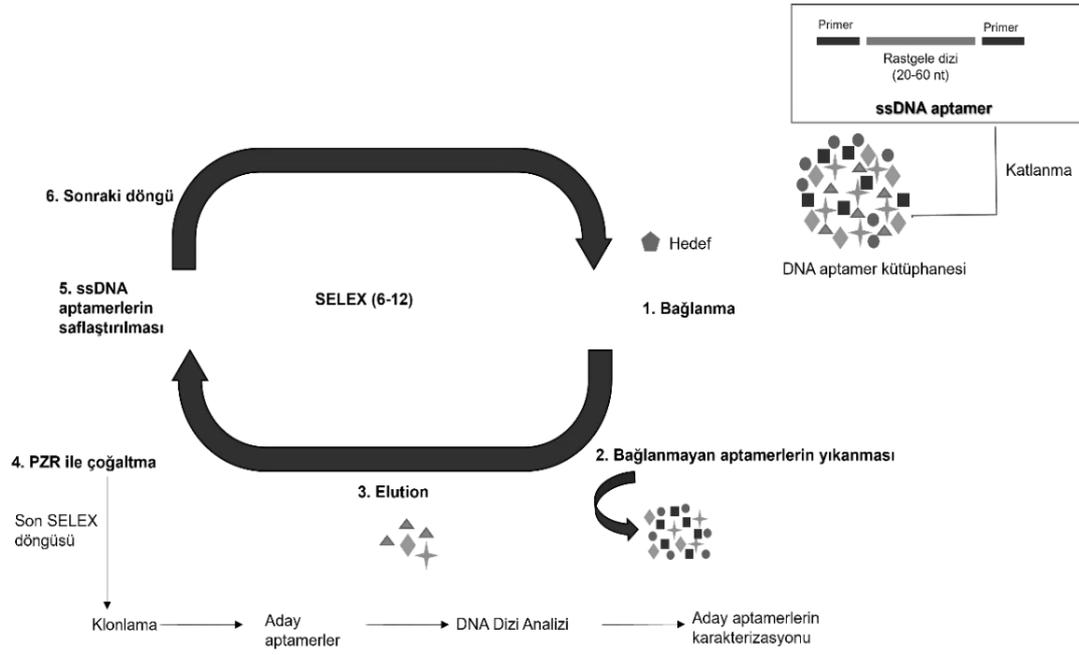
Aptamerler, sahip oldukları üç boyutlu yapıları sayesinde hedef moleküllere yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanan tek zincirli DNA veya RNA oligonükleotitleridir [20]. İyonlar, organik moleküller, proteinler, hücreler, bakteriler ve virüsler olmak üzere çok geniş bir hedef kitlesine bağlanma kapasitesine sahip olan yapılardır [21, 22]. Aptamerlerin hedef moleküllerine bağlanma afinitesi mikromolar düzeyinden nanomolar düzeyine kadar değişiklik gösterebilmektedir [52]. Hedef moleküllerine bağlanma sırasında aptamerler, moleküller arasında yer alan kimyasal grup farklılığını ya da şekil farklılıkları olan molekülleri birbirlerinden ayırt edebilmeleri sayesinde hedef moleküllerine yüksek özgünlük ile bağlanmaktadır. Aptamerler, antikolar ile karşılaştırıldıklarında boyutlarının küçük olması, immün cevaba neden olmamaları ve toksik ajanlara karşı üretilibilmeleri, farklılık göstermeyecek şekilde ve ucuz üretim prosesi ile sentezlenebilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler (Çizelge 2.2) [53].

Çizelge 2.2. Aptamer ile Antikor Karşılaştırılması [53].

APTAMER	ANTİKOR
Her türlü hedef molekül için seçilebilir	İmmünolojik olmayan ve toksik ajanlara karşı etkisiz
İn-vitro seçim ortamı	Canlı organizmaya bağımlı seçim ortamı
Geniş kimyasal modifikasyon imkanına sahip	Kısıtlı kimyasal modifikasyon imkanına sahip
Sıcaklık değişiklikleri sonrasında orijinal üç boyutlu yapısına dönebilme özelliğine sahip	Sıcaklık değişikliklerine duyarlı ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olma durumu
Daha düşük maliyet	Daha yüksek maliyet

2.2.1. SELEX Yöntemi ile Aptamer Seçimi

1990 yılında geliştirilmeye başlanmış olan aptamer seçim yöntemi, nükleik asit kütüphanesi kullanılarak oluşturulan DNA ya da RNA kütüphanesinden hedef moleküllere yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanabilme özelliğine sahip aptamerlerin seçimi SELEX adı verilen yöntem ile gerçekleştirilir. SELEX yöntemi, canlı organizmalardan bağımsız şekilde, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntem, birbirini takip eden bir seri işlemi kapsamaktadır. Bunlar, hedef moleküle oluşturulan DNA kütüphanesinin inkübe edilerek uygun DNA zincirlerinin hedef bölgeye bağlanması, bağlanmayan moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması, bağlanmış DNA moleküllerinin geri toplanması ve çoğaltılmasıdır (Şekil 2.7) [54].



Şekil 2.7. SELEX yöntemi [54].

SELEX protokolündeki yıllara bağlı olarak gerçekleştirilen yenilikler ile çeşitlilikler aptamerlerin istenilen özgün özelliklere sahip olacak şekilde seçilmesini sağlamaktadır (Çizelge 2.3.). Örneğin Hücre-SELEX, hücrenin tamamı baz alınarak hücre zarı üzerindeki proteinler veya özgül yapılar hedeflenerek bu yapılara karşı aptamer seçiminde kullanılmaktadır [55]. Diğer bir SELEX yöntemi olan Toggle-SELEX, benzer hedef yapılara karşı seçilen geniş özgünlüklere sahip aptamerlerin oluşturulması amacıyla kullanılabilen bir yöntemdir [56]. Photo-SELEX yöntemi ise modifiye edilmiş nükleotidler içeren aptamer kütüphanesinin ultraviyole bölgede ışına yapacak şekilde hedef moleküle kovalent bağ oluşturulduğu SELEX yöntemidir [57]. Bu yöntemlerin yanı sıra, tek yüzey üzerinde aptamerlerin saflaştırılabildiği mikroçiplerin kullanıldığı SELEX yöntemi [58] ile atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) da yer aldığı çeşitli SELEX yöntemleri de bulunmaktadır [59].

Çizelge 2.3. Yıllara göre değişim gösteren SELEX yöntemlerinden örnekler [60].

Yıl	SELEX Yöntemi	Çalışma Prensibi	Kaynak
1992	Negatif SELEX	Matriks ile aptamer kütüphanesinin etkileşimi sağlanarak özgül aptamer seçiminin artırılması	[61]
1994	Karşı SELEX	Yakın türler ile aptamer kütüphanesinin etkileşimi sağlanarak özgül aptamer seçiminin artırılması	[62]
1997	Genomik SELEX	Organizmanın kendisinin genomik dizi bağlama motifini tanımlayabilen kolay bir SELEX yöntemi	[63]
1997	<i>İn vivo</i> SELEX	<i>İn vivo</i> koşullar altında hücre içinde yapılan aptamer seçimi	[64]
2000	Photo-SELEX	Modifiye edilmiş nükleotidler içeren aptamer kütüphanesinin ışına yapacak şekilde hedef proteinle kovalent bağ oluşturulduğu yöntem	[57]
2005	FluMag-SELEX	Floresan etiketli hedeflerin kullanımı ile daha etkin aptamer seçiliminin sağlandığı yöntem	[65]
2007	Nanoseçime dayalı SELEX	Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile tek aşamada seçim yapılan yöntem	[59]
2010	Mikroakışkan temelli SELEX	Mikroçipler ile tek yüzey üzerinde aptamerlerin saflaştırılması sağlanan yöntem	[58]
2016	İzojenik hücre SELEX	Hedef olarak aşırı eksprese edilmiş izojenik hücrenin kullanıldığı SELEX yöntemi	[66]

2.2.2. Aptamer Uygulama Alanları

Aptamerler geniş hedef kitlesine karşı seçilebilmeleri nedeniyle pek çok alanda uygulama alanı bulabilmektedir. Sağlık alanında kanser ile viral enfeksiyonlar gibi çeşitli türlerdeki hastalıkların özgül tanıyıcıları olarak aptamerlerin kullanılmasının yanında gıda endüstrisinde patojenlerin tanınmasında, çevresel kirliliğe sebep olan moleküllerin saptanması ile ilgili uygulamalarda biyosensör tasarlanmasında yararlanılmaktadırlar. Ticari olarak kullanılan ve 2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından da onay almış, yaşa bağlı sarı nokta (makula dejenerasyonu) hastalığı tedavisi için vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) karşı geliştirilen aptamer olan Macugen'e ek olarak çeşitli hastalıklara karşı hala klinik çalışmaları devam eden aptamer örnekleri de bulunmaktadır [67]. Güncel klinik çalışmalarda faz aşamaları devam etmekte olan aptamer uygulamalarına örnek olarak faz I aşamasında olan Tip 2 diyabete karşı geliştirilen NOX-E36 [68], erken faz I aşamasında olan kolorektal kansere karşı geliştirilen 68Ga-Sgc8 ile faz II aşamasında olan NOX-A12 örnek olarak verilebilir [69].

2.2.2.1. Tanı

Aptamerlerle ilgili çalışmaların yapıldığı diğer bir alan ise özellikle hastalıkların tanı aşaması olup en çok kanser hücrelerinin kanserin tanısında ve kanser hücrelerinin ilaçla hedeflenmesi ile ilgili araştırmalarda kullanılmaktadırlar. Kanser hücrelerinin ilaçla hedeflenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada göğüs kanseri hücrelerini tanıyabilen aptamerle modifiye edilmiş, antikanser ilacı yüklenmiş nanopartiküller geliştirilmiş ve etkinliği gösterilmiştir [70]. Diğer bir çalışmada ise hücre-SELEX yöntemi ile osteosarkoma kanser hücrelerine karşı seçilen aptamerin, yüksek seçicilikte ve spesifik olarak ilgili kanser türünün tespit edilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir [71]. Kaur ve arkadaşları [72] ise yapmış oldukları çalışmada kan transfüzyonu sırasında kontaminasyon kaynağı olan *S. epidermidis*'in tanısı için hızlı DNA aptamer tayini yöntemini kullanmış olup 5 aday aptamer içerisinde en etkili olanın SE-43 isimli aptamer olduğu ve tanı amaçlı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

2.2.2.2. Tedavi

Aptamerlerin özgünlüğü ve yüksek bağlanma afiniteleri, bağışıklık sistemine zarar vermemeleri, *in vitro* koşullarda istenilen hedef molekül için seçilebilir olmaları, kan döngüsüne katılabilmeleri aptamerleri yeni ilaç üretimi yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılmak adına güçlü bir aday yapmaktadır. Aptamerlerin hücre zarındaki reseptörlere bağlanabilme durumunun olması bu yapıların hedeflenerek ilaç veya diğer çeşitli ürünlerin hücre içine salınmasını sağlayabilmektedir.

Aptamerlerle diyabet tedavisinde kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmada, diyabet oluşumu ile ilgili olan retinolün taşıyıcı olan proteine bağlanması aptamerle modifiye edilen nanopartiküllerle engellenmiş olup kullanılan aptamerin “Tip 2 diyabette” insülin direncinin azaltılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir [73].

2.2.2.3. Analitik Uygulamalar

Aptamerlerin kimyasal olarak modifiye edilmesinin kolay olması, çeşitli yüzeylere sabitlenebilmesi ve denatürasyona karşı dayanıklı olması, aptamerlerin analitik uygulamalarda tercih edilmesini sağlamaktadır [74]. Aptasensörler, tanıyıcı molekül olarak aptamerlerin kullanıldığı biyosensörler olup optik, elektrokimyasal ve kütleyle duyarlı çeşitleri de bulunmaktadır. Wang ve arkadaşları [75], yapmış oldukları çalışmada, gıda patojeni olan *E. coli* O157:H7 bakterisine karşı geliştirdikleri aptasensörün patojenin daha hızlı, daha yüksek hassasiyetli ve daha ucuz şekilde tayin edilmesini sağladığını göstermişlerdir. Wang ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada ise sadece veterinerlik alanında kullanılmasına izin verilen yarı sentetik olan sefalosporin antibiyotik grubunun bir parçası olan sefkinomu yüksek hassasiyetle tayin edebilecek bir aptasensör geliştirmişlerdir [76]. Serum içerisinde yer alan Bifenol A'nın yüksek hassasiyetle tayin edilmesini sağlayan çalışma ise Su ve arkadaşları tarafından yapılmış ve geri kazanım oranının 90.8 ± 7.3 olarak belirtmişlerdir [77].

2.3. Kitosan

Kitin, kabuklu canlıların dış iskeletleri ile birlikte bazı fungus ve alglerin hücre duvarlarının bileşeni olarak da bulunabilen doğal yapıda bir polimerdir [78]. Kitin selülozdan sonra en çok bulunan polisakkarit olup N-asetil-D-glukoz amin birimlerinden

oluşan bir yapıya sahiptir [79]. Kitinin sahip olduğu hidrofobik yapısı su ve organik çözücülerde çözünmesine engel olması nedeniyle uygulama alanını sınırlamaktadır [80].

Kitosan ise kitinin belirli oranlarda asetil gruplarının uzaklaştırılması sonucu elde edilen bir biyopolimerdir. Aynı zamanda kitosan çeşitli funguslarda, bazı alg türlerinde ve böceklerin kütikula tabakasında doğal olarak bulunmaktadır. Kitosan, asidik ortamlarda yapısında bulunan amino gruplarının protonlanması nedeniyle polikasyonik özellik gösteren bir polimerdir [80]. Kitosan yapısında bulunan amino grubuna ek olarak iki aktif grup daha içermekte olup bu grupların çeşitli şekillerde uygulama yapılacak olan alana göre modifiye edilebilmesi, geniş uygulama alanı bulmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda kitosanın biyoyumlu yapıda olması, toksik ve alerjenik özellik göstermemesi ve antimikrobiyal özelliği nedeniyle başta gıda endüstrisi olmak üzere, tarım, kozmetik, biyomedikal ve biyoteknoloji gibi alanlarla ilgili uygulamalarda tercih edilmesini sağlamaktadır [81, 82].

Kitosanın antimikrobiyal özelliğini gösterme mekanizması henüz tam olarak bilinmemekte olup, polikasyonik özellik göstermesi nedeniyle elektronegatif olan bakteri hücre yüzeyi ile etkileşime girerek antimikrobiyal özelliğini gösterdiği belirtilmektedir [83]. Kitosanın antimikrobiyal etkisi üzerinde birçok parametre etkili olmakta olup bu parametrelere örnek olarak mikroorganizmanın türü, kitosanın pozitif yük yoğunluğu, moleküler ağırlığı ve fiziksel durumu gibi çeşitli kimyasal özellikler ve çevresel faktörler verilebilir [84]. Polikasyonik yapısı ile antimikrobiyal etkisini göstermesi arasında doğru orantı olduğunun belirtilmesi nedeniyle, polikasyonik yapının oluşmasını sağlayan amino grupları sayesinde deasetilasyon derecesi belirlendiği için deasetilasyon derecesi arttıkça kitosanın antimikrobiyal özelliği de artmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan kitosanın antimikrobiyal etki mekanizması iki şekilde gerçekleşebilmektedir. Birinci yol, kitosan polimerini oluşturan zincirlerin hücre yüzeyi ile etkileşime geçmesi sonucunda hücre duvarının ozmotik kararlılığını azalması ve sürecin hücre içeriğinin dışarıya sızması ile sonlanmasıdır. İkinci yol ise hücrenin yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan maddelerin alınımını hücre yüzeyinde geçirimsiz bir tabaka oluşturarak engellenmesidir. Düşük molekül ağırlıklı kitosan zincirlerinin antimikrobiyal özellik gösterme mekanizması ise hücre içerisine difüze olmasının ardından DNA ile etkileşime

girebilmesi ve mRNA ile protein sentezinin durmasına neden olabilmesi sayesinde gerçekleşmektedir [83]. Mikroorganizmanın türüne bağlı olmakla birlikte düşük moleküler ağırlığa sahip olan kitosanın daha yüksek antimikrobiyal özelliği gösterdiği belirtilmiştir [84]. Kitosanın antimikrobiyal özelliği gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler üzerinde etkisinin farklı olduğu, bu durum iki bakteri grubunun hücre duvar yapılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Kitosanın antimikrobiyal özelliği ile ilgili yapılan bir çalışmada, hücre duvar yapıları farklı olan türler olarak *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *S. aureus* türü için kitosanın moleküler ağırlığı arttıkça, *E. coli* türü için ise kitosanın moleküler ağırlığı azaldıkça antimikrobiyal etkinin arttığı belirtilmiştir [85].

Kitosan biyouyumlu yapıda olması, toksik ve alerjenik özellik göstermemesi ve antimikrobiyal özelliği nedeniyle özellikle dental ya da ortopedik uygulamalarda kullanılan implantların kaplanması ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Bumgardner ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada titanyum yüzeylerinin %91,2 deasetilasyon derecesine sahip kitosan ile kaplama sonrası osteoblast hücrelerinin kaplanmamış yüzeylere oranlara daha iyi yapışma ve büyüme gösterdiğini belirtmişlerdir [86]. Farklı deasetilasyon derecesine sahip kitosan ile kaplama yapılan bir diğer çalışmada ise deasetilasyon derecesi arasındaki farkın diğer çalışmalardan farklı olarak osteoblast hücrelerinin yapışması üzerinde büyük bir fark oluşturmadığını gözlemlemişlerdir [87]. Renoud ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada ise titanyum yüzeyin kitosan ile kaplanması sonucunda NIH3T3 fibroblast hücrelerinin yapışması için iyi bir yüzey olduğu, *Actinomyces naeslundii* bakteri büyümesini engellediği ancak 32 saat sonrasında bile *Porphyromonas gingivalis* bakterisine karşı herhangi bir inhibisyon etki göstermediği belirtilmiştir [88]. Dolayısıyla titanyum yüzeylerin hem doku hücrelerinin yapışmasında hem de sahip olduğu antibakteriyel özelliği göstermesinde değişiklikler meydana gelebilmektedir.

Özetle bu tez kapsamında, ilk olarak *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturma yeteneği ile ilgili olan Aap proteinini oluşturan bölgelerin farklı kombinasyonlar yapılarak rekombinant olarak üretilerek saflaştırılması, ikinci aşamada, *S. epidermidis*' in biyofilm oluşturmaya bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyonların engellenmesi için, hedef Aap proteinine yüksek afinite gösteren DNA aptamerlerinin ilk kez belirlenerek üretimi, son aşamada ise uygun DNA aptamerlerin seçilmesinin ardından, kitosan ile kaplanan veya kaplama yapılmayan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumuna etkisinin *in vitro* koşullar altında belirlenmesi hedeflenmiştir.

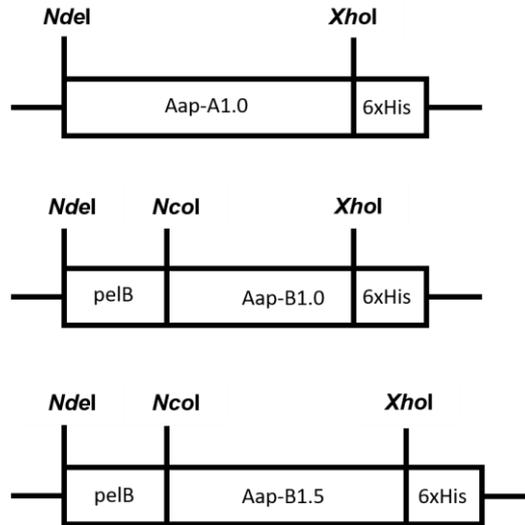
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Rekombinant Aap Proteininin Elde Edilmesi

3.1.1. Rekombinant Aap Proteini Üretimi için Vektör Tasarımı

S. epidermidis RP62A suşunun Aap proteininde yer alan A kısmını oluşturan bölgelerden biri olan L-tip lektin bölgesi ile B kısmını oluşturan tekrarlayan alt-kısımların (G5-E alt bölgeleri) kodlayan gen dizilimi (GenBank: CP000029.1) FASTA formatında NCBI database'den (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) alınmıştır.

S. epidermidis RP62A suşunun B1.0 ve B1.5 bölgelerinin periplazmik alanda üretilmesi için vektör olarak pelB sinyal peptidini taşıyan pET-26b plazmidi, sitoplazmik alanda üretilmesi için pET-28a plazmidi, A1.0 bölgesinin sitoplazmik olarak üretilmesi için ise pET-26b plazmidinin sinyal kısmının çıkarılarak kullanılmasına karar verilmiştir. Söz konusu proteinlerin rekombinant olarak üretildikten sonra saflaştırılması ve immobilizasyonu için “His-tag” bölgesinin r-proteinin C-ucunda olması istendiği ve gerek olmayan amino asit oluşumunu engellemek için uygun restriksiyon enzim bölgeleri belirlenmiştir. Bu amaçla pET-26b ve pET-28a plazmidlerine B1.0, B1.5 genlerinin aktarılması için *NcoI* ve *XhoI* enzimleri, A1.0 gen bölgesi için *NdeI* ve *XhoI* enzimleri seçilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Aap proteininin rekombinant olarak üretilen bölgelerinin gen kaseti görüntüsü.

3.1.2. Rekombinant Aap Proteini Üretimi için Primer Tasarımı

Polimeraz zincir reaksiyonlarıyla (PZR) istenilen gen bölgelerini çoğaltmak amacıyla gerekli olan primerlerin tasarımları yapılmıştır. Tasarım sırasında primerin 18-30 baz çifti uzunluğunda olması, %GC içeriğinin %40-60 arasında olması, primerlerin T_m değerlerinin arasında en fazla 5°C fark olması, dimer oluşumu için ΔG değerinin 0 ile -9 aralığında olması, 3' ucunda en az bir adet G veya C bazının olması ancak 3'ten fazla bu bazlardan yer almaması, 3' ucunda dimer yapısının oluşmamasının sağlanması dikkat edilen parametrelerdir. Tasarlanan primerlerin dizisi ve restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Primerlerin T_m değerleri ve oluşması muhtemel ikincil yapılar (saç tokası/hair-pin, homo-dimer ve hetero-dimer) oluşturma durumları IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>) programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.1.3. Liyofilize Haldeki Suşun Canlandırılması ve Stokların Hazırlanması

Liyofilize halde gelen *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) suşunun canlandırılması için TSB/TSA (Tryptic soy broth/agar) besiyeri sıvı ve katı olarak hazırlanmıştır. Cam ampul içerisinde pelet halinde gelen suşun canlandırılması için sıvı besiyerinden 1 ml alınarak peletin üzerine eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu hücre süspansiyonundan 100'er µl katı besiyerine ekimleri yapılarak 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında katı besiyerinden uygun koloni seçilerek 5 ml sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 16 saat çoğaltılmış, gliserol ile aynı miktarda karıştırılarak -86°C stokları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri.

No	Primer	Dizi (5'-----3') (Enzim kesim noktaları)	T _m (°C)	GC (%)	Bç
1	pET-26b- B1.0-F	ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGAT TACG	62.4	52.4	32
2	pET-26b- B1.0-R	CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTC ACATCATCC	62.8	40	37
3	pET-26b- B1.5-F	ACGATTCCATGGTTGATGGCGATTCGAT TACG	60.8	47.6	32
4	pET-26b- B1.5-R	CTGATTCTCGAGTGGACCATACTCAACA ATTTCG	60.3	40.9	34
5	pET-28a- B1.0-F	TCAAGCCCATGGATGGTTGATGGCGATC CGATTACG	62.4	52.4	36
6	pET-28a- B1.0-R	CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTC ACATCATCC	62.8	40	37
7	pET-28a- B1.5-F	TCAAGCCCATGGATGGTTGATGGCGATT CGATTACG	60.8	47.6	36
8	pET-28a- B1.5-R	CTGATTCTCGAGTGGACCATACTCAACA ATTTCG	60.3	40.9	34
9	A1.0_F	AGCTCACATATGAATTACGATTTTACG GTAGAGTAGATATCGAAAG	64.9	31.4	47
10	A1.0_R	TACGGACTCGAGATTACCATTGCCATAT TGACTTGATG	61.9	34.6	38
11	seq-F	CGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG	62.6	40.7	27
12	seq-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT	61.5	50	20

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan liyofilize halde teslim alınan primerlere Tris-EDTA (TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) tamponu eklenerek 100 µM'lık stok çözeltisi hazırlanmış, -20°C'de stoklanmıştır.

Gen bölgelerinin (A1.0, B1.0 ve B1.5) çoğaltılması sırasında kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklıkları ile çoğaltılmak istenilen gen bölgelerinin uzunluğuna bağlı olarak PZR basamaklarının koşullarında en iyileme çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda, gen

izolasyon tekniği olarak, katı besiyerinden koloni seçilerek PZR karışımı içerisinde 94°C’de hücrelerin patlatılması ile en iyi sonuç elde edildiği belirlenmiştir. En iyileme çalışmaları sonucunda üç gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl reaksiyon karışımı: reaksiyon tamponu (5x) 10 µl, dNTPmix (10 mM) 1 µl, ileri primer (100 µM) 1 µl, geri primer 1 µl (100 µM), kalıp DNA 1 µl (*S. epidermidis* RP62A), DNA polimeraz ve dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan PZR programı: ilk denatürasyon 94°C’de 8 dk 30 s; 35 döngüden oluşan denatürasyon 94°C 30 s, primer bağlanma 53°C 1 dk (B1.0 için 55°C), zincir uzama 68°C 1 dk ve 68°C 5 dk ile PZR işlemi termal döngüleyicide gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, DNA moleküllerinin ayrımı ve tanımlanması için kullanılmıştır. %1’lik agaroz jel için 1 g agaroz 100 ml 1x Tris-Borate-EDTA (TBE) tamponunda çözünmüş, etidyum bromür eklenerek jel tepsilerine dökülmüş ve kuyuların oluşması için uygun tarak kullanılarak donması sağlanmıştır. Yükleme boyasıyla karıştırılan DNA örneklerinin ve DNA standardının jele yüklenmesinin ardından 1xTBE tamponu ile dolu olan tanka yerleştirilmiştir. 100V’da 45-60 dk yürütülmüş ve jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.

3.1.6. Hedef (Gen Bölgelerinin) DNA’nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

Klonlamada kullanılacak gen parçalarının bulunduğu bantlar jelden kesilmiş, kesilen parçaların jelden ve tuzlardan uzaklaştırılması için jel ekstraksiyon kiti kullanılmış olup üretici firmanın tavsiye ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.7. *E. coli*’den Plazmid DNA’nın İzolasyonu

Plazmid DNA, *E. coli*’den ticari olarak temin edilen kit ile protokole uygun olarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla seçici katı besiyerinden tek bir koloni 5 ml seçici sıvı besi ortamına inoküle edilmiş, 37°C ve 200 rpm’de 16 saat çoğaltılmıştır. Ekstraksiyon basamakları sonunda 50 µl’lik elüsyon tamponu ve santrifüj kolonu kullanılarak saflaştırılan plazmid, sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.1.8. DNA'nın Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesimi

Restriksiyon enzimleri ile kesme reaksiyonu hem hedef genler hem de plazmid DNA'lar için gerçekleştirilmiş olup Çizelge 3.2'de verilen bileşenler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Restriksiyon enzimleri ile kesim işleminde kullanılan bileşenler.

Reaksiyon karışımı bileşenleri	Miktar
DNA	1,5 µg
Reaksiyon tamponu	5 µl (1X)
<i>NdeI</i> (B1.0, B1.5), <i>NcoI</i> (A1.0)	1 µl
<i>XhoI</i> (B1.0, B1.5 ve A1.0)	1 µl
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	1 µl
dH ₂ O	50 µl'ye kadar

CIP dışındaki bütün bileşenler karıştırılarak, tüpler 37°C'de 1 saat 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra plazmidin kendi üzerine kapanmasını önlemek amacıyla sadece plazmid DNA'sının yer aldığı tüpe CIP eklenerek 1 saat daha aynı sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.9. Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması

Kesim sonrasında enzimlerin inaktive edilmesi, primerler ya da nükleotidler gibi bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılması için ticari olarak temin edilen saflaştırma kiti kullanılmış olup, bu işlem üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Nano-spektrofotometre ile saflık ve derişim tayini A260/A230 ve A260/A280 değerlerine göre yapılmıştır.

3.1.10. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

Ligasyon işlemi, T4 DNA ligaz enzimi varlığında, kesimi gerçekleştirilen plazmid vektör DNA'sı ve gen kaseti (hedef gen bölgesinin) yapışkan uçlarının birleşmesi için yapılmış olup, reaksiyon karışımının içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir. Ligasyon işlemi için hedef

gen-vektör molar oranı 3:1 olarak kullanılmış olup, bu hesaplama için “NeoBiocalculator” programından yararlanılmıştır (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

Çizelge 3.3. Ekleme reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Reaksiyon karışımı bileşenleri	20 µl
T4 DNA Ligaz Tamponu	2 µl (1X)
Vektör DNA (5360 bç)	100 ng
Hedef DNA bölgesi (640 bç)	35,8 ng
T4 DNA Ligaz	1 µl
dH ₂ O	20 µl'ye kadar

Kontrol reaksiyonu ise hedef DNA bölge dışında Çizelge 3.3'te belirtilmiş olan diğer tüm bileşenleri içerecek şekilde oluşturulmuştur. Reaksiyon karışımları 16°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Örnekler, ligasyon işleminden sonra *E. coli* (DH5α) konak hücresine transformasyonda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.1.11. *E. coli*'nin CaCl₂ Metodu ile Transformasyonu

Plazmidin çoğaltılması için kimyasal-kompetan *E. coli* (DH5α) suşu kullanılmıştır. Bunun için *E. coli* (DH5α) suşu 37°C'de 16 saat, antibiyotik içermeyen sıvı besiyerinde inkübe edilerek çoğaltılmış ve 3000xg'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısımları dökülerek pelet kısımları 0,1 M CaCl₂ ile çözülerek kompetan hücre elde edilmiştir. Hazırlanan 50 µl hacminde kompetan hücre içerisine 5 µl plazmid eklenmiştir. 90 sn süre ile 42°C'de ısıl şoklama sonucunda, plazmid DNA'nın hücrelerin içine alınması sağlanmış ve 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Hücrelerin üzerine 750 µl zengin içerikli besi ortamı (SOB: %0.5 maya özütü; %2 Tripton; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) eklenmiş ve 37°C'de 45 dk, 200 rpm'de çalkalandıktan sonra, 50-100 µl transformasyon karışımı seçici antibiyotik içeren katı besi ortamına yayılmış ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.1.12. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi

Transformasyon sonucunda katı besiyerinde üreme gözlenen kolonilerden belirli sayıda koloni seçilerek antibiyotik içeren sıvı besiyerine inokülasyonu yapılmış ve 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plazmid DNA’sı ticari olarak temin edilen kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmid, klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş ve kesilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak analiz edilmiştir.

Hedef gen bölgesini taşıdığı belirlenen rekombinant plazmid örnekleri DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir. Elde edilen DNA dizileri hedef gen bölgelerinin dizileri ile BLAST programı aracılığıyla karşılaştırılarak analiz edilmiştir (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2. Aap Proteininin Saflaştırılması ve Analizi

Elde edilen rekombinant plazmidler, protein üretimi için *E. coli* BL21(DE3) konak hüresine CaCl₂ metodu ile aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında hücreler, içerisinde yer alan plazmidlerine göre seçici antibiyotik olarak kanamisin içeren Luria-Bertani (LB) katı besi ortamına ekilmiş ve bir gece 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün çoğalan hücrelerden birer koloni seçilmiş, içerisinde antibiyotik bulunan LB besi ortamına inoküle edilerek bir gece 37°C’de 200 rpm çalkalama hızında çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler, 250 ml’lik steril erlenlere aktarılmış ve 37°C’de, 200 rpm hızında çoğalması sağlanmıştır. Hücre yoğunluğunu belirlemek için 600 nm’deki absorbansları UV-Vis-spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve bu dalga boyundaki absorbans değerleri 1,0-1,2 olduğunda son derişimi 0.1 mM olacak şekilde izopropil tiyogalaktozit (IPTG) ilave edilerek indüklenmiştir. Optimal protein indüklenme sıcaklığının belirlenmesi için ilk aşamada farklı sıcaklıklar (37°C, 30°C ve 20°C) denenmiş olup, 200 rpm’de 16 saat üretime devam edilmiştir. Her protein bölgesi için optimal sıcaklık belirlendikten sonra o sıcaklıkta indüklenme işlemi gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon sonrası hücreler, 4°C’de, 3000xg’de 10 dk santrifüj edilerek rekombinant proteinler hücre içi üretildiği için süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre peletleri ise

1X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS: 50 mM potasyum fosfat; 150 mM NaCl, pH 7.2) ile süspansiyon hale getirilmiştir. Hücreler sonikatörde (30 sn x 4 döngü, %20 verim) parçalanmış ve sonrasında 4°C’de, 13000xg’de 10 dk tekrar santrifüj yapılmış ve süpernatant kısımları total protein derişimi, SDS-PAGE ve Western aktarım analizleri için kullanılmıştır.

3.2.1. Toplam Protein Derişimi

Toplam protein derişiminin belirlenmesi için Bradford yönteminden yararlanılmıştır [89]. Standard eğrisi (protein derişimi-absorbans grafiği) oluşturmak için 1 mg/ml derişime sahip ticari BSA (Bovin serum albumin) proteini farklı derişimlerde (0-1 mg/ml aralığında) olacak şekilde seyreltilerek oluşturulmuştur. 10 µl örnek ve 200 µl Bradford reaktifi olacak şekilde kuyulara eklenmiş ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra ise 595 nm’de ELISA okuyucuda absorbansları ölçülmüştür. Oluşturulan standart eğri yardımıyla örneklerin derişimleri belirlenmiştir.

3.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Rekombinant olarak üretilen Aap bölgeleri SDS-PAGE yöntemi ile standart metoda göre analiz edilmiştir [90]. Üretilmek istenilen proteinlerin moleküler ağırlığına göre belirlenen derişimde (%12’lik) SDS-PAGE jeline toplam protein miktarı aynı olacak şekilde örnekler yüklenmiştir. Bunun için örneklerin içerisine 4x yükleme boyasından uygun hacimlerde eklenmiş ve 95°C’de 5 dk boyunca kaynatılmıştır. Ardından 5 dk buz üzerine tutulan örnekler protein standardı (ladder) ile jele yüklenmiş ve ilk önce 100V’da 15 dk, ardından 120V’da 90 dk yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel 5 dk (3 kere) distile su ile yıkanmış ardından “Coomassie mavisi” boyası kullanılarak 1 saat boyamaya bırakılmıştır. Boyadan arındırma işlemi için distile su ile 15 dk (3 kere) yıkanmış ve görüntüsü alınmıştır.

3.2.3. Western Aktarım (Blotting)

Örnekler SDS-PAGE jeline ayrıştırıldıktan sonra, membran (PVDF) ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına yerleştirilmiştir. Bu işlem için ilk basamakta membran metanol ile ıslatılmıştır. Sonrasında, transfer tamponunda dengeye gelene kadar

bekletilmiştir. Sandviçin hazırlanması sırasında aktarım kasetine anot (+) kutbundan başlayarak sırasıyla transfer tamponu ile ıslatılmış sünger, aktarım kağıdı, membran ve jel yerleştirilmiştir. Sonrasında tekrar transfer tamponu ile ıslatılmış aktarım kağıdı ve sünger yerleştirilerek aktarım kaseti sıkı bir şekilde kapatılarak transferin yapılacağı tanka yerleştirilmiştir. Aktarım 50V'da, 3 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Membran PBS-T (Tween-20 içeren 1XPBS) tamponu ile yıkandıktan sonra, membrana aktarılan proteinler dışındaki bölgelerin kapatılması için bloklama tamponu ile muamele edilmiştir. Bloklama işleminden sonra yıkanan membran, antikor çözeltisi içinde inkübe edilmiş ve rekombinant proteinlerin varlığı kolorimetrik peroksidaz substratı kullanılarak belirlenmiş ve görüntülenmiştir.

3.2.4. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

Rekombinant olarak üretilen A1.0, B1.0 ve B1.5 r-Aap bölgelerinin his-etiketli bölgelerinden yararlanılarak saflaştırılmaları için, ticari kobalt temelli reçine kullanılarak, çöktürülen ve sonikasyon ile parçalanan hücrelerden afinite kromatografisi kullanılmış olup, üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk aşamada “reçine denge tamponu” (20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorit, 5 mM imidazol; pH 7,4) ile karıştırılmış ve 2 dk, 700xg'de santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak pelet kısmı saflaştırma için kullanılmıştır. Ardından, parçalanan hücrelerden elde edilen protein karışımı eklenmiş ve 30 dk boyunca etkileşmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminin ardından, süpernatant kısmı alınarak “flow through” olarak saklanmıştır. Pelet kısmı ise spesifik olmayan proteinlerin bağlanmasını önlemek için yıkama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorit, 30 mM imidazol; pH 7,4) eklenmiş ve santrifüj edilerek süpernatant kısmı ayrılmıştır. Yıkama işlemi üç kez yapılmış olup, sonraki adımda bağlanan his-etiketli proteinlerin kolondan ayrılması için elüsyon tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorit, 150 mM imidazol; pH 7,4) kullanılmış ve kolon 3-6 kez yıkanarak, protein saflaştırılmıştır.

Rekombinant olarak üretilen r-Aap'nin A1.0 ve B1.0 bölgelerinin ticari kobalt temelli boncuklara immobilizasyonu için, elüsyon basamağı hariç, yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış, yıkama işleminin ardından protein immobilize edilen boncuklar imidazol içermeyen tampon içerisinde 4°C'de saklanmıştır.

3.3. Aptamerlerin Hazırlanması

3.3.1. DNA Aptamer Kütüphanesi Tasarımı

DNA aptamer kütüphanesinin tasarımı sırasında dizinin başında ve sonunda yer alan primer bölgeleri, aptamerlerin PZR ile çoğaltılmasını sağlayan bölgeler olup homo-dimer ve hetero-dimer gibi ikincil yapıları oluşturma durumları IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) programı kullanılarak belirlenmiştir. Tasarım sırasında primerin 20 baz çifti uzunluğunda olması, homo-dimer ve hetero-dimer oluşumu için ΔG değerinin 0 ile -9 aralığında olması, 3' ucunda en azından bir adet G veya C bazının olması ancak 3'ten fazla bu bazlardan yer almaması dikkat edilen parametrelerdir.

Rekombinant olarak üretilen A1.0 ve B1.0 bölgeleri için aptamer seçiliminde kullanılması için tasarımı gerçekleştirilen aptamer kütüphanesi ile primerler IDT firmasına sentezletirilmiştir. Temin edilen aptamer kütüphanesi ile primerlere ait DNA dizilimleri Çizelge 3.4'te verilmiş olup aptamer kütüphanesi 10 mM Tris-HCl tamponu (pH:8,0) kullanılarak, primerler için ise Tris-EDTA tamponu (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH: 8,0) hazırlanmış, -20°C'de stoklanmıştır.

Çizelge 3.4. Tasarlanan aptamer kütüphanesi ve primer dizileri.

No	İsim	Dizi (5'-----3') (N: A, T, G, C)
1	AL (aptamer kütüphanesi)	TAGCGAAGATACCCAGGACG-40N CATCGGTTATGGTTCGCTCT
2	İleri primer	TAGCGAAGATACCCAGGACG
3	Geri primer	AGAGCGAACCATAACCGATG

3.3.2. Aptamerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Optimizasyon Deneyleri

Aptamer kütüphanesinin çoğaltılması için simetrik PZR, ssDNA aptamer kütüphanesinin SELEX döngülerinde kullanımı için hazır hale getirilmesi için “asimetrik PZR” (aPZR) yönteminden [91] yararlanılmıştır. Bunun için ilk aşamada simetrik PZR koşulları optimize edilmiş olup taranan başlıca parametreler: primer bağlanma sıcaklığı, ileri ve geri primer miktarlarının oranları, kullanılan DNA aptamer kütüphanesi miktarı ve PZR işleminin gerçekleştiği ortam koşullarıdır. Sonraki aşamada, simetrik PZR sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda aPZR koşulları optimize edilmiştir. Taranan koşullar Çizelge 3.5’te verilmiş olup, PZR işlemi termal döngüleyicide gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. PZR tarama koşulları.

Tarama Koşulları	Miktar/Polimeraz adı
Primer bağlanma sıcaklığı	52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C
Primer miktarı	200 nM-2 µM
Mg ⁺² derişimi	1,5 mM, 2 mM, 3 mM
DNA polimeraz	Vent polimeraz
Döngü sayısı	10, 15, 20, 25, 30, 35
Aptamer kütüphanesi derişimi	2,5 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng

Simetrik PZR koşullarının optimizasyonu sonrasında, tek zincirli olarak aptamer kütüphanesinin elde edilmesi için asimetrik PZR koşulları optimize edilmiş olup, bunlar ileri ve geri primer miktarları ile PZR döngü sayısıdır. Taranan koşullara ilişkin bilgiler Çizelge 3.6’da verilmiş olup, PZR işlemi termal döngüleyicide gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. aPZR tarama koşulları.

Tarama Koşulları	Miktar
Primer derişimi	100 µM, 80 µM, 50 µM, 20 µM
Döngü sayısı	10, 40

3.3.3. Agaroz Jel Elektrofözezi ile Aptamerlerin Analizi

DNA aptamer kütüphanesi ile primerlerin PZR ile çoğaltılması için gerekli koşulların optimizasyon çalışmalarında kullanılmış olup bölüm 3.1.5'te belirtildiği şekilde jel hazırlanmıştır. Simetrik PZR sonucunda elde edilen DNA bantlarının tanımlanması için %2'lik, aPZR sonucunda elde edilen DNA örnekleri için ise %3'lük agaroz jel kullanılmıştır.

3.3.4. Üre-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (Üre-PAGE)

Üre-PAGE, aPZR sonucunda elde edilen dsDNA ve ssDNA karışımının ayrılması ile ssDNA'nın jelden saf olarak elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır [92]. Bunun için ilk aşamada GC bakımından zengin olan kuyruk içeren ileri primer ve geri primer farklı oranlarda (50:1) kullanılarak aPZR yapılmıştır. Sonraki aşamada ise aPZR sonucunda oluşan ssDNA ve dsDNA'nın ayrılması için 8 M üre içeren %10'luk poliakrilamid jel çözeltisi hazırlanmış olup bileşenleri Çizelge 3.7'de verilmiştir. Yükleme öncesinde örnekler %90 oranında formamid içeren yükleme boyası (2x, formamid, brom fenol mavisi, EDTA) ile karıştırılarak 95°C'de 5 dk kaynatılmış ardından 5 dk buz üzerinde tutulmuştur. Örnekler yüklenmeden önce hazırlanan jel 55°C'de 30 dk 200V'da koşturulmuş, ardından örnekler yüklenerek aynı volt ve sıcaklıkta 1-2 saat yürütülmüştür. Yürütme sonrasında jel 25 µl etidyum bromür içeren 300 ml 1x TBE tamponu ile 15 dk boyanmış, ardından 5 dk 1xTBE tamponu ile yıkanmış ve jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.7. Üre-PAGE bileşenleri.

Bileşenler	Miktar (50 ml)
%40 Akrilamid/Bisakrilamid	12,5 ml
10x TBE tamponu	5 ml
Üre	24 g
%30 APS	166 µl
TEMED	20 µl
dH ₂ O	50 ml'ye kadar

3.3.5. ssDNA'nın Üre-PAGE Jelinden Ekstraksiyonu ve Etanol ile Çöktürülmesi

Üre-PAGE'de ssDNA ve dsDNA'nın boyutlarına göre ayrılması sağlanmış, ardından uygun boyutta elde edilen ssDNA bantları jelden kesilmiştir. Kesilen jel parçaları uygun miktarlarda 10 mM Tris-HCl tamponu içerisinde 16 sa 4°C'de bekletilmiş, ardından santrifüj yapılarak sıvı faz kısmı alınmıştır. Jelden izole edilen ssDNA'nın saflaştırılması ve daha konsantre hale getirilmesi için etanol ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için ssDNA örneklerinin üzerine hacimlerinin 1/10'u oranında 3 M sodyum asetat, hacimlerinin 2,5 katı kadar ise %100 soğuk etanol eklenmiş ve 16-18 sa -86°C bekletilmiştir. Ardından 4°C'de 21000xg'de 8 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları atılmış ve üzerlerine %70'lik soğuk etanol eklenerek 21000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısmı dökülerek kalan etanol tamamen uzaklaştırılmış ve peletlerin kuruması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. En son aşamada ise peletler 10 mM Tris-HCl ile çözülmüştür.

3.4. SELEX Deneyleri

SELEX döngüsünün başlangıcında aptamer kütüphanesi 100 µl bağlama tamponu (Binding Buffer-BB: 20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, pH 7,4) ile muamele edilerek 94°C'de 10 dk denatüre edilmiştir. Ardından 15 dk buz üzerinde tutulmuş ve sonra 7 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

3.4.1. Bağlama

Bu basamakta farklı dizilere sahip olması sebebi ile her biri farklı üç boyutlu şekiller oluşturan ssDNA kütüphanesi dizilerinden uygun şekle sahip aptamerlerin hedef proteinler olan r-A1.0 ve r-B1.0 bölgeleri ile etkileşime girerek bağlanması beklenmektedir. Bu aşamada ilk SELEX döngüsü için 25 µg aptamer kütüphanesi, 2. SELEX döngüsü sırasında ise 1 µg ssDNA havuzu, kobalt temelli agaroz boncuklara immobilize edilmiş r-Aap protein bölgeleri ile 75 dk 100 rpm hızında çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 3. SELEX döngüsü sırasında ise 1 µg ssDNA havuzu protein immobilize edilmemiş kobalt temelli agaroz boncuklar ile 75 dk 100 rpm hızında çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4. ve 5. SELEX döngüsünde 0,75 µg; 6., 7., ve 8. SELEX döngüleri sırasında ise 0,60 µg olacak şekilde ssDNA havuzu kullanılmıştır.

3.4.2. Yıkama

İnkübasyondan sonra bağlanmayan ve düşük afinitelerle bağlanan aptamer dizilerini ortamdaki uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmış olup, bunun için aptamer-protein kompleksi 200 µl bağlama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Üçüncü SELEX döngüsünden sonra hem yıkama hacmi hem de miktarı artırılarak aptamer havuzunun zenginleşme katsayısı artırılması hedeflenmiştir.

3.4.3. Elüsyon

Yıkama işlemi sonrasında hedef moleküle bağlanan aptamerlerin A1.0 ve B1.0 protein bölgelerinden ayrılması sağlanmıştır. Bunun için 200 µl bağlama tamponu ile aptamer-protein kompleksi 80°C'de 10 dk 50 rpm hızında çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları toplanmıştır. Bu işlem SELEX döngüleri boyunca farklı sayılarda tekrarlanmıştır.

3.4.4. ssDNA Havuzunun Oluşturulması

Elüsyon sonrasında elde edilen hedef moleküle bağlanan dizilerden oluşan DNA havuzu, aPZR yöntemi ile çoğaltılarak tek zincirli hale getirilmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen aPZR ürünlerinin 8 M üre içeren %10'luk poliakrilamid jel hazırlanarak, üre-PAGE yöntemi ile ayrılması sağlanmış ve etanol ile çöktürme yöntemi ile de istenilen boyuttaki ürünlerin saflaştırılması sağlanmıştır.

3.5. ELONA (Enzim Bağlı Oligonükleotid Analizi)

SELEX döngüleri arasında elde edilen ssDNA havuzunun zenginleşme durumunun belirlenmesi için ELONA testinden yararlanılmıştır. Bunun için her döngü sonrasında elde edilen ssDNA havuzu biotin işaretili primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltma işlemi için ilk aşamada simetrik PZR, ardından aPZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. aPZR sonrası ürünler üre-PAGE yardımıyla ayrıştırılarak biotin işaretili DNA bantları jelden kesilerek izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. A1.0 ve B1.0 protein bölgeleri 96 kuyulu plakalara 150 ng/kuyu olacak şekilde 16 saat immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi sonrasında plaka ters çevrilerek kuyular boşaltılmış ve 100 µl %0,05 Tween-20 içeren 1X PBS yıkama tamponu ile 5 dk boyunca 3 kez yıkanmıştır. Ardından kuyular %5 BSA içeren 1X PBS bloklama tamponu ile 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 100 µl yıkama tamponu ile 5 dk boyunca 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Sonrasında 95°C'de 10 dk, ardından buzda 10 dk bekletilen 100 µl aptamer havuzu kuyulara eklenmiş ve protein bölgeleri ile 1 saat boyunca etkileşimi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında 100 µl yıkama tamponu ile 5 dk boyunca 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından 100 µl 1:10000 oranında seyreltilmiş streptavidin-HRP kuyulara eklenmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 100 µl yıkama tamponu ile 5 dk boyunca 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında 100 µl TMB substratından kuyulara eklenmiş, 10-30 dk boyunca etkileşimi sağlanmış, sonrasında reaksiyon 50 µl 2 M H₂SO₄ ile durdurulmuş ve 450 nm'de absorbans değerleri ölçölmüştür.

3.6. Aptamer Havuzlarının Klonlanması, Dizi Analizi ve Karakterizasyonunun Yapılması

A1.0 ve B1.0 bölgeleri için yapılan 8 SELEX döngüsü sonucunda elde edilen aptamer havuzlarının klonlanması için ticari olarak temin edinilen “pGEM®-T klonlama kiti” kullanılmış olup klonlanma sürecinde yapılanlar aptamer havuzlarının işaretli primerler kullanılarak çoğaltılması, saflaştırılması, aptamer havuzlarına adenin bazı eklenmesi, ekleme reaksiyonu (ligasyon) ve transformasyon işlemlerini kapsamaktadır. Transformasyon işlemi sonrasında istenilen aptamer havuzlarını taşıdığı tespit edilen koloniler petrilerden seçilerek dizi analizine gönderilmiş ve sonuçlar ClustalX2.1 programı ile karşılaştırılmıştır. Aday aptamerlerin ikincil yapılarının belirlenmesi için ise Mfold programından (<http://www.unafold.org/>) yararlanılmıştır.

Aptamerler ile Aap protein bölgeleri arasındaki bağlanma durumunu gösteren aptamerlerin ayrılma sabiti, K_d,

$$Y=(B_{max}.X)/(K_d + X)$$

(Y: net floresans yoğunluğu, B_{max}: maksimum floresans yoğunluğu, X: aptamer derişimi) formülü ile, nonlineer regresyon analizi kullanılarak hesaplanmıştır.

Ayrıca, aptamerlerin serum ortamındaki yarılanma ömrü analizi yapılmıştır. Bunun için 100 µl ticari serum içerisine 10 µl aptamer çözeltisi eklenmiş 37°C de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Belirli aralıklarla 10 µl alınarak üzerine 1 µl proteinaz K eklenmiş ve 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnek üzerine 50 µl 1X PBS, 50 µl of kloroform, 100 µl metanol eklenerek karıştırılmıştır. Ardından 50 µl deiyonize su ile 50 µl kloroform eklenmiş ve 500 g, 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan sıvı faz kısmı alınarak %12’lik üre-PAGE ile analiz edilmiştir.

3.6.1. PZR, AgaroZ Jel Elektrofözezi ve PZR Sonrası Saflaştırma

A1.0 ve B1.0 protein bölgelerine karşı yapılan 8 SELEX döngüsü sonucunda elde edilen havuzlar işaretsiz primerler kullanılarak Çizelge 3.8’de verilen koşullar kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.8. Optimize edilen PZR koşulları.

Bileşenler	Miktar	Son
dH ₂ O	50 µl’ye kadar	
Reaksiyon tamponu (10x)	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	1 µl	200 µM
İ. primer (50 µM)	1 µl	1 µM
G. primer (50 µM)	1 µl	1 µM
Kalıp DNA	3 µl	10 ng
DNA Polimeraz	0,25 µl	1,25 u

PZR programı (2---4: 40 döngü)	
1.	95°C 30 s
2.	95°C 15 s
3.	56°C 15 s
4.	68°C 20 s
5.	68°C 5 dk

PZR sonrasında elde edilen DNA moleküllerinin ayrımı ve saflaştırılması için %3'lük agaroz jel hazırlanmış ve 100V'da 45-60 dk yürütülmüş, jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır. PZR sonrasında enzimlerin inaktive edilmesi, primerler ya da nükleotidler gibi bileşenlerin ortamdaki uzaklaştırılması için jel ekstraksiyon kiti kullanılmış olup bu işlem üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Aptamerlerin Ucuna Adenin Bazı Eklenmesi

Ticari olarak satın alınan "pGEM®-T" plazmiti 3' terminal uçlarında timin bazı bulunan lineerize edilmiş vektör sistemi olduğundan, klonlanması istenilen aptamerlerin (aptamer havuzundan seçilen ssDNA'ların) uç kısımlarına adenin bazının eklenmesi için bu işlem üretici firmanın protokolüne uygun olarak, bileşimi Çizelge 3.9'da verilen reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9. A-bazı ekleme işleminde kullanılan bileşenler.

Reaksiyon karışımı bileşenleri	A1.0 /B1.0 (Son kons.)	Hacim (µl)
Saflaştırılan PZR ürünü	0,15-1,5 pmol	
dATP (10 mM)	0,2 mM	1 µl
PZR reaksiyon tamponu (10x)	1X (1,5 mM MgCl ₂)	5 µl
DNA polimeraz	1 U	0,2 µl
dH ₂ O		50 µl'ye kadar
Toplam hacim		50 µl

3.6.3. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

Ligasyon işlemi, T4 DNA ligaz enzimi varlığında, plazmid vektör DNA'sı ve PZR ürününün (aptamer havuzu) birleşmesi için yapılmış olup, reaksiyon karışımının içeriği Çizelge 3.10'da verilmiştir. Ligasyon işlemi için aptamer-vektör molar oranı 3:1 olarak kullanılmış olup, bu hesaplama için "NeoBiocalculator" programından yararlanılmıştır (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

Çizelge 3.10. Ekleme reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Reaksiyon karışımı bileşenleri	Standart reaksiyon	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
T4 DNA Ligaz Tamponu	5 µl (2x)	5 µl (2x)	5 µl (2x)
Vektör DNA (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PZR ürünü (aptamer havuzu) (80 bç)	X µl	-	-
Kontrol kalıp DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
dH ₂ O	10 µl'ye kadar	1 µl	1 µl
Toplam Hacim	10 µl	10 µl	10 µl

Reaksiyon karışımı 16°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Örnekler, ligasyon işleminden sonra *E. coli* (JM109) konak hücrelerine transformasyonda kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.6.4. Transformasyon

Aptamer DNA bölgelerini içeren plazmidin çoğaltılması için kimyasal-kompetan *E. coli* (JM109) suşu kullanılmış ve mavi-beyaz koloni hücre oluşumuna dayalı transformant belirleme yönteminden yararlanılmıştır. Bunun için *E. coli* (JM109) suşu 37°C'de 16 saat, antibiyotik içermeyen sıvı besiyerinde inkübe edilerek çoğaltılmış ve 3000xg'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısımları dökülerek pelet kısımları 100 mM CaCl₂ ile çözülerek kompetan hücre elde edilmiştir. Hazırlanan 50 µl hacminde kompetan hücre içerisine 5 µl plazmid eklenmiştir. 90 sn süre ile 42°C'de ısıl şoklama sonucunda, plazmid DNA'nın hücrelerin içine alınması sağlanmış ve 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Hücrelerin üzerine 750 µl zengin içerikli besi ortamı eklenmiş ve 37°C'de 60 dk, 200 rpm'de çalkalandıktan sonra, 50 µl transformasyon karışımı seçici antibiyotik, IPTG ve X-gal içeren katı besi ortamına inoküle edilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.6.5. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi

Transformasyon sonucunda katı besiyerinde çoğalma gözlenen kolonilerden belirli sayıda koloni seçilerek antibiyotik içeren sıvı besiyerine inokülasyon yapılmış ve 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plazmid DNA’sı ticari kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için aynı koloniler için işaretli primerler kullanılarak koloni PZR yönteminden yararlanılmış olup Çizelge 3.8’de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR örnekleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak analiz edilmiştir. Koloni PZR işlemi sonrasında istenilen aptamer havuzlarını taşıdığı tespit edilen koloniler DNA dizi analizine gönderilmiş ve sonuçlar ClustalX2.1 programı ile karşılaştırılmıştır.

3.7. Titanyum Disklerin Hazırlanması

Titanyum malzemesi olarak ASTM F136 standardına uygun, Ti-6Al-4V alaşımında, Grade 5-ELI olan titanyum tercih edilmiş olup, 2 mm kalınlığında diskler halinde lazer kesim ile kestirilmiştir. İlk aşamada titanyum diskler silan gruplarının daha fazla bağlanmasını sağlamak amacıyla 80 grit zımbara ile daha sonra ise 220 grit zımbara ile soldan-sağa ve aşağıdan yukarıya iki yönlü olarak 5'er dakika zımparalanmıştır. Daha sonra sırasıyla deiyonize su, etanol, aseton ve etanol, son olarak da tekrar deiyonize su ile ultrasonik banyoda temizlenmiştir. Sonraki aşamada ise 30 dk % 30 nitrik asit ile muamele edilmiş ve işlem sonunda tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.7.1. Kitosan Kaplı Disklerin Hazırlanması

Kitosan kaplamada titanyum yüzey ile kitosan arasında kimyasal bağ oluşumunun sağlanması için silanizasyon reaksiyonlarından yararlanılmıştır. Titanyum yüzeye silan bağlayıcı ajan olarak 3-izosiyanotopropiltrioksosilan (IPTES) kullanılmıştır. pH 4,5–5,5 aralığında olacak şekilde %2’lik IPTES çözeltisi ile titanyum diskler 10 dk boyunca oda sıcaklığında muamele edilerek silanların etoksi grupları ile titanyum yüzeyindeki oksit ve hidroksit grupları arasında hidrojen bağı oluşması sağlanmıştır. Bağlanmayan silan gruplarının disk yüzeyinden yıkanmasını sağlamak için etanolle yıkanmış ve 110°C’de 10 dk bekletilerek hidrojen bağlarının Si-O kovalent bağına dönüştürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada kitosanın titanyum yüzeyine bağlanması için ara

molekül olarak kullanılan gluteraldehitin (GA) disk yüzeyine bağlanması için diskler oda sıcaklığında pH 4,3'te %2'lik GA çözeltisi ile 16 saat etkileşime bırakılmıştır. İşlem sonunda bağlanmayan aldehit gruplarının yıkanması için deiyonize su kullanılmıştır. %1'lik (v/v) asetik asit çözeltisinde farklı molekül ağırlıklarında ve derişimlerde hazırlanan kitosan çözeltileri (%1 (w/v) düşük molekül ağırlıklı kitosan-1DMAK; %2 (w/v) düşük molekül ağırlıklı kitosan-2DMAK; %1 (w/v) orta molekül ağırlıklı kitosan-1OMAK; %2 (w/v) orta molekül ağırlıklı kitosan-2OMAK) diskler üzerine dökülerek 16 saat 4°C'de bekletilmiş ve sonrasında kurumaya bırakılmıştır [87, 93].

3.7.2. Kitosan ile Kaplanan Titanyum Yüzeylerin Karakterizasyonu

3.7.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) kitosan ile kaplama yapılan titanyum disklerin yüzey özelliklerinin incelenmesi için kullanılmıştır. Kullanılan bu görüntüleme yöntemi TESCAN GAIA3 FIB-SEM ile HÜNİTEK'de gerçekleştirilmiştir.

3.7.2.2. ATR-Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi

Kitosan ile kaplama yapılan titanyum yüzeylerde kimyasal bağlara bağlı olarak meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için, Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR cihazı kullanılmış ve OMNIC programından yararlanılmıştır.

3.7.2.3. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (EDX)

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (EDX) titanyum yüzeylerin kitosan ile kaplaması sonrasında meydana gelen element durumlarının değişimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Bunun için, HÜNİTEK'de TESCAN GAIA3 FIB-SEM kullanılmıştır.

3.8. Aptamerlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

3.8.1. Biyofilm İnhibisyon Testi (Mikroplak Yöntemi)

Hem kitosan ile kaplanan hem de kaplama yapılmayan titanyum yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunun tespit edilebilmesi için biyofilm oluşturan *S. epidermidis* RP62A

(ATCC 35984) suşu ile biyofilm oluşturmeyen *S. epidermidis* (ATCC 12228) suşu kullanılmış olup TSB besiyerine inoküle edilmiş ve 16 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süreç sonunda çoğalan bakteri kültürlerinden alt kültür yapılarak hücre yoğunluğunu 1×10^8 olana kadar 37°C’de inkübe edilmiştir. Uygun hücre yoğunluğuna ulaşan kültürlerden 1 ml alınarak yüzeylerinde 500 nM aptamer bulunan ve bulunmayan titanyum disk içeren kuyulara ilave edilmiştir. Bakteri biyofilm oluşumuna izin vermek için 24 saat boyunca çalkalanmadan inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra biyofilm oluşmasını takiben kuyular içerisindeki bakteri kültürleri boşaltılarak tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak için fosfat tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Disk üzerindeki biyofilm yapısının bozulmasını önlemek için oda sıcaklığında 15 dk boyunca 1 ml metanol ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Metanolün ortamdaki uzaklaştırılmasının ardından biyofilm yapısının 1 ml %0,2 (w/v) kristal viyole çözeltisi ile 15 dk boyanması sağlanmıştır. Boyama işlemi sonrasında fazla boyanın ortamdaki uzaklaştırılması için deiyonize su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyanan diskler üzerine 1 ml %33 (v/v) asetik asit çözeltisi ilave edilmiş ve mikropalak okuyucu kullanılarak 595 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.8.2. SEM Analizi

Biyofilm oluşumunun SEM ile analizi için 24 saat sonunda biyofilm oluşumunu takiben kitosan ile kaplanan ve kaplanmayan titanyum diskler fosfat tampon ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında biyofilm oluşturan hücrelerin canlı hallerine en yakın olan biçimde korunmasını sağlamak amacıyla fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup bunun için diskler %3 gluteraldehit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Hücrelerin yapısından suyun uzaklaştırılması için etanol çözelti serisi kullanılmış olup sırasıyla %35 etanol, %50 etanol, %70 etanol, %80 etanol, %90 etanol, %95 etanol ve %100 etanol içinde 10 dk inkübe edilerek hücreler dehidrate edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Rekombinant Aap Proteininin Elde Edilmesi

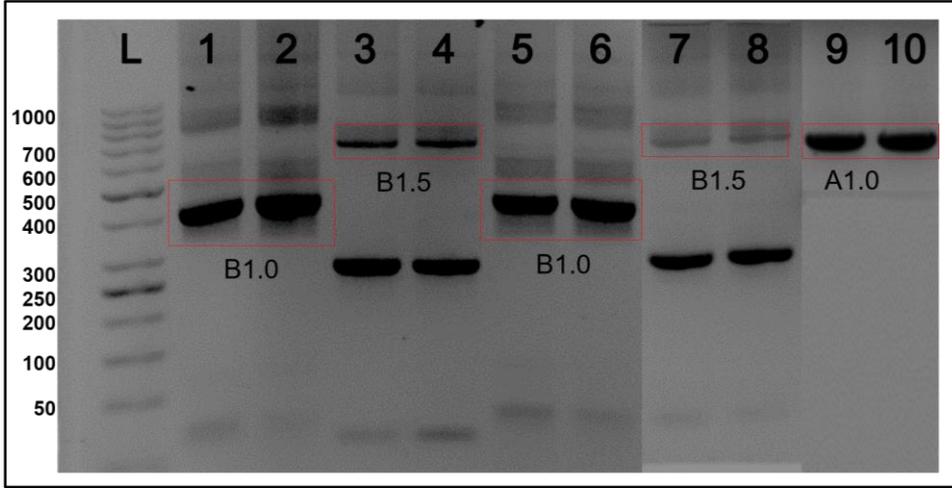
4.1.1. Rekombinant Aap Proteini Üretimi için Vektör ve Primer Tasarımı

Plazmid DNA'sının ve hedef genlerin ligasyonu sonucu oluşan yapı "ApE" programından yararlanılarak tasarlanmıştır. *S. epidermidis* RP62A suşunun B1.0, B1.5 ve A1.0 bölgelerinin çoğaltılması için gerekli olan primer tasarımının ilk aşamasında *E. coli* suşunda nadir kodon incelemesi yapılmış ve primer tasarımında nadir kodonların nokta mutasyonlar ile değiştirilebilecek olması nedeniyle B1.0 ve B1.5 gen bölgeleri içerisinde yer alan "GGA" nadir kodonundan kurtulmak için primer içerisinde bu kodon aynı amino asiti kodlayan "GGC" ile değiştirilmiştir. A1.0 gen bölgesi için nadir kodon listesi incelendiğinde GGA kodonu yerine ise GGC veya GGT kodonlarının kullanılacağı belirlenmiş ve oluşma oranının daha yüksek olması nedeniyle "GGC" kodonu geri primer tasarımına eklenmiştir. Ayrıca primer tasarımı sırasında, primerin 5' ucuna vektöre hedef genlerin ligasyonu için gerekli olan kesim enzimleri tanıma dizileri ve enzimlerin düzgün çalışması için 6 bazdan oluşan "dummy sekans" eklenmiştir.

IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) programı kullanılarak belirlenen, primerlerin ikincil yapılarla ilişkin bilgiler incelenmiş, tasarımda etkili olmuştur. Örnek bir yapı analizi Ek-1'de verilmiştir. Homo-dimer ve hetero-dimer oluşma durumlarına ilişkin verilen üç dimer yapısı için ΔG değerlerine göre dimer yapıları seçilmiştir.

4.1.2. PZR ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Gen bölgelerinin çoğaltılmasında 50 μ l hacminde olacak şekilde PZR reaksiyon karışımı hazırlanmış ve PZR işlemini doğrulamak için agaroz jel elektrofrezisi kullanılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde 100 V, 40-50 dk boyunca yürütülmüş ve jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.1).

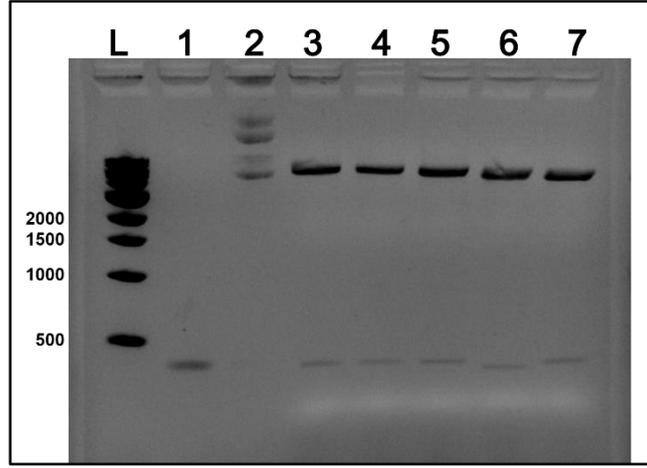


Şekil 4.1. A1.0, B1.0 ve B1.5 gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Şekil 4.1’de verilmiş olan görüntü B1.0 ve B1.5 gen bölgeleri için PZR sonrasında istenilen boyutta DNA bantı elde edildiğini, ancak tekrarlayan bölgelerin varlığı sebebiyle birden fazla spesifik olmayan DNA amplikonunun oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle hedef gen bölgeleri agaroz jelden ekstrakte edilerek sadece istenilen gen bölgesinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi

Transformasyon sonrasında hedef geni taşıyan kolonilerin belirlenmesi için ilk aşamada plazmidler hücrelerden saflaştırılmış ardından restriksiyon enzimleri kullanılarak ikili kesim yapılmıştır. Kesim işlemi sonrasında istenilen genin varlığı, agaroz jel elektroforezinde beklenen DNA boyutunda bant oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Restriksiyon enzimleri ile ikili kesim sonrası örneklerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1. kuyu, hedef gen; 2. kuyu, kesilmemiş plazmid; 3-7. kuyular, transformasyon sonrası seçilen kolonilere ait örnekler).

Restriksiyon enzimleri ile ikili kesim sonrasında hedef gen ile aynı boyutta DNA bantına sahip olduğu agaroz jel elektroforezi görüntüsü ile belirlenen koloniler (Şekil 4.2, 3., 4., 5. ve 7. kuyular), her bir gen bölgesi için farklı sayıda olacak şekilde DNA dizi analizi yaptırılmak üzere uygun besi ortamında çoğaltılarak saflaştırılmış ve dizi analizi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizileri NCBI (National Center of Biotechnology Information)'nin veri tabanında bulunan diziler ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). DNA dizi analizi yaptırılan örnekler ile beklenen gen dizilimlerinin karşılaştırılmasına ait görüntüler Ek-2'de verilmiştir.

DNA dizi sonuçları incelendiğinde her bir gen bölgesi için beklenen gen dizilimi ile DNA dizi analizi yaptırılan örneklerin birbirine %99-100 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısı ile her iki plazmid için de A1.0, B1.0 ve B1.5 gen bölgelerinin başarılı bir şekilde klonlandığı belirlenmiştir.

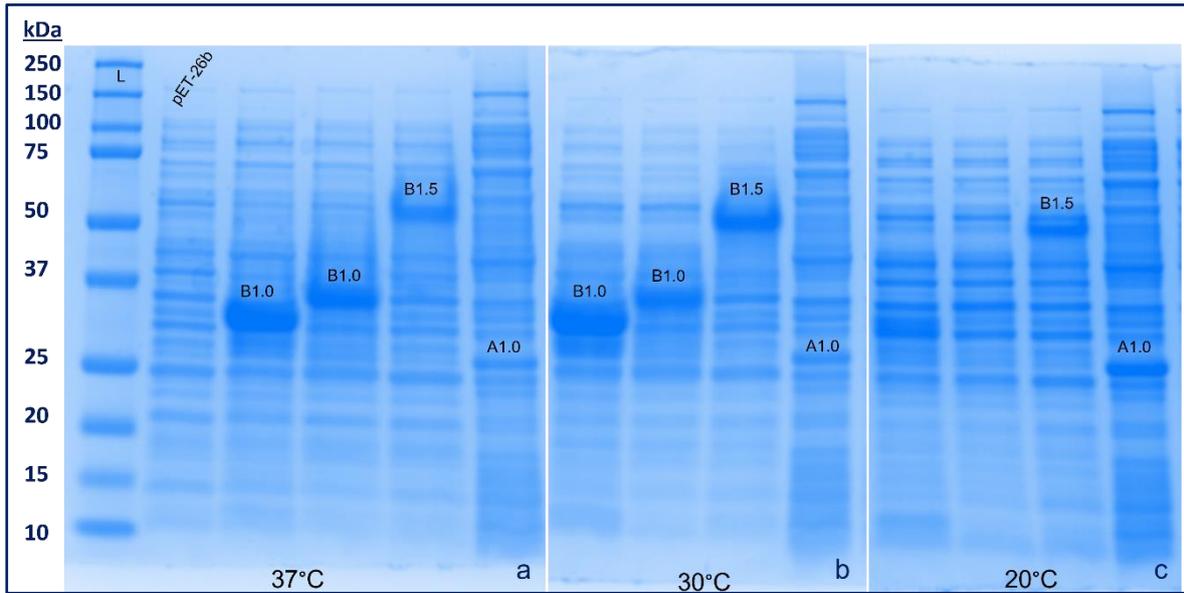
4.2. Aap Proteininin Saflaştırılması ve Analizi

4.2.1. Total Protein Derişimi

Bradford reaktifinin proteinlere bağlanarak renk oluşumu esasına dayalı olan bu yöntemde oluşan rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Derişimi bilinen BSA proteininden farklı derişimlerde protein örnekleri hazırlanmış ve 595 nm’de absorbansları ölçülerek kalibrasyon eğrisi her analiz için hazırlanmış, bir örneği Ek-3’te verilmiştir.

4.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

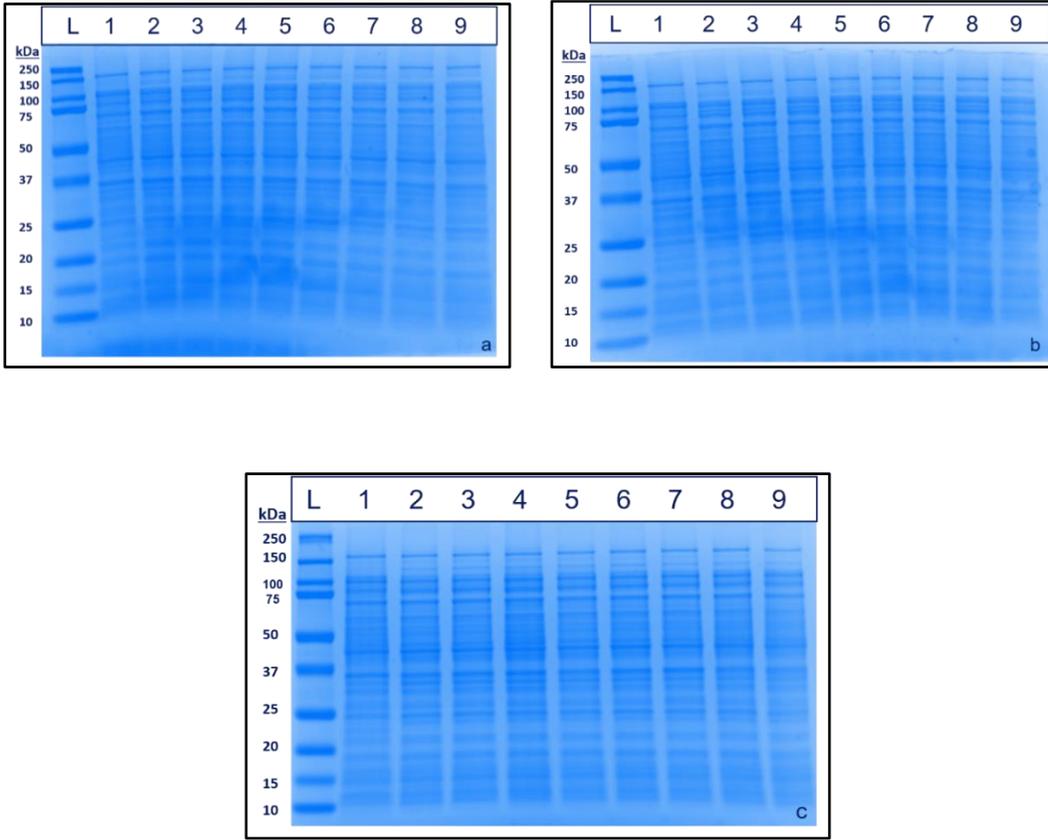
Rekombinant B1.0 ve B1.5 proteinlerinin üretimi hem sitoplazmik, hem de periplazmik ortamlarda denenmiş olup söz konusu koşullarda üretilen proteinlere ait SDS-PAGE görüntüleri sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te verilmiştir.



Şekil 4.3. B1.0, B1.5 rekombinant proteinlerinin periplazmik, A1.0 rekombinant proteinin ise sitoplazmik ortamda üretilmesi için a) 37°C, b) 30°C ve c) 20°C sıcaklıklarında IPTG ile indüklenmesi ile elde edilen SDS-PAGE görüntüsü

SDS-PAGE analizinde, periplazmik olarak üretilen B1.0 ve B1.5 protein bölgeleri beklenen molekül ağırlıklarından (17 kDa ve 25,5 kDa) daha yüksek konumda bant oluştuğu gözlenirken, A1.0 için beklenen molekül ağırlığında (25,5 kDa) bant oluşumu gözlenmiştir. Literatür ile kıyaslandığında, B1.0 ve B1.5 için beklenen yerden daha yüksek yerde bant oluşumu açısından benzer sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir. Yan ve arkadaşları, B1.0 protein bölgesinin immün cevap üzerine etkisini araştırmak için yapmış oldukları çalışmada, B1.0 bölgesi rekombinant olarak üretmiş ve benzer şekilde SDS-PAGE analizinde 25-37 kDa aralığında bant elde etmişlerdir [94]. Ayrıca çeşitli kaynaklarda, beklenilenden daha yüksek molekül ağırlığında bant elde edilmesinin nedeni olarak proteinin içeriğinin asidik amino asitlerce (aspartat ve glutamat) yüksek olmasına bağlı olarak proteinin jelde daha yavaş ilerlemesi gösterilmiştir [95, 96]. Ek olarak, bazı koşullar altında B1.0 ve B1.5 protein bölgelerinin kendi üzerlerine katlanarak dimer oluşturmaları da bu durumun oluşmasına neden oluşturabildiği belirtilmiştir [97].

İndükleme sıcaklıkları açısından SDS-PAGE görüntülerinden periplazmik olarak üretilen B1.0 ve B1.5 20°C’de yapılan indüklemeye oranla 37°C ve 30°C’de yapılan indükleme sonrası protein üretiminin daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. A1.0 protein bölgesi için ise 20°C’de yapılan indüklemenin 37°C ve 30°C’de yapılan indüklemeye oranla protein üretimi açısından daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. İndükleme sıcaklıkları belirlenen örneklerin daha sonraki aşamalar için üretimleri, belirlenen sıcaklıklarda yapılmıştır.

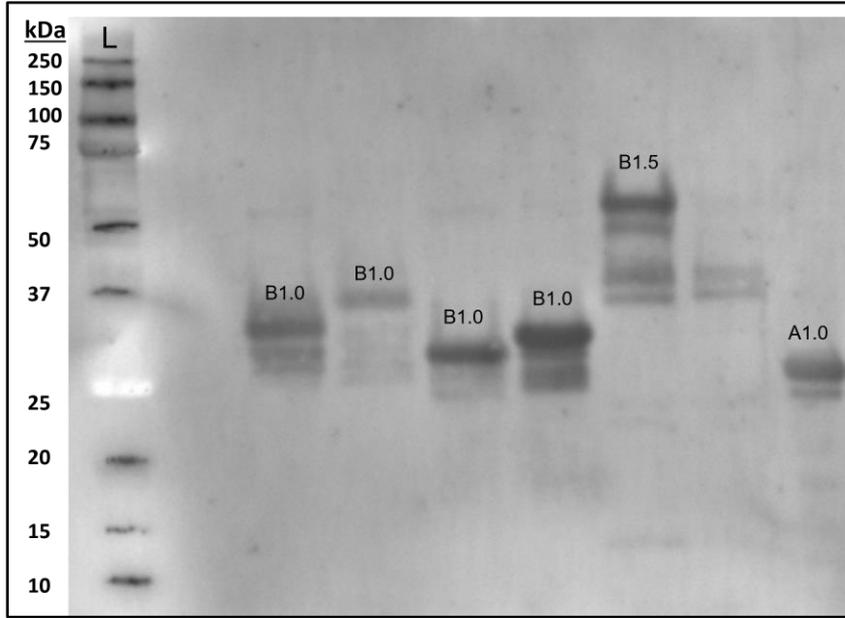


Şekil 4.4. B1.0 ve B1.5 rekombinant protein üretimlerinin sitoplazmik ortamda iki farklı konak hücrede a) 37°C, b) 30°C ve c) 20°C sıcaklıklarında IPTG ile indüklenmesi ile elde edilen SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; 1, boş pET-28a plazmidi; 2, 3, 4 *E. coli* BL21(DE3) B1.0; 6, 7, *E. coli* BLR(DE3) B1.0; 5, *E. coli* BL21(DE3) B1.5; 9, *E. coli* BLR(DE3) B1.5 bölgesi).

SDS-PAGE görüntülerinden stoplazmik olarak üretilmesi hedeflenen B1.0 ve B1.5 protein bölgelerinin farklı sıcaklıklarda ve farklı konak hücrelerinde beklenen şekilde üretilmediği belirlenmiştir. Bu nedenle Western aktarım ve saflaştırılma işlemlerine periplazmik üretim sonucu elde edilen örneklerle devam edilmiştir.

4.2.3. Western Aktarım (Blotting)

Rekombinant olarak üretilen A1.0, B1.0 ve B1.5 protein bölgelerinin içinde bulunduğu protein karışımından moleküler ağırlığına göre ayrılması sağlandıktan sonra protein bölgeleri membrana aktarılmıştır. Membrana aktarılan protein bantlarının görünürlüğü anti-His antikoruna ile sağlanmıştır (Şekil 4.5).



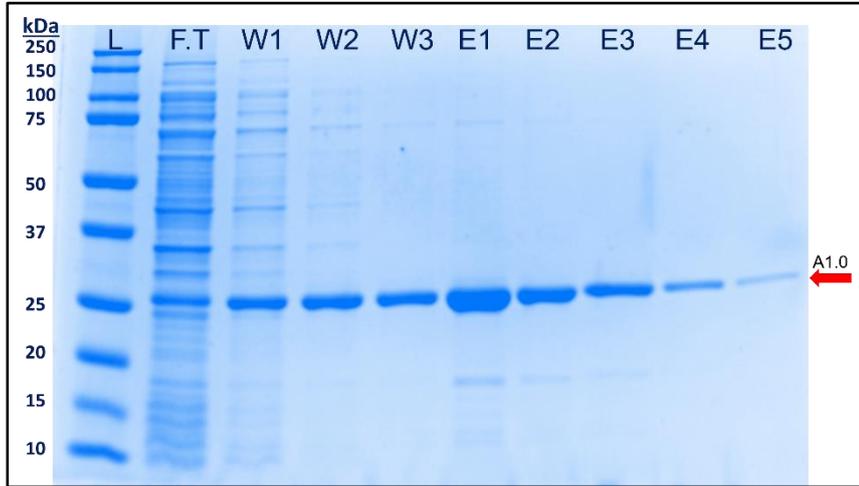
Şekil 4.5. B1.0, B1.5 ve A1.0 rekombinant protein bölgelerinin Western-aktarım görüntüsü

Western aktarım sonucunda, farklı kolonilerden elde edilen r-Aap B1.0, B1.5 ve A1.0 proteinlerinin C-ucunda 6xHis etiketinin varlığı nedeniyle, anti-His antikoruna ile arasındaki etkileşim sayesinde söz konusu bölgelerin rekombinant olarak üretildiği belirlenmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen görüntü (Şekil 4.3) ile karşılaştırıldığında aynı moleküler ağırlıkta bant oluşumu gözlenmesi ile sonuçların birbirini desteklediği görülmekte olup, sonraki aşamalar için Şekil 4.5'te yer alan 5., 6. ve 8. örnekler kullanılmıştır. Beklenen bantların altında gözlenen bantlar ise düşük oranda protein degradasyonu sonucu oluşabilmektedir.

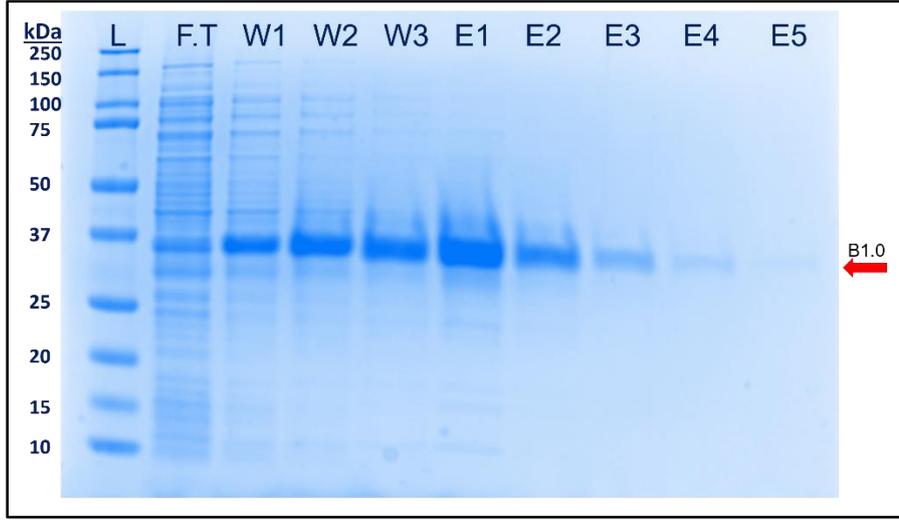
4.2.4. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

A1.0 ve B1.0 protein bölgelerinin agaroz boncuklara immobilize edilmesinden önce saflaştırma koşulları optimize edilmiş olup bunun için imidazol miktarı ve saflaştırma işlemi sırasındaki yıkama sayısı değiştirilmiştir. *E. coli*'de üretilen A1.0, B1.0 ve B1.5 r-Aap protein bölgelerinin his-etiketli bölgelerinden yararlanılarak saflaştırılmaları için, ticari kobalt temelli reçine kullanılmıştır. Saflaştırma örneklerinin analizi için öncelikle Bradford yöntemi ile protein derişimleri belirlenmiş, ardından SDS-PAGE yöntemi ile saflık durumları belirlenmiştir (Şekil 4.6-4.8).

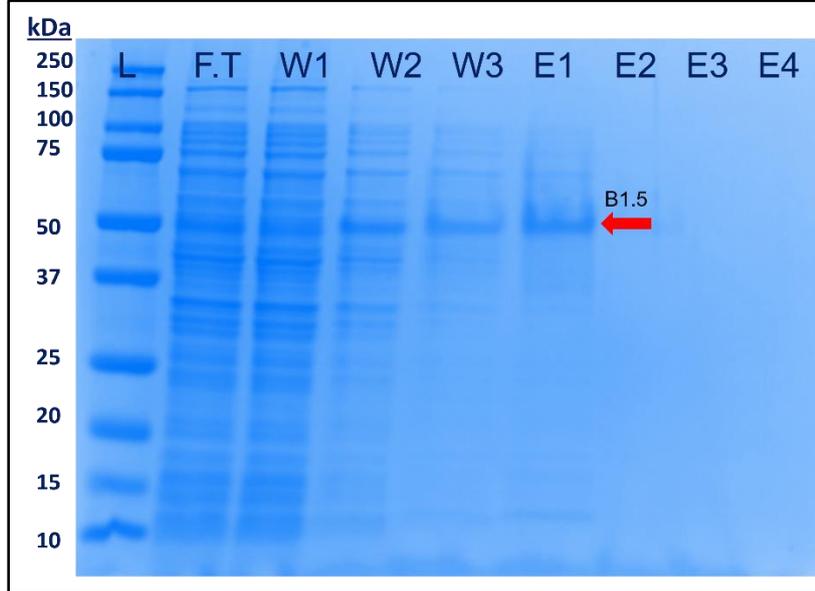
Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizinde görüldüğü üzere, A1.0 bölgesi 4. elüsyon basamağı sonunda $\geq\%95$ oranında, B1.0 bölgesi 4. elüsyon basamağı sonunda $\geq\%90$ oranında ve B1.5 bölgesi ise ilk elüsyon basamağı sonunda $\geq\%85$ oranında saflaştırılmıştır. Saflaştırılma oranı daha yüksek olduğu için A1.0 bölgesi ve B1.0 bölgesi ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.6. A1.0 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon; E5, 5. elüsyon).



Şekil 4.7. B1.0 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon; E5, 5. elüsyon).



Şekil 4.8. B1.5 rekombinant proteininin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE görüntüsü (L: ladder; F.T, flow through; W1, 1. yıkama; W2, 2. yıkama; W3, 3. yıkama; E1, 1. elüsyon; E2, 2. elüsyon; E3, 3. elüsyon; E4, 4. elüsyon).

4.3. Aptamerlerin Hazırlanması

4.3.1. DNA Aptamer Kütüphanesi Tasarımı

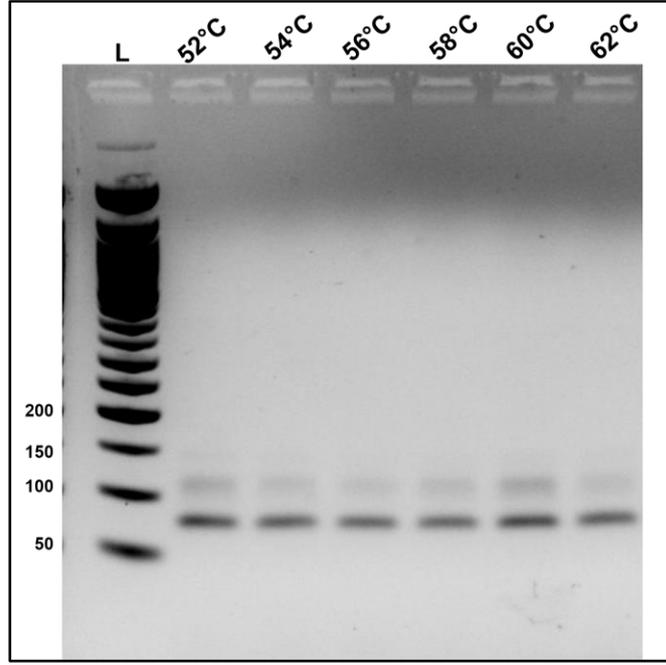
Literatürde, aptamer kütüphanesi tasarımı açısından farklı yöntemler ve farklı uygulamalar olmakla birlikte aptamer spesifikliğini ve afinitesi etkileyen parametrelerin başında, sabit bölgeler olarak isimlendirilen primer bölgeleri, rastgele bölge olarak ifade edilen aptamer özgünlüğünü sağlayan bölge ile bu bölgelerin uzunlukları gelmektedir.

Aptamer dizisinin başında ve sonunda yer alan primer bölgeleri, aptamerlerin PZR ile çoğaltılmasını sağlayan bölgeler iken, homo-dimer ve hetero-dimer gibi ikincil yapıları oluşturma durumlarına bağlı olarak başlangıç aptamer kütüphanesinin yapısının değişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) programı kullanılarak belirlenen ikincil yapılarla ilişkin bilgiler Ek-4'te belirtilmiştir. Homo-dimer ve hetero-dimer oluşma durumlarına ilişkin verilen üç dimer yapısı ΔG değerine göre seçilmiştir.

4.3.2. PZR Optimizasyon Çalışmaları ve Agaroz Jel Elektroforezi

Aptamer kütüphanesinin çoğaltılmasında 50 μ l hacminde olacak şekilde PZR reaksiyon karışımı hazırlanmış ve PZR işlemini doğrulamak için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

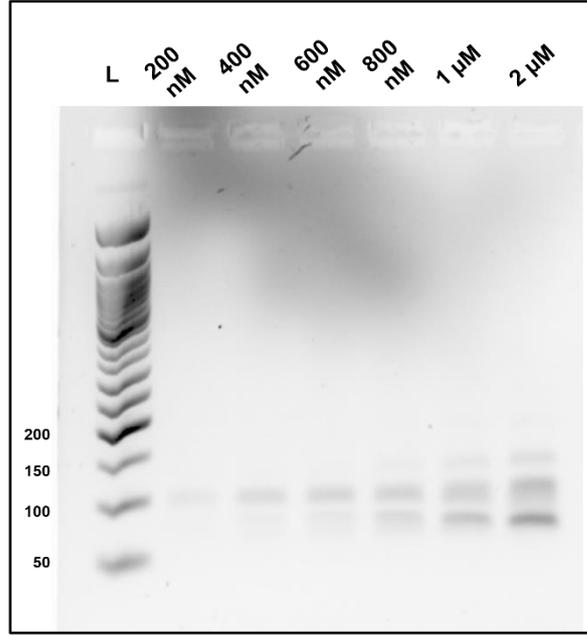
Tasarlanan primerler ile aptamer kütüphanesinin uygunluğunu ve istenmeyen DNA ampikon oluşumunu tespit edebilmek için ilk aşamada farklı primer bağlanma sıcaklıkları denenmiş olup, elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. PZR yönteminde aptamer kütüphanesi-primer bağlanma sıcaklık taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

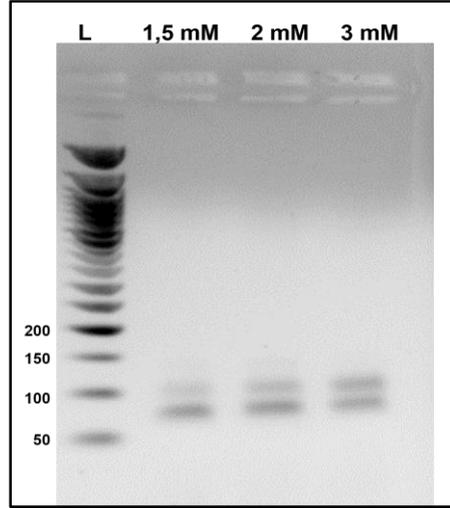
Primer bağlanma sıcaklık taraması sonuçları incelendiğinde istenmeyen DNA amplicon oluşumunun primer bağlanma sıcaklığı 56°C olduğunda daha az olduğu tespit edilmiş olup bu sıcaklık en uygun primer bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir.

Tasarlanan primerler ile aptamer kütüphanesinin çoğaltılması sırasında istenmeyen DNA amplicon oluşumunu engellemek ve ürün miktarını arttırmak amacı ile farklı primer miktarları denenmiş olup elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir. Farklı miktarlarda primer kullanım sonuçları doğrultusunda primer miktarı, 2 μ M primer olduğunda beklenen boyutta ürün elde edildiği ancak istenmeyen amplicon oluşumunun fazla miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle beklenen boyutta ürün elde edilen ancak istenmeyen DNA amplicon oluşumunun daha az olduğu primer miktarının 1 μ M olduğu belirlenmiş ve bu değer primer miktarı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



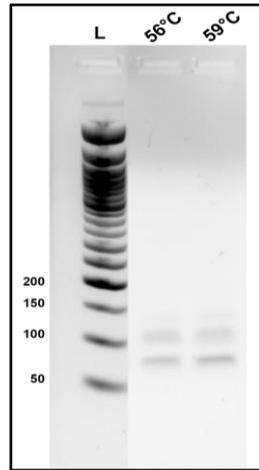
Şekil 4.10. PZR yönteminde primer miktarının taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

İstenmeyen DNA ampikon oluşumunu engellemek amacı ile farklı magnezyum miktarları denenmiş olup elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.11’de verilmiştir. Farklı miktarlarda magnezyum kullanım sonuçları doğrultusunda, magnezyum miktarı 1,5 mM olduğunda istemeyen ampikon oluşumun daha az miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bu oran PZR için gerekli optimal magnezyum miktarı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. PZR yönteminde Mg^{2+} miktarının taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

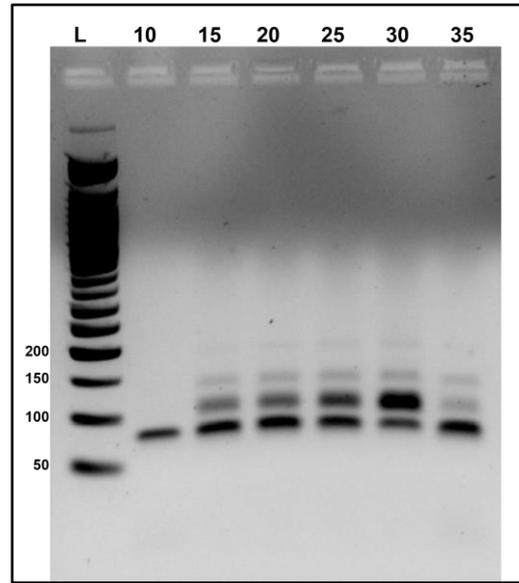
İstenmeyen DNA ampikon oluşumunu engellemek amacı ile farklı DNA polimeraz enziminin farklı primer bağlanma sıcaklıklarında kullanımı denenmiş olup elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. PZR yönteminde farklı DNA polimeraz kullanımı sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

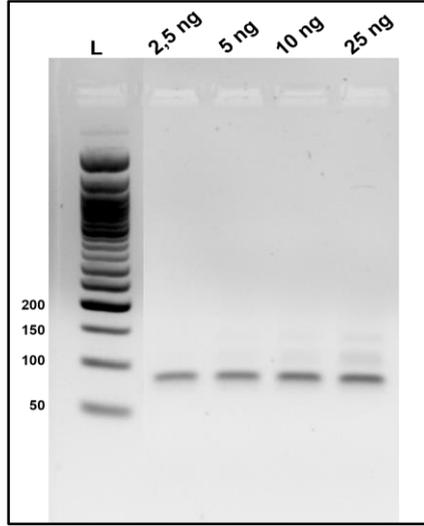
Farklı DNA polimeraz enziminin farklı primer bağlanma sıcaklıklarında kullanımı sonucunda istenmeyen DNA amplikonu oluşumunun devam ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle PZR döngü sayısının istenmeyen amplikon oluşumları üzerine etkisi incelenmiş olup elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.13'te verilmiştir.

PZR döngü sayısı taraması sonuçları incelendiğinde istenmeyen DNA amplikon oluşumunun döngü sayısı arttıkça arttığı ve sadece 10 döngü olduğunda oluşmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle en uygun PZR döngü sayısının 10 olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.13. PZR yönteminde döngü sayısı taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Kullanılan kalıp aptamer kütüphane miktarının istenmeyen DNA amplikon oluşumu ve ürün miktarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için farklı miktarlarda DNA aptamer kütüphanesi denenmiş olup elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir.

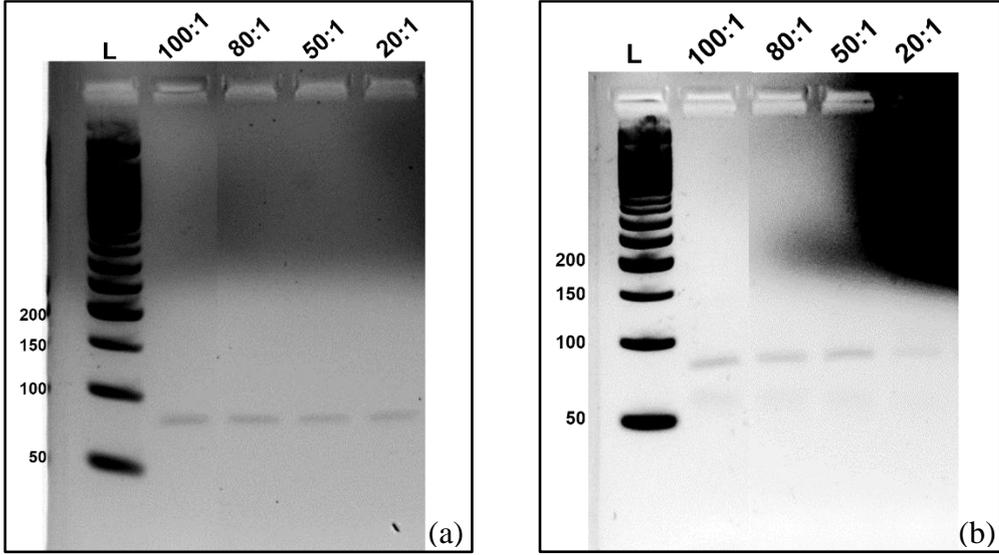


Şekil 4.14. PZR yönteminde aptamer kütüphane miktarı taraması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Aptamer kütüphanesi miktar taraması sonuçları incelendiğinde istenmeyen DNA amplicon oluşumunun kalıp DNA miktarı arttıkça arttığı tespit edilmiş olup en uygun kalıp DNA miktarı olarak 2,5 ng seçilmiştir.

Simetrik PZR koşullarının optimizasyonu sonrasında, tek zincirli olarak aptamer kütüphanesinin elde edilmesi için asimetric PZR koşulları optimize edilmiş olup, bunlar ileri ve geri primer miktarları ile PZR döngü sayısıdır (Şekil 4.15).

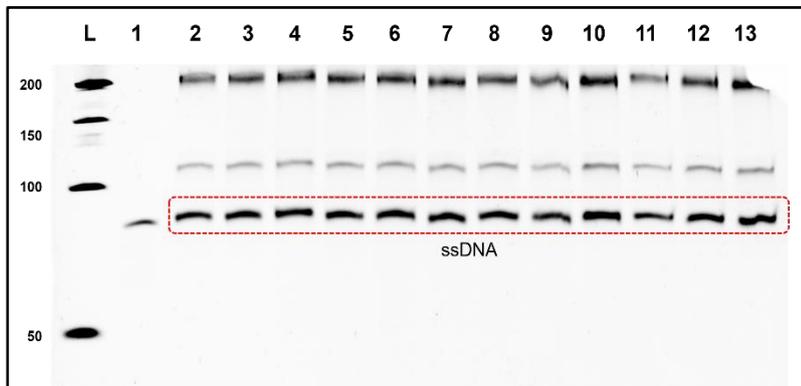
Agaroz jel elektroforezi görüntüleri sonucunda aPZR sonucunda elde edilen ssDNA ve dsDNA'nın agaroz jelde yeteri kadar ayrılmadığı tespit edilmiş olup bu amaçla üre-PAGE yöntemi denenmiştir.



Şekil 4.15. aPZR yönteminde a) 10 döngü, b) 40 döngü sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.3.3. Üre-PAGE

aPZR sonucunda elde edilen DNA örnekleri 8 M üre içeren %10'luk poliakrilamid jel elektroforezi ile 2 saat 30 dk boyunca 200V'da yürütülmüş ve jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri alınmıştır. ssDNA'nın SELEX döngüleri için hazır hale getirmek amacıyla ssDNA ve dsDNA bantlarının ayrımının sağlanması için GC-kuyruklu ileri primer ve geri primer kullanılarak yapılan aPZR sonucunda elde edilen görüntü Şekil 4.16'da verilmiştir.

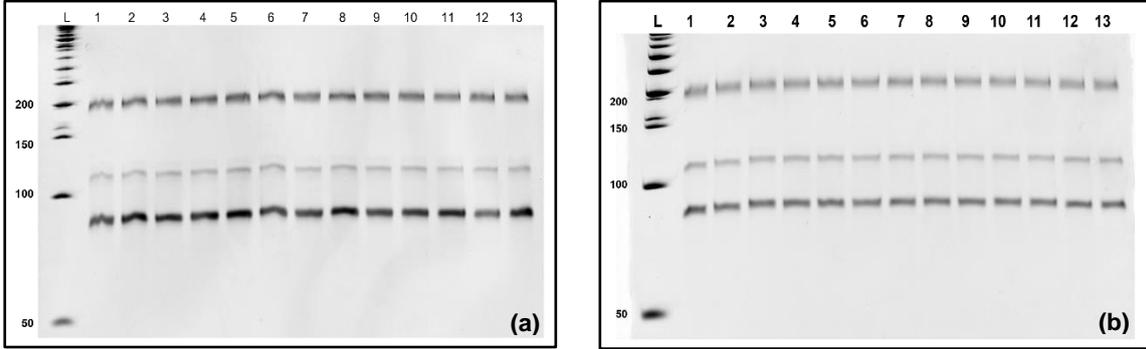


Şekil 4.16. aPZR ürünlerinin üre-PAGE görüntüsü (1, aptamer kütüphanesi, 2-13 aPZR örnekleri).

Üre-PAGE sonucunda ssDNA ve dsDNA'nın birbirinden boyut farkına bağlı olarak ayrıldığı belirlenmiş olup SELEX döngüleri arasında ssDNA'ların ayrılması için üre-PAGE yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4. SELEX Deneyleri

A1.0 ve B1.0 kısımları için gerçekleştirilen SELEX deneyleri birbirini takip eden bağlanma, yıkama ve elüsyon basamaklarından oluşmaktadır. Bağlanan aptamerlerin elüsyonu sonucunda elde edilen aptamer havuzu bir sonraki SELEX döngüsü için havuz olarak kullanılmak üzere hazır hale getirmek için kalıp DNA olarak öncelikle simetrik PZR ile çoğaltılmıştır. Her SELEX döngüsü için gerekli olan ssDNA havuzu elde edebilmek için paralel olarak aPZR reaksiyonları çoklu olarak yapılmış ve aPZR ürünleri ssDNA olarak saflaştırmak için farklı sayılarda üre-PAGE jeline yüklenmiş olup izolasyonun yapıldığı jellere ait örnek görüntüler Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. a) A1.0 protein bölgesi ile etkileşen b) B1.0 protein bölgesi ile etkileşen ssDNA'ların aPZR ile çoğaltılması sonucu ürünlerinin üre-PAGE görüntüsü.

ssDNA bantları jelden kesilerek tek bir tüpte birleştirilmiştir. Uygun miktarlarda tampon çözeltileri eklenmiş ve ekstraksiyon işlemi sonrası etanol çöktürme sonucunda elde edilen ssDNA'nın miktar ve saflık analizi için nano-spektrofotometre kullanılmış olup, saflık ve derişim tayini A260/A230 ve A260/A280 değerlerine göre yapılmıştır.

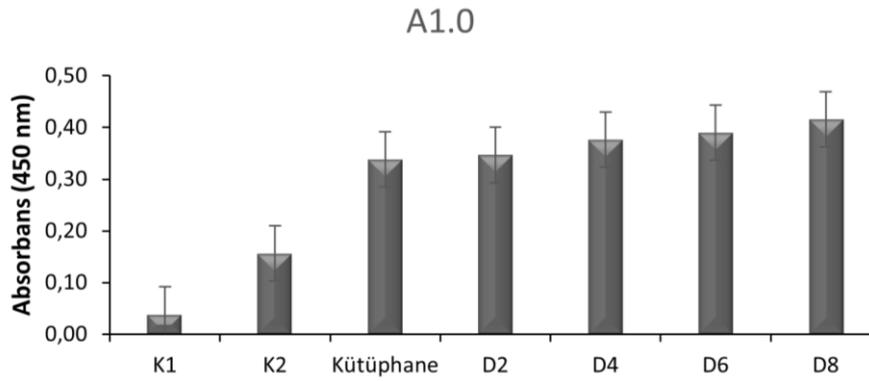
SELEX döngüsü sırasında ise aptamer seçiliminin özgünlüğünü arttırmak için protein miktarı, kullanılan ssDNA havuz miktarı ile yıkama koşullarında değişiklik yapılmıştır. Sekiz SELEX döngüsü boyunca kullanılan koşullar Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. SELEX döngüleri sırasında kullanılan koşullar.

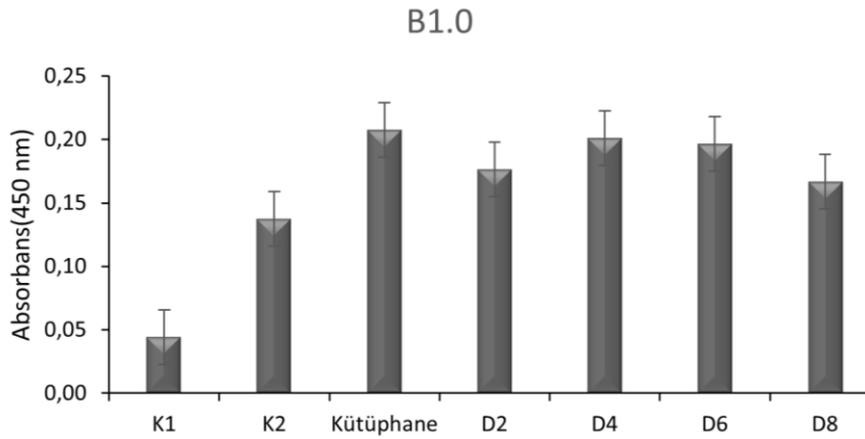
Döngü Sayısı	Protein miktarı	ssDNA miktarı	Etkileşim süresi	Yıkama Hacmi	Yıkama Sayısı	Elüsyon Sayısı
1	100 µg	25 µg	75 dk	200 µl	3	4
2	100 µg	1 µg	75 dk	200 µl	3	4
3	-	1 µg	75 dk	200 µl	3	4
4	50 µg	0,75 µg	60 dk	400 µl	4	4
5	50 µg	0,75 µg	50 dk	400 µl	5	4
6	50 µg	0,60 µg	40 dk	400 µl	6	5
7	50 µg	0,60 µg	30 dk	500 µl	6	6
8	50 µg	0,60 µg	30 dk	500 µl	7	7

4.4.1. ELONA Testi

A1.0 ve B1.0 protein bölgelerine özgü olarak aptamer seçilimi sırasında SELEX döngüleri arasında gerçekleşen ssDNA aptamer havuzunun zenginleşme durumunun tespit edilmesi amacı ile yapılan ELONA testi sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.18. SELEX döngüleri arasında A1.0 protein bölgesine ait ELONA test sonucu.



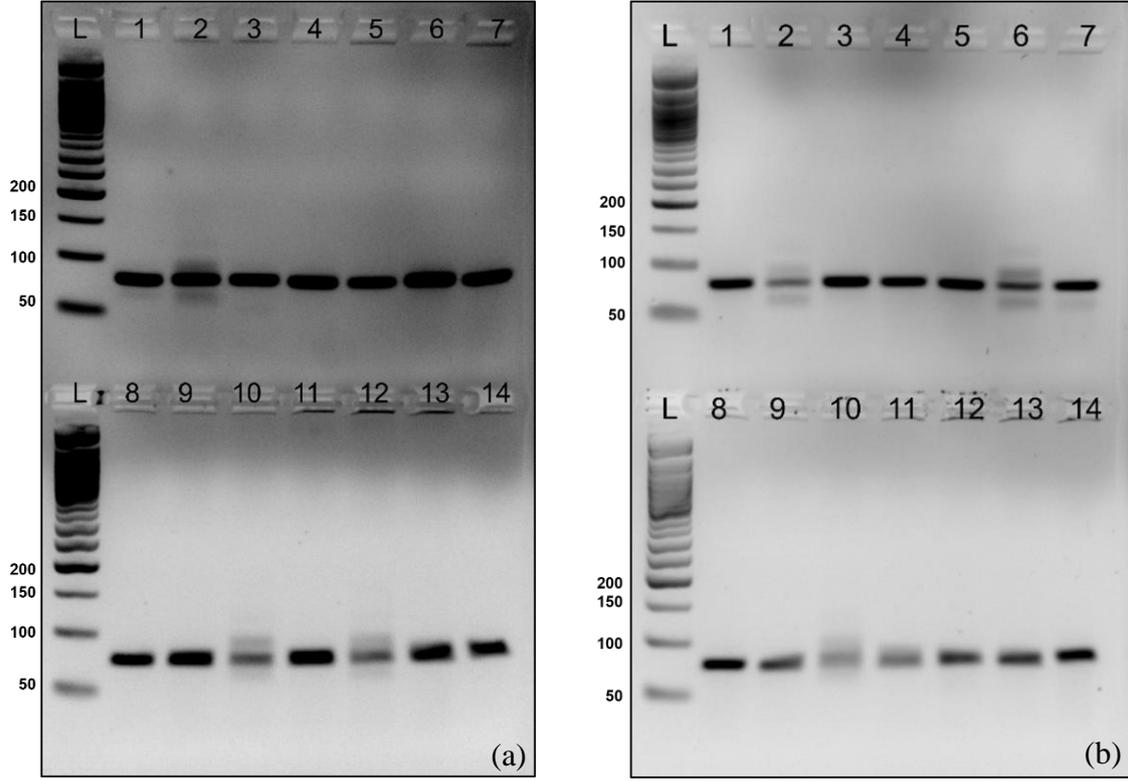
Şekil 4.19. SELEX döngüleri arasında B1.0 protein bölgesine ait ELONA test sonucu.

A1.0 bölgesine ait ELONA testi sonucunda, aptamer kütüphanesi ile 8. SELEX döngüsü (D8) sonrasında elde edilen absorbanslar açısından artış gözlemlenmiştir. Söz konusu durum aptamer havuzunun zenginleştiğini göstermektedir. B1.0 bölgesine ait ELONA testi sonucu A1.0 bölgesi ELONA sonucu ile karşılaştırıldığında absorbansın daha düşük olduğu ve aptamer kütüphanesi ile 8. SELEX döngüsü (D8) sonrasında elde edilen absorbanslar açısından tam olarak doygunluğa ulaşmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırıldığında, Shahdordizadeh ve arkadaşları, yaptığı çalışmada 3. ve 16. SELEX döngüleri arasında elde etmiş oldukları absorbans değerleri döngüler arasında değişiklik gösterdiğini gözlemlemişlerdir [98].

4.5. Aptamer Havuzlarının Klonlanması, Dizi Analizi ve Karakterizasyonunun Yapılması

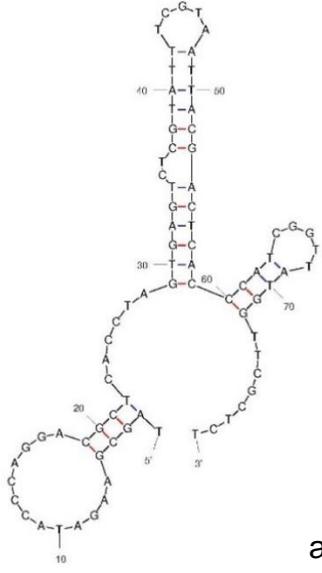
4.5.1. Transformantların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi

Transformasyon sonucunda ilk koloni seçimi makroskobik olarak koloni rengine bağlı olarak yapılmış olup, mavi-beyaz koloni oluşumuna dayalı bu sistemde ticari olarak temin edilen plazmid vektör içerisinde yer alan lacZ gen bölgesinin aktivitesine bağlı olarak koloni renk değişikliği ile sonuçlanmaktadır. İstenilen aptamer bölgelerini bulunduran plazmid vektörün lacZ gen bölgesi aktif olmadığından bu gen bölgesini aktiveleme görevi olan IPTG varlığında β -galaktosidaz enzimi salgılanamadığı için kromojenik bir substrat olan X-gal parçalanamamakta ve süreç mavi renkli koloni oluşumu ile sonlanmaktadır. Bu nedenle beyaz renkli olan koloniler seçilmiş ve klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için aynı koloniler için işaretli primerler kullanılarak koloni PZR yönteminden yararlanılmış ve elde edilen PZR örnekleri agaroz jel elektroforezi (Şekil 4.20) kullanılarak analiz edilmiştir.

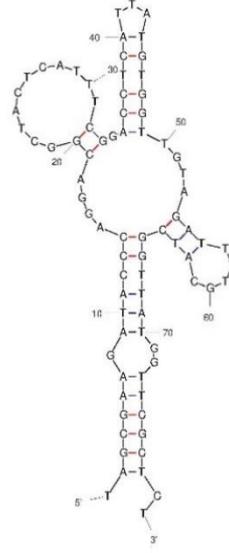


Şekil 4.20. Koloni PZR sonrası örneklerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü a) 1-14. kuyular, A1.0 protein bölgesi; b) 1-14. kuyular, B1.0 protein bölgesi ile etkileşen aptamer havuzunun transformasyonu sonrası seçilen kolonilere ait örnekler.

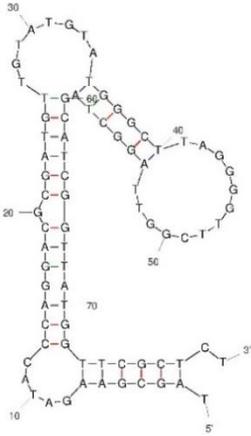
Aptamer dizisi ile aynı boyutta DNA bantına sahip olduğu agaroz jel elektroforezi görüntüsü ile belirlenen koloniler her bir bölge için farklı sayıda olacak şekilde DNA dizi analizi yaptırılmak üzere uygun besi ortamında çoğaltılarak saflaştırılmıştır. Sonuçlar ClustalX2.1 programı ile karşılaştırılmıştır. Aday aptamerlerin ikincil yapılarının belirlenmesi için ise Mfold programından yararlanılmıştır. Aptamer dizilimlerinin karşılaştırılmasına ait görüntüler Ek-5'te, ikincil yapılarının tahminine ait görüntüler ise Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de verilmiştir.



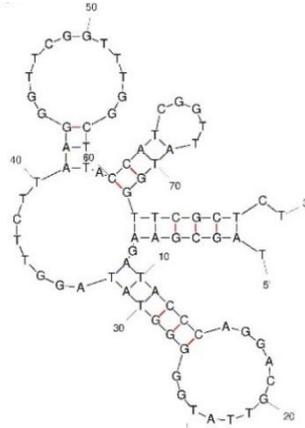
a



b

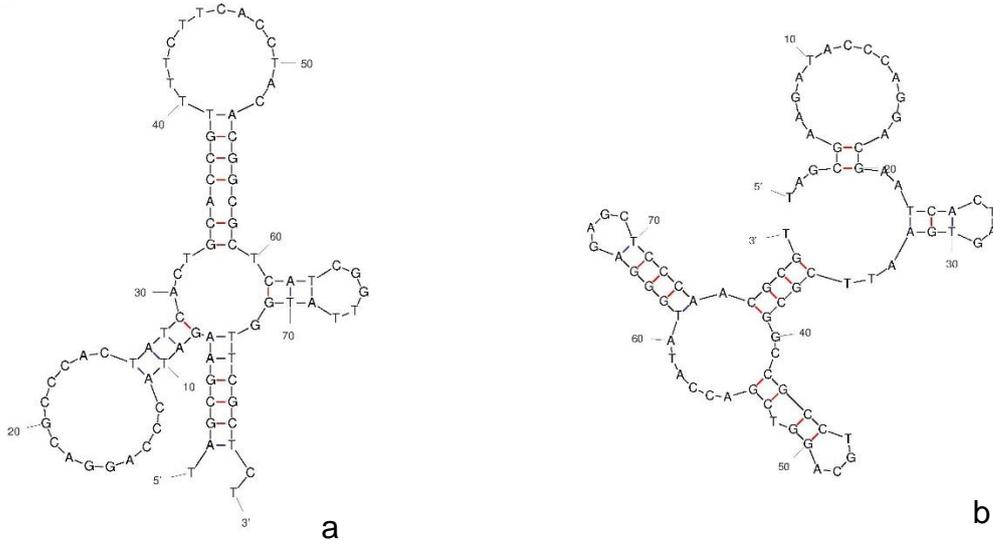


c



d

Şekil 4.21. A1.0 protein bölgesi ile etkileşen aday aptamerlerin a) AC3, b) AC5, c) AC30, d) AC31 ikincil yapı tahminleri.



Şekil 4.22. B1.0 protein bölgesi ile etkileşen aday aptamerlerin a) BC2, b) BC5 ikincil yapı tahminleri.

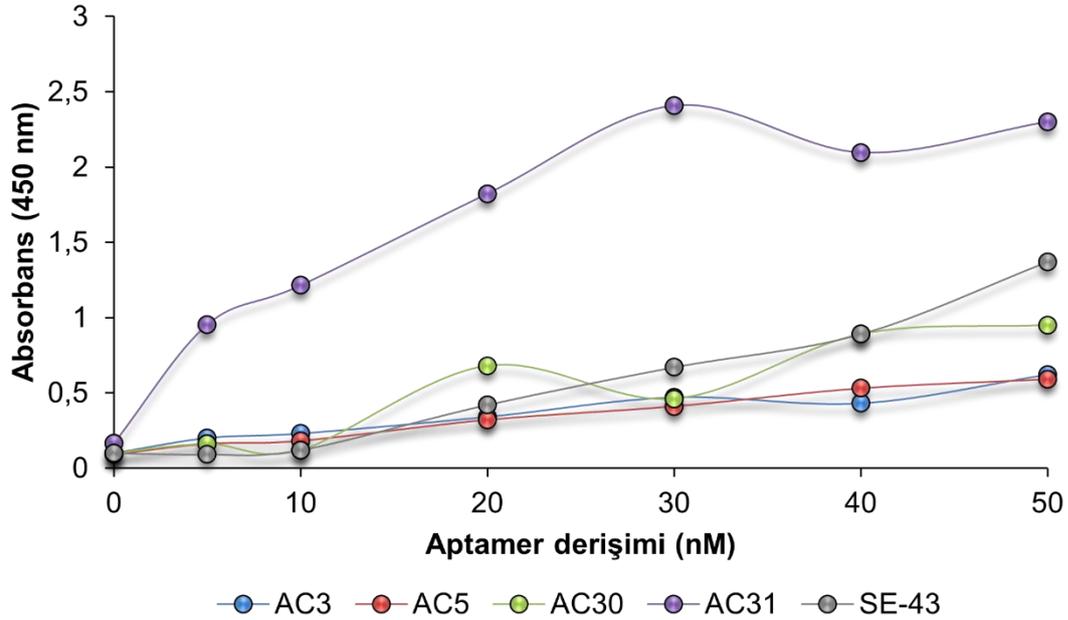
Dizi analizi sonucunda belirlenen aday aptamerlerin birden fazla ikincil yapısı oluşturdukları durumda ikincil yapılarının seçilmesi sırasında düşük ΔG , yüksek T_m derecesine değeri sahip olan formları daha kararlı olduğu için bu formları tercih edilmiştir.

4.5.2. Aday Aptamerlerin Ayrılma Sabitlerinin Hesaplanması

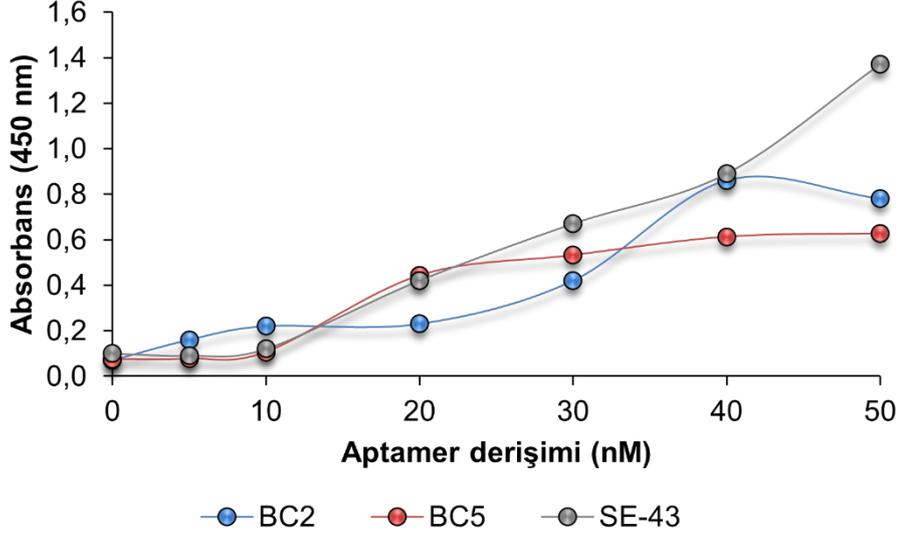
Elde edilen aday aptamerlerin hem A1.0 (AC3, AC5, AC30, AC31) hem de B1.0 (BC2, BC5) protein bölgelerine bağlanma durumları ELONA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24). Ayrılma sabitlerinin hesaplanmasında kullanılan grafiğe örnek olarak AC31 verilmiş olup (Şekil 4.25) tüm aday aptamerlerin bağlanma sabitlerine ait bilgiler Çizelge 4.2’de verilmiştir. Ayrılma sabiti (K_d), aptamer ile hedef proteini bölgesi arasındaki bağlanma afinitesinin etki derecesini belirlemek için kullanılmaktadır. Aptamerler hedeflerine mikromolar seviyesinde nanomolar hatta pikomolar seviyesine kadar bağlanabilen yapılardır. K_d değeri aptamerin hedefine bağlanma afinitesi ile ters orantılıdır. Bu nedenle en yüksek bağlanma afinitesinin AC31 aptamerine (10,2 nM), en düşük ise BC5 aptamerine (113,6 nM) ait olduğu söylenebilir. Qi ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada seçmiş oldukları aptamerin trans-zeatine ve trans-zeatin riboside yapısına daha

yüksek bağlanma (K_d : 3-5 μM) etkisine sahip olduğunu, cis-zeatin ve dihidrozeatin yapılarına ise düşük bağlanma (K_d : 27-30 μM) etkisine sahip olduğunu belirtmişlerdir [99]. Luteoline karşı aptamer seçimi yapılan bir çalışmada üç farklı aptamer adayı belirlenmiş ve sırasıyla ayrılma sabitleri 107 (LUT#28), 214 (LUT#20) ve 109 (LUT#3) nM olarak bulunmuştur [100]. Bu doğrultuda, çalışmada elde edilen afinitelerin de literatüre kıyasla yüksek olduğu söylenebilir.

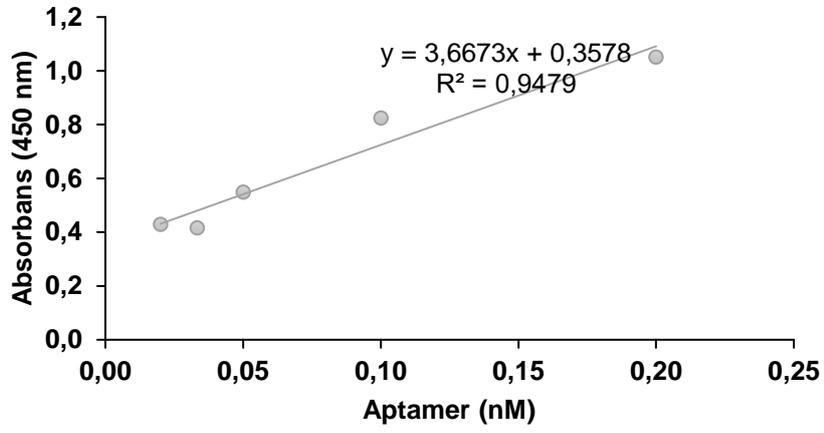
Ayrıca literatürde *S. epidermidis* bakterisine bağlandığı tespit edilmiş olan aptamer (SE-43) [72] ile birlikte aptamerlerin bağlanma özgünlüğünü kontrol etmek için de negatif-hedef olarak BSA proteini kullanılmıştır (Şekil 4.26 ve 4.27).



Şekil 4.23. A1.0 protein bölgesine aday aptamerin bağlanma durumları.



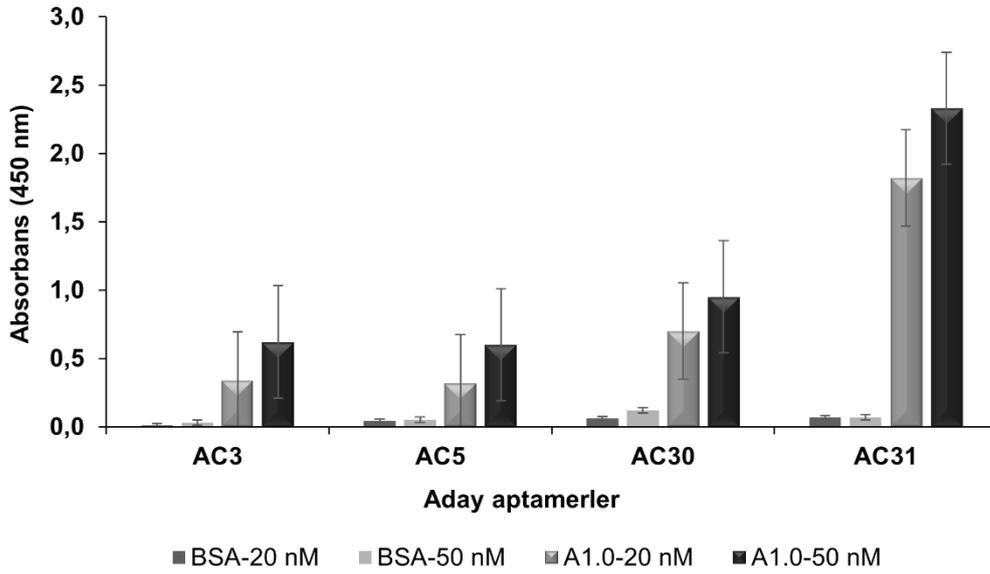
Şekil 4.24. B1.0 protein bölgesine aday aptamerlerin bağlanma durumları.



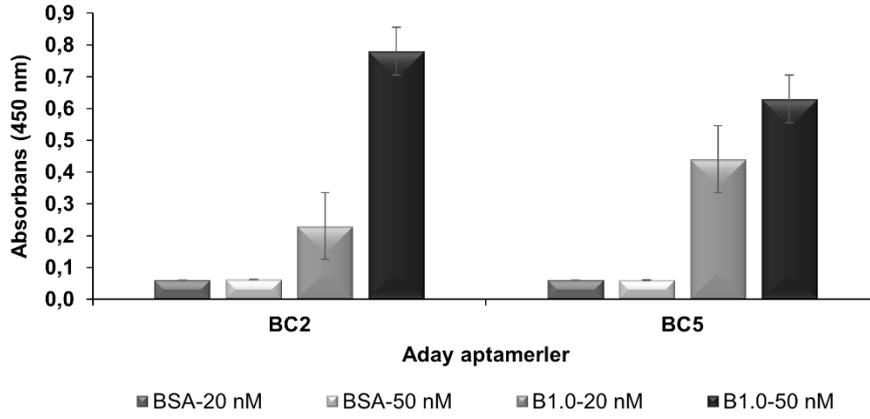
Şekil 4.25. AC31 aptamerinin farklı derişimlerde A1.0 protein bölgesine bağlanma durumu (ayrılma sabitinin hesaplanması).

Çizelge 4.2. Aday aptamerlerin ayrılma sabitleri

Aptamer	Hedef protein domanini	K_d (nM)
AC3	A1.0	31,3
AC5	A1.0	72,1
AC30	A1.0	32,8
AC31	A1.0	10,2
BC2	B1.0	33,4
BC5	B1.0	133,6



Şekil 4.26. Seçilen aday aptamerlerin A1.0 protein bölgesine ve BSA proteinine bağlanma durumları.

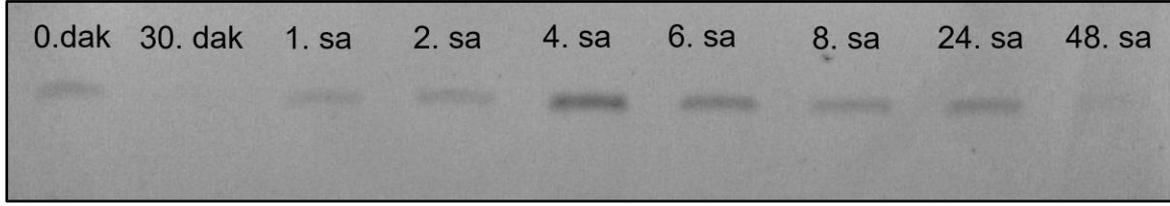


Şekil 4.27. Seçilen aday aptamerlerin B1.0 protein bölgesine ve BSA proteinine bağlanma durumları.

Sonuçlar incelendiğinde, seçilen bütün aday aptamerlerin etkisiz hedef olarak kullanılan BSA proteinine bağlanma oranlarının ihmal edilebilecek düzeyde çok az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca literatürde *S. epidermidis*'e karşı seçilmiş olan SE-43 aptameri ile karşılaştırma yapıldığında da özellikle AC31 aday aptamerinin bağlanma oranının iki kat fazla olduğu belirlenmiştir.

Ayrılma sabiti en iyi sonucu veren aday aptamer (AC31) ile serum ortamında yapılan aptamer stabilite testi sonucu alınan üre-PAGE görüntüsü Şekil 4.39'da verilmiştir. İmplantasyon süreci sonrasındaki ilk 6 saatlik dönemde bakteriyel yapışmayı azaltmak, implantla ilişkili enfeksiyonu önlemek için özellikle önemli olduğu [101] ve aptamerin daha sonraki *in vivo* çalışmalarda kullanılma potansiyeli olduğundan, serum ortamındaki stabilite durumu belirlenmiştir. Bu nedenle biyofilm oluşumunu önlemede kullanılmaya aday olan aptamerin serum ortamı içerisinde en az 6 saat boyunca nükleazlara karşı dayanıklı olması ve yapısını koruması beklenmektedir. Alshaer ve arkadaşları, hücre epitelyal yapışma molekülüne (EpCAM) karşı seçmiş oldukları aptamerin yarılanma ömrünü 5,9 saat olarak bulurken [102], *in vivo* kullanımı öngörülen aptamer-ribozomal toksin konjugatı oluşturulan başka bir çalışmada ise aptamerin yarılanma ömrü 4 saat olarak bulunmuştur [103]. Ayrılma sabiti en iyi sonucu veren aday aptamer (AC31) ile serum ortamında yapılan aptamer stabilite testi sonucu aptamerin en az 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

Bu nedenle nükleazlara karşı dayanıklılık etkisinin tahammül edilebilir düzeyde olduğu ve söz konusu aptamerin terapötik ajan olarak kullanılmaya aday olduğu söylenebilir.

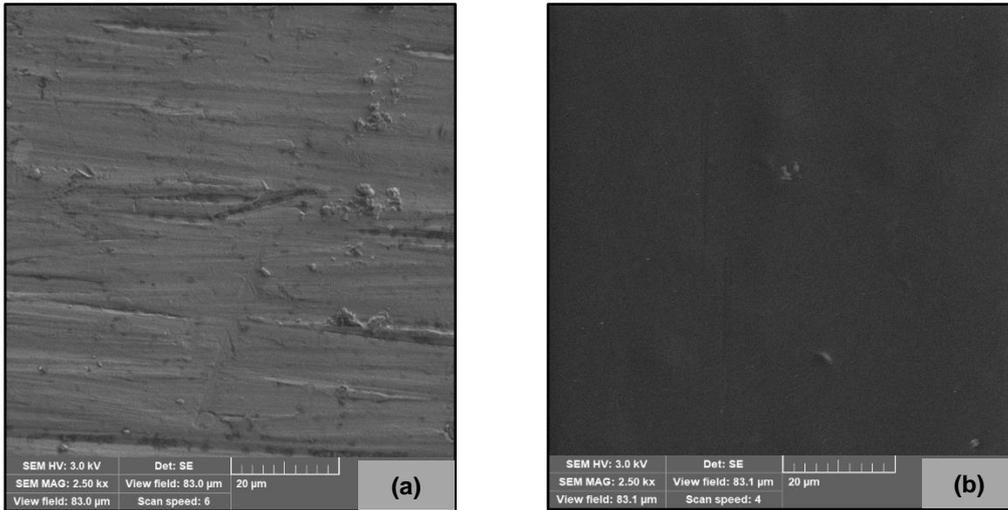


Şekil 4.28. AC31 aday aptamerinin serum ortamında stabilite testi sonrası üre-PAGE görüntüsü.

4.6. Kitosan Kaplı Titanyum İmplantların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.6.1. SEM Analizi

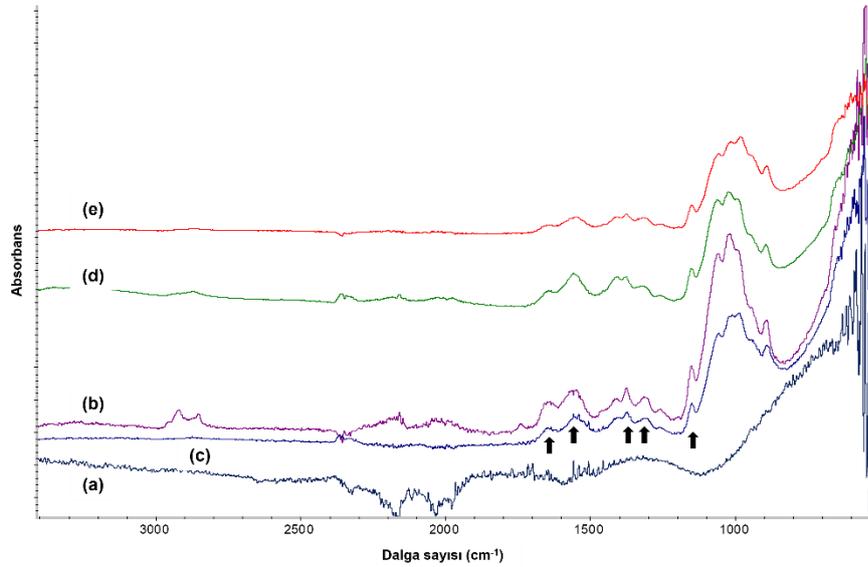
Kitosan ile kaplama yapıma işlemi sonrasında titanyum yüzeylerin SEM analizi sonucu yüzeylerin homojen ve düzenli bir yapı sergilediği gözlenmektedir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. a) Kaplama yapılmamış titanyum yüzey, b) kitosan ile kaplama yapılmış yüzey.

4.6.2. ATR- FTIR Spektroskopisi

Şekil 4.30 kaplama yapılmamış titanyum yüzey ile farklı molekül ağırlığında ve derişimlerde kitosan ile kaplama yapılma sonucunda kimyasal yapılarda meydana gelen değişimi göstermektedir.

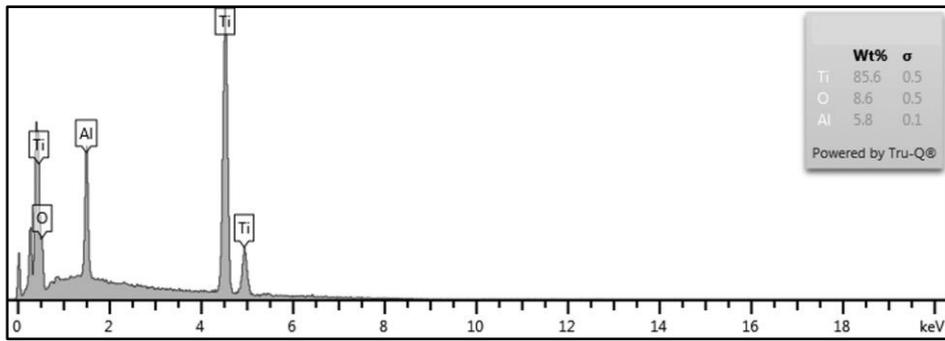


Şekil 4.30. (a) kaplama yapılmamış titanyum yüzey (b) 1DMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (c) 2DMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (d) 1OMAK ile kaplanmış titanyum yüzey, (e) 2OMAK ile kaplanmış titanyum yüzey için FTIR spektrumları.

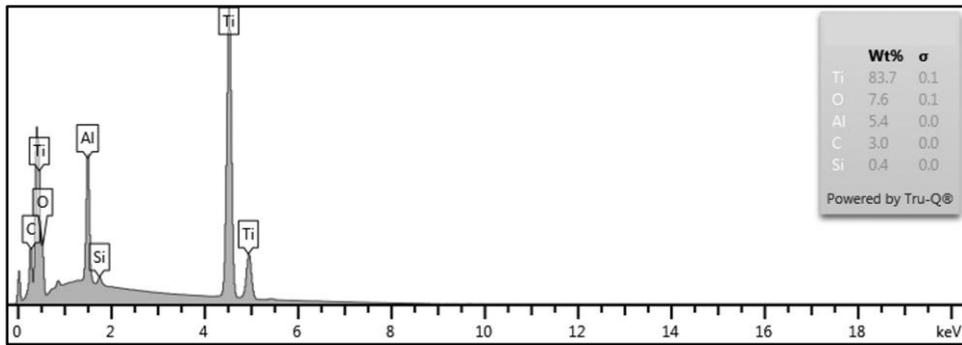
Kitosan için karakteristik bağlar olan amid I (C=O germe) ve amid III (C-N germe) için sırasıyla 1640 cm^{-1} ve 1320 cm^{-1} absorpsiyon bantlarını temsil etmekle birlikte, $1550\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen absorpsiyon bantının gluteraldehit ile kitosanın amino grupları arasında imin reaksiyonuna bağlı olarak gerçekleşen C=N bağını ifade etmektedir [104]. 1150 cm^{-1} piki kitosanın yapısında bulunan glukozamin birimleri arasındaki C-O-C asimetrik gerilmesini, 1380 cm^{-1} piki CH_3 gruplarının CH bağını göstermektedir [105].

4.6.3. EDX Analizi

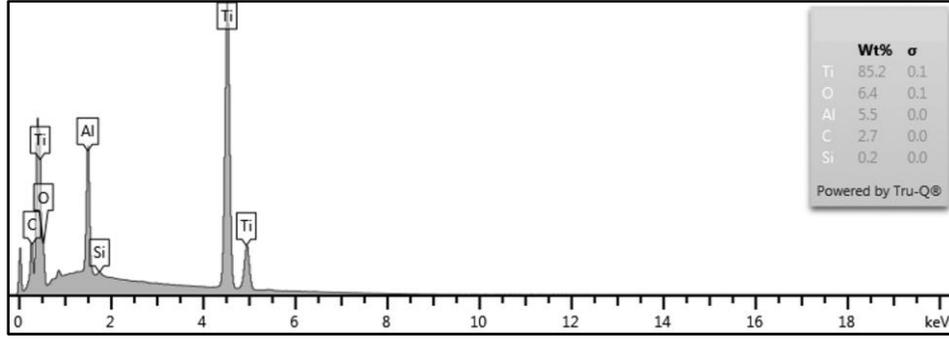
Kitosan ile kaplanan ve kaplanmayan yüzeylerde meydana gelen elementsel değişimleri belirlemek amacıyla yapılan EDX analizi sonrasında elde edilen grafikler Şekil 4.31-4.34'te verilmiştir. Kaplanmayan titanyum yüzeyinde sadece titanyum, oksijen ve malzeme içerisinde yer alan alüminyum bulunurken (Şekil 4.31) silan gruplarının eklenmesi için kullanılan IPTES ile muamele sonucunda silan grupların eklenmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.32). Kitosan ile kaplama sonrasında ise karbon miktarındaki artış kaplamanın gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir (Şekil 4.33-4.34).



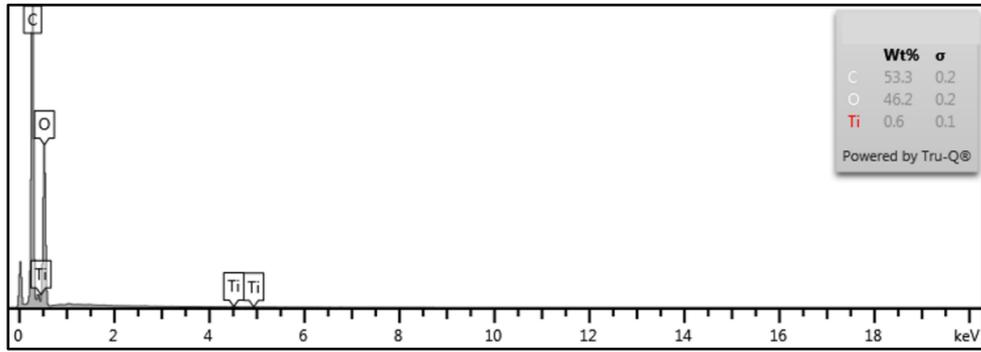
Şekil 4.31. Kaplanmamış titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.



Şekil 4.32. IPTES ile muamele edilmiş titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.



Şekil 4.33. GA ile muamele edilmiş titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.



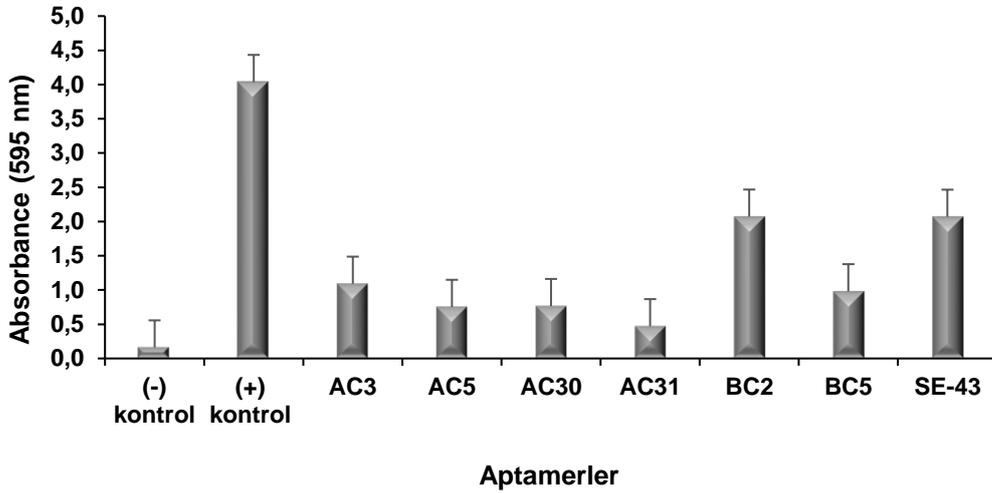
Şekil 4.34. Kitosan ile kaplama yapılmış olan titanyum yüzeye ait EDX spektrumu.

4.7. Aptamerlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

4.7.1. Biyofilm İnhibisyon Testi (Mikroplak Yöntemi)

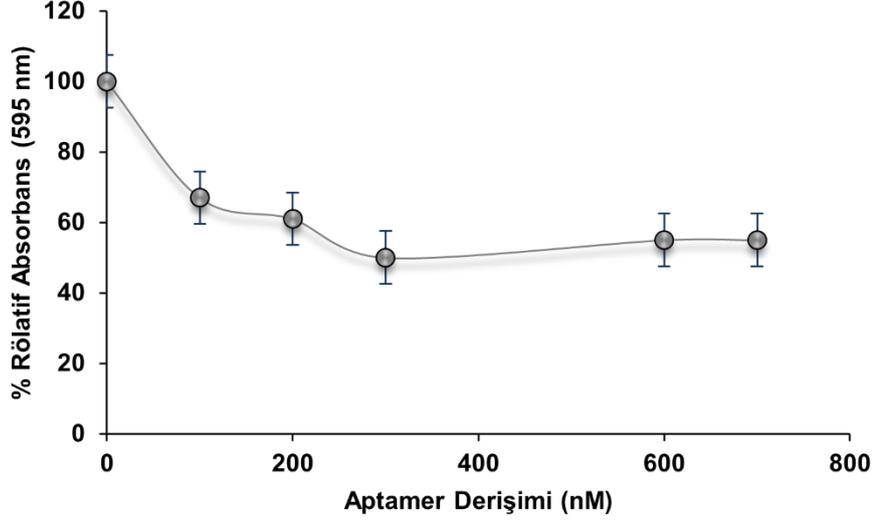
İlk aşamada SELEX döngüleri sonucunda elde edilen altı aday aptamerin kaplama yapılmayan titanyum yüzey üzerinde biyofilm oluşumuna ilişkin etkileri incelenmiş olup kaplama yapılmayan titanyum yüzey üzerinde en yüksek inhibisyon etkisine AC31 kodlu aptamerinin sahip olduğu ve en az 4-kat inhibisyon gerçekleştiği mikroplak testi sonucu ile belirlenmiştir (Şekil 4.35). Ning ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada *Staphylococcus aureus*'un penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) karşı aptamer seçilimi gerçekleştirmiş (Kd: 82,97 nM) olup biyofilm oluşumuna grafen-oksit üzerine konjuge aptamer-berberinin etkisini incelemişler ve sadece berberin ya da aptamer kullanıldığında görülen inhibisyon

etkisinden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir [106]. En iyi inhibisyon etkisinin AC31 aptamerine ait olması nedeniyle biyofilm oluşumu üzerine aptamerlerin etkisinin incelenmesi ile ilgili yapılan çalışmalara AC31 aptameri ile devam edilmiştir.



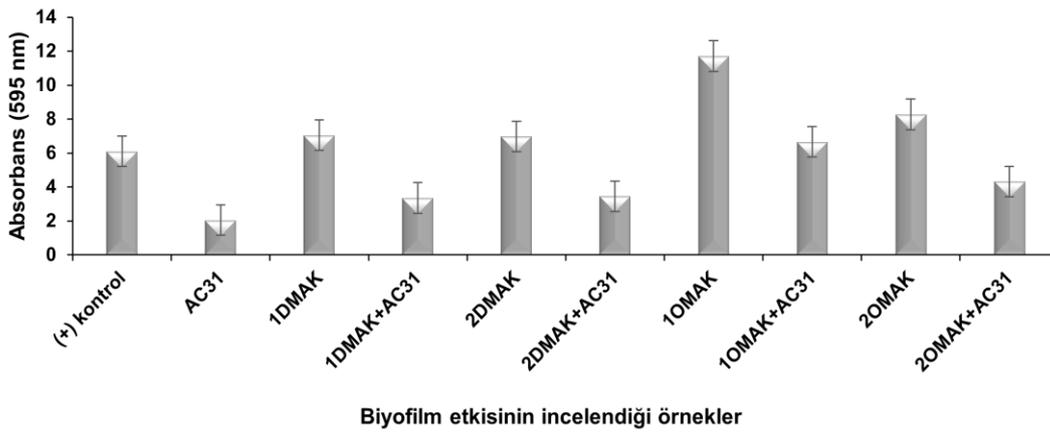
Şekil 4.35. Aday aptamerlerin kaplama yapılmayan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumu üzerine etkileri.

AC31 aptamerinin farklı derişimleri kullanılarak kaplama yapılmayan titanyum yüzey üzerindeki etkileri incelenmiş (Şekil 4.36) ve 300 nM olarak kullanıldığında en iyi absorbans azalma miktarını gösterdiği, 700 nM kullanıldığında elde edilen absorbans değerinin yüksek oranda değişim göstermemesi nedeniyle 300 nM’de doygunluğa ulaşıldığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.36. AC31 aday aptamerin farklı derişimlerinin kaplama yapılmayan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumuna etkisi.

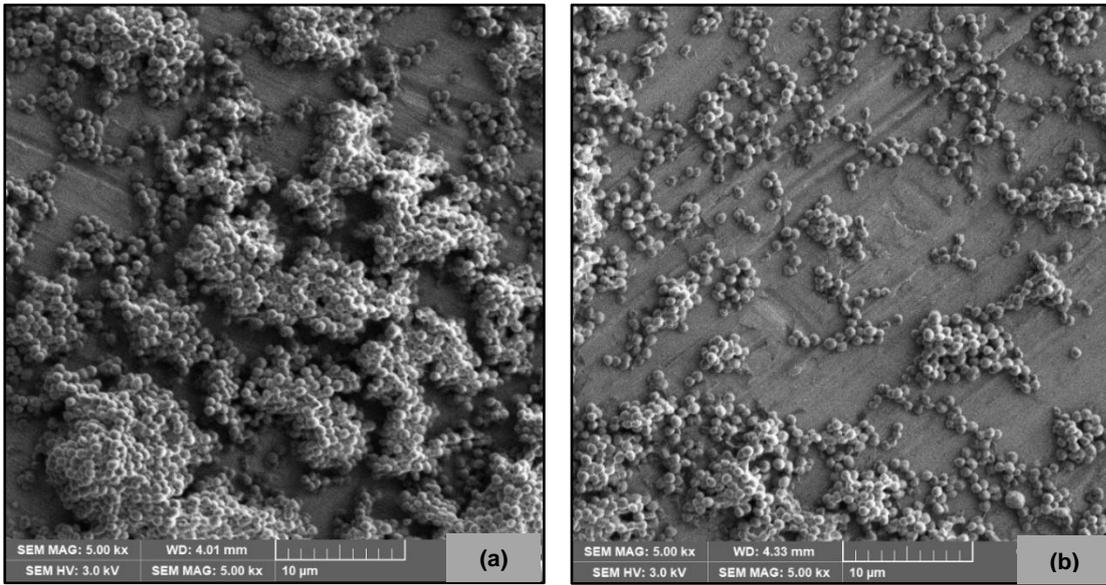
Farklı molekül ağırlıklarında ve derişimlerde kitosan ile kaplanan titanyum yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumu incelendiğinde (Şekil 4.37), AC31 aptamerin eklenmiş olduğu %2'lik (w/v) derişimde hazırlanan hem düşük molekül ağırlıklı hem de orta molekül ağırlıklı kitosan kaplı yüzeylerde en az 2-kat oranında biyofilm inhibisyon oranına sahip olduğu mikropalak testi sonucu ile belirlenmiştir.



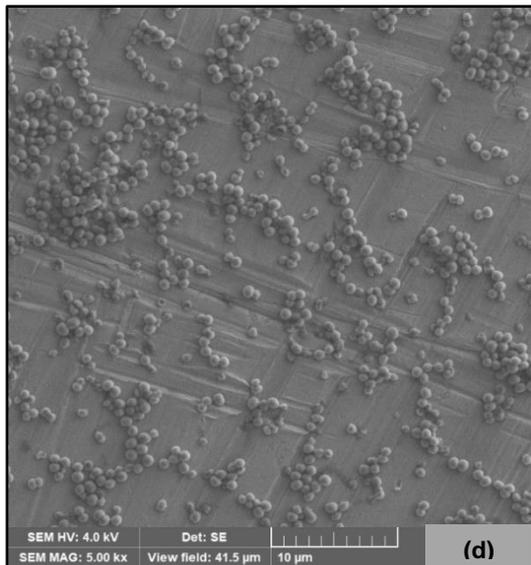
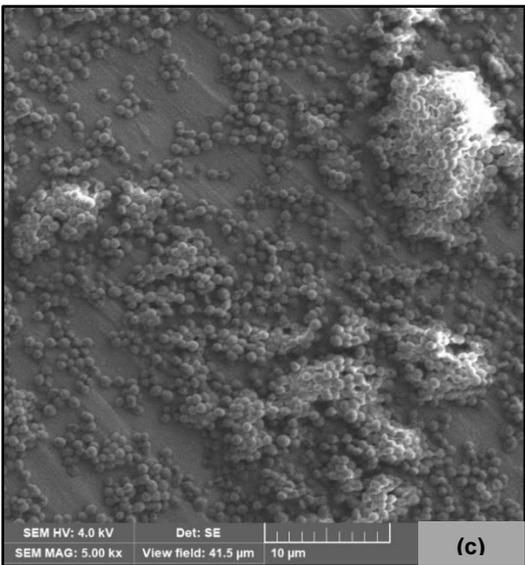
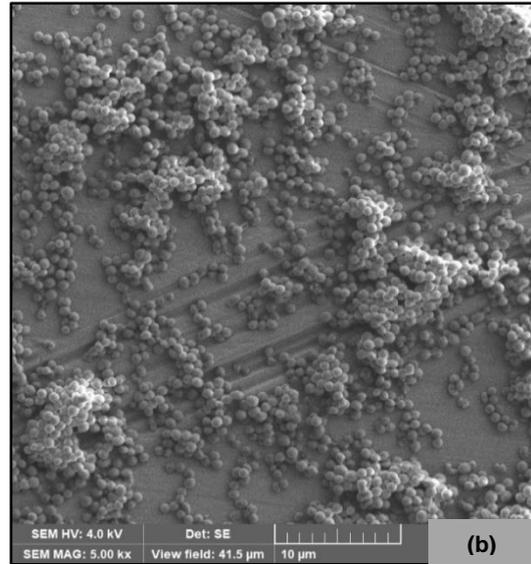
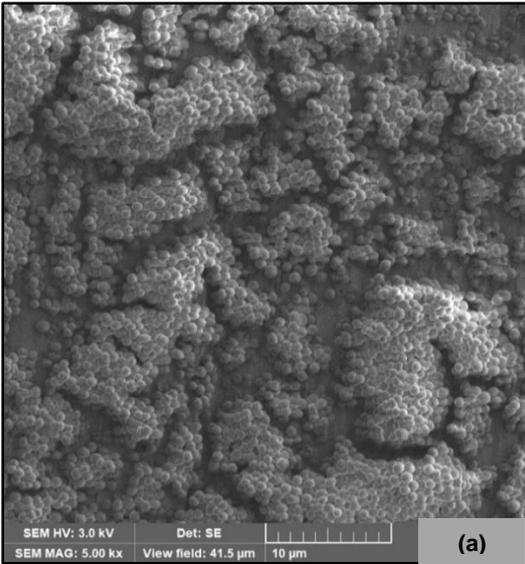
Şekil 4.37. AC31 aday aptameri eklenmeden ve eklenerek yapılan farklı derişimlerde kitosan ile kaplanan titanyum yüzeylerde biyofilm oluşumu.

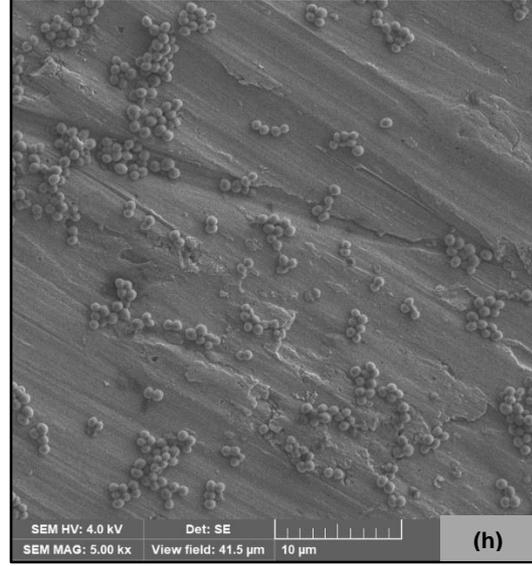
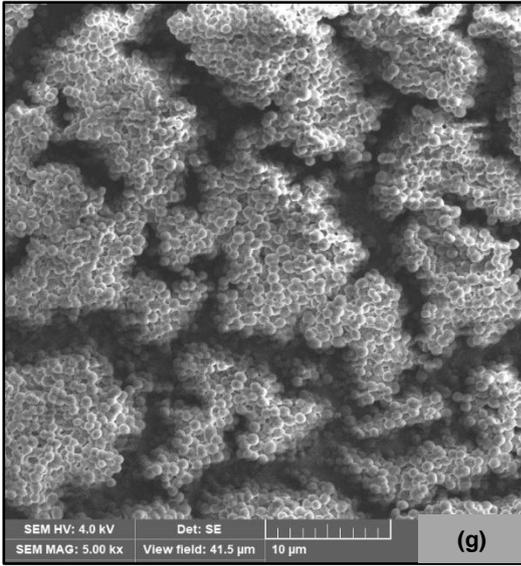
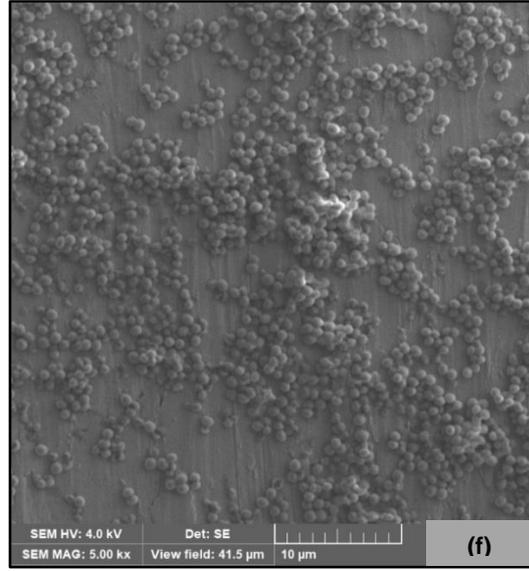
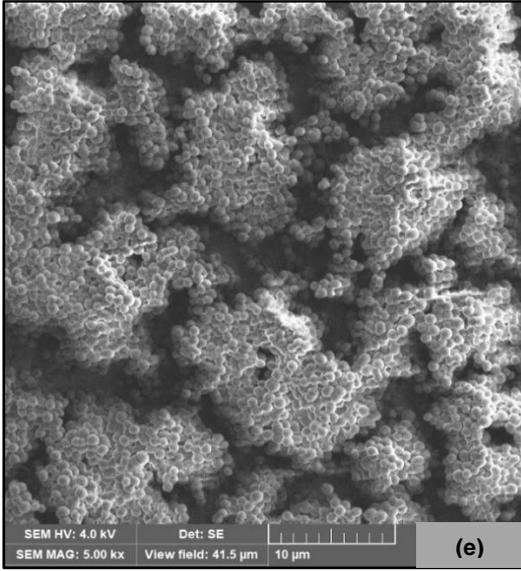
4.7.2. SEM Analizi

AC31 aptamerinin kitosan ile kaplama yapılmayan titanyum yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumu üzerine etkisi SEM analizi ile incelendiğinde (Şekil 4.38) aptamer varlığında hücrelerin yüzeye yapışmasının azaldığı ve mikropalak testi ile uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür. AC31 aptamerinin kitosan ile kaplama yapılan titanyum yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumu üzerine etkisi SEM analizi ile incelendiğinde (Şekil 4.39) aptamer varlığında hücrelerin yüzeye yapışmasının azaldığı özellikle %2'lik (w/v) derişimde hazırlanan hem düşük moleköl ağırlıklı hem de orta moleköl ağırlıklı yüzeylerde (Şekil 4.39-d ve h) daha az sayıda hücrenin yüzeye yapışma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların mikropalak yöntemi ile uyumlu sonuçlarda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.38. Biyofilm inhibisyon çalışmalarına ait SEM görüntüleri (a) kaplama yapılmamış titanyum, (b) yalnız AC31 aptameri eklenmiş titanyum.





Şekil 4.39. Biyofilm inhibisyon çalışmalarına ait SEM görüntüleri (a) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (b) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (c) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (d) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (e) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (f) 1DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum, (g) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış titanyum, (h) 2DMAK kitosan ile kaplama yapılmış ve AC31 aptameri eklenmiş olan titanyum.

Kitosan ile kaplama yapılan titanyum yüzeyleri üzerinde kaplama yapılmayan titanyum yüzeylere göre daha fazla hücre yapışması olduğu hem mikropalak yöntemi hem de SEM analiz sonuçlarında görülmüştür (Şekil 4.37-4.39). AC31 aptameri eklenerek yapılan kitosan kaplı titanyum yüzeyleri üzerindeki biyofilm inhibisyon çalışmalarında ise, molekül ağırlığı ve derişimi fark etmeksizin aptamerin eklendiği tüm gruplarda en az 2-kat oranında biyofilm inhibisyon etkisi olduğu hem kristal viyolenin kullanıldığı mikropalak yöntemi hem de SEM analiz sonuçları ile belirlenmiştir. Kitosanın antimikrobiyal özellik gösterme mekanizması tam olarak hala açıklanamamakla birlikte, bu özelliğe sahip olmasına neden olan birkaç mekanizma ve bu özelliğini etkileyen birtakım parametreler bulunduğu söylenebilir. Kitosanın antimikrobiyal özelliğini göstermesi üzerinde molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, pH, mikroorganizma türü, derişimi gibi birçok koşulun etkisi olduğu bilinmektedir. Gomes ve arkadaşları [107] yapmış olduğu çalışmada yüksek molekül ağırlığa sahip kitosanın antimikrobiyal özelliğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Kitosanın molekül ağırlığının antimikrobiyal özelliği üzerine etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada [108] molekül ağırlığı 9.3 kDa olan kitosan *E. coli*'nin çoğalmasını inhibe ederken, 2.2 kDa molekül ağırlığına sahip kitosanın bakteri çoğalmasını hızlandırdığını tespit etmişlerdir. Dolayısı ile kitosanın antimikrobiyal özelliği göstermesinde birçok parametrenin etkili olması nedeniyle tam olarak beklenen antimikrobiyal etki gözlenmemiş olsa da, seçilen aptamerler varlığında biyofilm oluşumunun azaldığının tespit edilmesi tezin ana amacının gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca *S. epidermidis*'in Aap dışında da yüzeylere yapışmasını sağlayan spesifik olan ve olmayan etkileşimlerin bulunduğu, literatürde yer alan çalışmalarca gösterilmiş [36, 37] olup bu mekanizmalardan biri ya da birkaçı sebebi ile kitosan ile kaplanmış olan yüzeylere daha fazla yapışma eğilimi göstermiş olabilirler.

5. YORUM

Tez kapsamında elde edilen sonuçlarla birlikte, bu sonuçlar doğrultusunda yapılması önerilen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

1. İmplant kaynaklı osteomyelit etkeni olan *S. epidermidis* bakterisinin biyofilm ilişkili proteini olan Aap'ye ait farklı bölgeler rekombinant olarak üretilmiş ve saflaştırılmıştır.
2. Aptamer seçim yöntemi olan SELEX'de kullanılmak üzere primer ve aptamer kütüphanesi tasarımı yapılmıştır.
3. Hem A1.0 bölgesi hem de B1.0 bölgesine karşı aptamer seçilimi için SELEX deneyleri eş zamanlı olarak yapılmış ve 8 SELEX döngüsü sonrasında elde edilen aptamer havuzunun klonlama işlemi sonrasında DNA dizi analizi yaptırılmıştır.
4. DNA dizi analizi sonucunda 6 aday aptamer belirlenip sentezletirilmiş ve ELONA yöntemiyle birlikte ayrılma sabitleri nonlinear regresyon analizi kullanılarak hesaplanmıştır.
5. Ticari olarak temin edilen titanyum yüzeylerde kitosan ile farklı molekül ağırlıklarında ve derişimlerde kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir.
6. Kitosan ile kaplama yapılmış olan titanyum yüzeylerin karakterizasyonu SEM, EDX ve ATR-FTIR analizleri ile yapılmıştır.
7. 6 aday aptamerin kaplama yapılmayan titanyum yüzey üzerinde biyofilm oluşumuna ilişkin etkileri incelenmiş ve en yüksek inhibisyon etkisine, AC31 aptamerinin (en az 4-kat oranında biyofilm inhibisyonu) sahip olduğu belirlenmiştir.
8. AC31 aptameri eklenerek ve eklenmeden yapılan kitosan kaplı titanyum yüzeyleri üzerindeki biyofilm oluşum çalışmalarında, molekül ağırlığı ve derişimi fark etmeksizin aptamerin eklendiği tüm gruplarda en az 2-kat oranında biyofilm inhibisyon etkisi olduğu, hem kristal viyolenin kullanıldığı mikropalak yöntemi hem de SEM analiz sonuçları ile belirlenmiştir.
9. Çalışma sonucunda *S. epidermidis* bakterisinin biyofilm ilişkili Aap ait iki farklı bölgesine karşı SELEX yöntemi ile aptamer seçilimi ilk kez bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir.

10. AC31 aptamerinin, titanyum yüzeylerde yapışma mekanizması üzerinde etkisini göstererek *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturmaya engel olabileceği belirlenmiş ve yapılacak *in vivo* çalışmaların ardından, terapötik ajan olarak kullanım potansiyeli gösterilmiştir.
11. Ayrıca, *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumuna yol açarak enfeksiyon oluşturduğu çeşitli implant yüzeylerinde AC31 aptameri kullanılarak yapılacak modifikasyon/immobilizasyon çalışmalarına öncü niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, *J R Soc Interface*, 5 (2008) 1137-1158.
- [2] A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, A. Abarrategi, Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3 (2017) 1245-1261.
- [3] M. Kulkarni, A. Mazare, P. Schmuki, A. Iglic, Biomaterial Surface Modification of Titanium and Titanium Alloys for Medical Applications, in: A.d.M. Alexander Seifalian, D.M. Kalaskar (Eds.) *Nanomedicine*, One Central Press 2014, pp. 111 - 136.
- [4] X. Lin, S. Yang, K. Lai, H. Yang, T.J. Webster, L. Yang, Orthopedic implant biomaterials with both osteogenic and anti-infection capacities and associated in vivo evaluation methods, *Nanomedicine*, 13 (2017) 123-142.
- [5] W.F. Oliveira, I.R.S. Arruda, G.M.M. Silva, G. Machado, L. Coelho, M.T.S. Correia, Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 81 (2017) 597-606.
- [6] D.W. Lee, Y.P. Yun, K. Park, S.E. Kim, Gentamicin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2)-delivering heparinized-titanium implant with enhanced antibacterial activity and osteointegration, *Bone*, 50 (2012) 974-982.
- [7] M.B. Thomas, N. Metoki, D. Mandler, N. Eliaz, In Situ Potentiostatic Deposition of Calcium Phosphate with Gentamicin-Loaded Chitosan Nanoparticles on Titanium Alloy Surfaces, *Electrochimica Acta*, 222 (2016) 355-360.
- [8] L. Zhao, H. Wang, K. Huo, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, Y. Zhang, Z. Wu, P.K. Chu, Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles, *Biomaterials*, 32 (2011) 5706-5716.
- [9] X. Li, X.Y. Ma, Y.F. Feng, Z.S. Ma, J. Wang, T.C. Ma, W. Qi, W. Lei, L. Wang, Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions, *Biomaterials*, 36 (2015) 44-54.
- [10] L. Zhao, Y. Hu, D. Xu, K. Cai, Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 119 (2014) 115-125.

- [11] F. Götz, Staphylococcus and biofilms, *Molecular Microbiology*, 43 (2002) 1367-1378.
- [12] M. Kazemzadeh-Narbat, B.F. Lai, C. Ding, J.N. Kizhakkedathu, R.E. Hancock, R. Wang, Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections, *Biomaterials*, 34 (2013) 5969-5977.
- [13] C.R. Schaeffer, K.M. Woods, G.M. Longo, M.R. Kiedrowski, A.E. Paharik, H. Büttner, M. Christner, R.J. Boissy, A.R. Horswill, H. Rohde, P.D. Fey, F.C. Fang, Accumulation-Associated Protein Enhances Staphylococcus epidermidis Biofilm Formation under Dynamic Conditions and Is Required for Infection in a Rat Catheter Model, *Infection and Immunity*, 83 (2015) 214-226.
- [14] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial Biofilms a Common Cause of Persistent Infections, *Science*, 284 (1999) 1318-1322.
- [15] T.C. Mah, G.A. O'Toole, Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents, *Trends in Microbiology*, 9 (2001) 34-39.
- [16] M.E. Olson, H. Ceri, D.W. Morck, A.G. Buret, R.R. Read, Biofilm Bacteria Formation and Comparative Susceptibility to Antibiotics, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66 (2001) 86-92.
- [17] M. Frieri, K. Kumar, A. Boutin, Antibiotic resistance, *J Infect Public Health*, 10 (2017) 369-378.
- [18] A. Jordan, N. Gathergood, Designing Safer and Greener Antibiotics, *Antibiotics (Basel)*, 2 (2013) 419-438.
- [19] A.-E. Radi, Electrochemical Aptamer-Based Biosensors: Recent Advances and Perspectives, *International Journal of Electrochemistry*, 2011 (2011) 1-17.
- [20] P. Rothlisberger, C. Gasse, M. Hollenstein, Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [21] N. Duan, X. Ding, S. Wu, Y. Xia, X. Ma, Z. Wang, J. Chen, In vitro selection of a DNA aptamer targeted against Shigella dysenteriae, *J Microbiol Methods*, 94 (2013) 170-174.
- [22] S.Y. Low, J.E. Hill, J. Peccia, DNA aptamers bind specifically and selectively to (1->3)-beta-D-glucans, *Biochem Biophys Res Commun*, 378 (2009) 701-705.

- [23] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomol Eng*, 24 (2007) 381-403.
- [24] H.Y. Kong, J. Byun, Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science, *Biomol Ther (Seoul)*, 21 (2013) 423-434.
- [25] K.S. Ødegaard, J. Torgersen, C.W. Elverum, Structural and Biomedical Properties of Common Additively Manufactured Biomaterials: A Concise Review, *Metals*, 10 (2020).
- [26] K.K. Amirtharaj Mosas, A.R. Chandrasekar, A. Dasan, A. Pakseresht, D. Galusek, Recent Advancements in Materials and Coatings for Biomedical Implants, *Gels*, 8 (2022).
- [27] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, Y. Li, New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications, *Materials*, 7 (2014) 1709-1800.
- [28] M. Niinomi, Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications, *J Mech Behav Biomed Mater*, 1 (2008) 30-42.
- [29] M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions, *Biomatter*, 2 (2012) 176-194.
- [30] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Š. Perutkova, V. Kralj-Iglič, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglič, M. Mozetič, Titanium nanostructures for biomedical applications, *Nanotechnology*, 26 (2015) 062002.
- [31] J. Lausmaa, B. Kasemo, H. Mattsson, Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials, *Applied Surface Science*, 44 (1990) 133-146.
- [32] R. Vasudevan, Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance, *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1 (2014).
- [33] M.S. Aparna, S. Yadav, Biofilms: Microbes and Disease, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12 (2008) 526-530.
- [34] M. Otto, Staphylococcal biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol*, (2009).
- [35] C. Vuong, S. Kocianova, J.M. Voyich, Y. Yao, E.R. Fischer, F.R. DeLeo, M. Otto, A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence, *J Biol Chem*, 279 (2004) 54881-54886.
- [36] J.P. O'Gara, ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol Lett*, 270 (2007) 179-188.

- [37] P.D. Fey, M.E. Olson, Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, *Future Microbiol*, 5 (2010) 917-933.
- [38] T.J. Foster, Surface Proteins of *Staphylococcus epidermidis*, *Front Microbiol*, 11 (2020) 1829.
- [39] H. Rohde, E.C. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A.P. Davies, L.G. Harris, M.A. Horstkotte, J.K. Knobloch, C. Ragunath, J.B. Kaplan, D. Mack, Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections, *Biomaterials*, 28 (2007) 1711-1720.
- [40] M. Weisser, S.M. Schoenfelder, C. Orasch, C. Arber, A. Gratwohl, R. Frei, M. Eckart, U. Fluckiger, W. Ziebuhr, Hypervariability of biofilm formation and oxacillin resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing persistent severe infection in an immunocompromised patient, *J Clin Microbiol*, 48 (2010) 2407-2412.
- [41] C.R. Schaeffer, T.N. Hoang, C.M. Sudbeck, M. Alawi, I.E. Tolo, D.A. Robinson, A.R. Horswill, H. Rohde, P.D. Fey, Versatility of Biofilm Matrix Molecules in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates and Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression during High Shear Stress, *mSphere*, 1 (2016).
- [42] T.M. Hoang, C. Zhou, J.K. Lindgren, M.R. Galac, B. Corey, J.E. Endres, M.E. Olson, P.D. Fey, Transcriptional Regulation of *icaADBC* by both *IcaR* and *TcaR* in *Staphylococcus epidermidis*, *J Bacteriol*, 201 (2019).
- [43] M.M. Severn, A.R. Horswill, *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection, *Nat Rev Microbiol*, (2022).
- [44] C.R. Schaeffer, K.M. Woods, G.M. Longo, M.R. Kiedrowski, A.E. Paharik, H. Buttner, M. Christner, R.J. Boissy, A.R. Horswill, H. Rohde, P.D. Fey, Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model, *Infect Immun*, 83 (2015) 214-226.
- [45] B.P. Conlon, J.A. Geoghegan, E.M. Waters, H. McCarthy, S.E. Rowe, J.R. Davies, C.R. Schaeffer, T.J. Foster, P.D. Fey, J.P. O'Gara, Role for the A domain of unprocessed accumulation-associated protein (Aap) in the attachment phase of the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype, *J Bacteriol*, 196 (2014) 4268-4275.

- [46] R.L. Macintosh, J.L. Brittan, R. Bhattacharya, H.F. Jenkinson, J. Derrick, M. Upton, P.S. Handley, The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes, *J Bacteriol*, 191 (2009) 7007-7016.
- [47] D.G. Conrady, C.C. Brescia, K. Horii, A.A. Weiss, D.J. Hassett, A.B. Herr, A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms, (2008).
- [48] A. Bateman, M.T. Holden, C. Yeats, The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation, *Bioinformatics*, 21 (2005) 1301-1303.
- [49] D. Sun, M.A. Accavitti, J.D. Bryers, Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein, *Clin Diagn Lab Immunol*, 12 (2005) 93-100.
- [50] Y. Ning, L. Cheng, M. Ling, X. Feng, L. Chen, M. Wu, L. Deng, Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer, *Pathog Dis*, 73 (2015) ftv034.
- [51] A.T. Bayrac, S.I. Donmez, Selection of DNA aptamers to *Streptococcus pneumoniae* and fabrication of graphene oxide based fluorescent assay, *Anal Biochem*, 556 (2018) 91-98.
- [52] Z. Huang, W. Wen, A. Wu, L. Niu, Chemically Modified, alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole (AMPA) Receptor RNA Aptamers Designed for in Vivo Use, *ACS Chem Neurosci*, 8 (2017) 2437-2445.
- [53] Z. Zhuo, Y. Yu, M. Wang, J. Li, Z. Zhang, J. Liu, X. Wu, A. Lu, G. Zhang, B. Zhang, Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [54] R. Stoltenburg, T. Schubert, B. Strehlitz, In vitro Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A, *PLoS One*, 10 (2015) e0134403.
- [55] X. Cao, S. Li, L. Chen, H. Ding, H. Xu, Y. Huang, J. Li, N. Liu, W. Cao, Y. Zhu, B. Shen, N. Shao, Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*, *Nucleic Acids Res*, 37 (2009) 4621-4628.
- [56] R. White, C. Rusconi, E. Scardino, A. Wolberg, J. Lawson, M. Hoffman, B. Sullenger, Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX, *Mol Ther*, 4 (2001) 567-573.

- [57] M.C. Golden, B.D. Collins, M.C. Willis, T.H. Koch, Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers, *Journal of Biotechnology*, 81 (2000) 167-178.
- [58] M. Cho, Y. Xiao, J. Nie, R. Stewart, A.T. Csordas, S.S. Oh, J.A. Thomson, H.T. Soh, Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 15373-15378.
- [59] L. Peng, B.J. Stephens, K. Bonin, R. Cubicciotti, M. Guthold, A Combined Atomic Force/Fluorescence Microscopy Technique to Select Aptamers in a Single Cycle From a Small Pool of Random Oligonucleotides, *Microsc Res Tech*, 70 (2007).
- [60] K.S. Allemailem, A. Almatroudi, M.A. Alsahli, G.T. Basfar, F. Alrumaihi, A.H. Rahmani, A.A. Khan, Recent advances in understanding oligonucleotide aptamers and their applications as therapeutic agents, *3 Biotech*, 10 (2020) 551.
- [61] A.D. Ellington, J.W. Szostak, Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures, *Nature*, 355 (1992) 850-852.
- [62] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, 263 (1994) 1425-1429.
- [63] B.S. Singer, T. Shtatland, D. Brown, L. Gold, Libraries for genomic SELEX, *Nucleic Acids Research*, 25 (1997) 781-786.
- [64] L.R. Coulter, M.A. Landree, T.A. Cooper, Identification of a New Class of Exonic Splicing Enhancers by In Vivo Selection, *Molecular and Cellular Biology*, 17 (1997) 2142-150.
- [65] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal Bioanal Chem*, 383 (2005) 83-91.
- [66] M. Takahashi, E. Sakota, Y. Nakamura, The efficient cell-SELEX strategy, Icell-SELEX, using isogenic cell lines for selection and counter-selection to generate RNA aptamers to cell surface proteins, *Biochimie*, 131 (2016) 77-84.
- [67] P. Kumar Kulabhusan, B. Hussain, M. Yuce, Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents, *Pharmaceutics*, 12 (2020).
- [68] J. Menne, D. Eulberg, D. Beyer, M. Baumann, F. Saudek, Z. Valkusz, A. Wiecek, H. Haller, G. Emapticap Study, C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria, *Nephrol Dial Transplant*, 32 (2017) 307-315.

- [69] D. Zboralski, K. Hoehlig, D. Eulberg, A. Fromming, A. Vater, Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade, *Cancer Immunol Res*, 5 (2017) 950-956.
- [70] M.Y. Hanafi-Bojd, S.A. Moosavian Kalat, S.M. Taghdisi, L. Ansari, K. Abnous, B. Malaekheh-Nikouei, MUC1 aptamer-conjugated mesoporous silica nanoparticles effectively target breast cancer cells, *Drug Dev Ind Pharm*, 44 (2018) 13-18.
- [71] K. Tsogtbaatar, D.A. Sousa, D. Ferreira, A. Tevlek, H.M. Aydin, E. Celik, L. Rodrigues, In vitro selection of DNA aptamers against human osteosarcoma, *Invest New Drugs*, 40 (2022) 172-181.
- [72] S.J. Kaur, V. Gilman, M. Duong, D.M. Asher, L. Gregori, Rapid selection of single stranded DNA aptamers binding S. epidermidis in platelet concentrates, *BioTechniques*, (2018).
- [73] R. Torabi, H. Ghourchian, M. Amanlou, P. Pasalar, Aptamer-Conjugated Calcium Phosphate Nanoparticles for Reducing Diabetes Risk via Retinol Binding Protein 4 Inhibition, *Can J Diabetes*, 41 (2017) 305-311.
- [74] J.O. Lee, H.M. So, E.K. Jeon, H. Chang, K. Won, Y.H. Kim, Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors, *Anal Bioanal Chem*, 390 (2008) 1023-1032.
- [75] L. Wang, F. Huang, G. Cai, L. Yao, H. Zhang, J. Lin, An Electrochemical Aptasensor Using Coaxial Capillary with Magnetic Nanoparticle, Urease Catalysis and PCB Electrode for Rapid and Sensitive Detection of Escherichia coli O157:H7, *Nanotheranostics*, 1 (2017) 403-414.
- [76] L. Wang, C. Wang, H. Li, Selection of DNA aptamers and establishment of an effective aptasensor for highly sensitive detection of cefquinome residues in milk, *Analyst*, 143 (2018) 3202-3208.
- [77] Y. Su, C. Shao, X. Huang, J. Qi, R. Ge, H. Guan, Z. Lin, Extraction and detection of bisphenol A in human serum and urine by aptamer-functionalized magnetic nanoparticles, *Anal Bioanal Chem*, 410 (2018) 1885-1891.
- [78] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31 (2006) 603-632.
- [79] M. Aider, Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2010) 837-842.

- [80] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 981-1014.
- [81] P.K. Dutta, S. Tripathi, G.K. Mehrotra, J. Dutta, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chemistry*, 114 (2009) 1173-1182.
- [82] I. Leceta, P. Guerrero, S. Cabezudo, K.d.l. Caba, Environmental assessment of chitosan-based films, *Journal of Cleaner Production*, 41 (2013) 312-318.
- [83] V. Coma, Recent Developments in Chitin and Chitosan Bio-Based Materials Used for Food Preservation, *Polysaccharide Building Blocks 2012*, pp. 143-175.
- [84] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int J Food Microbiol*, 144 (2010) 51-63.
- [85] L.-Y. Zheng, J.-F. Zhu, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54 (2003) 527-530.
- [86] J.D. Bumgardner, R. Wiser, P.D. Gerard, P. Bergin, B. Chestnutt, M. Marini, V. Ramsey, S.H. Elder, J.A. Gilbert, Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 14 (2003) 423-438.
- [87] Y. Yuan, B.M. Chesnutt, L. Wright, W.O. Haggard, J.D. Bumgardner, Mechanical property, degradation rate, and bone cell growth of chitosan coated titanium influenced by degree of deacetylation of chitosan, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 86 (2008) 245-252.
- [88] P. Renoud, B. Toury, S. Benayoun, G. Attik, B. Grosgeat, Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances, *PLoS One*, 7 (2012) e39367.
- [89] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- [90] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680.
- [91] M. Citartan, T.H. Tang, S.C. Tan, Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 34 (2) (2012).
- [92] H. Summer, R. Grämer, P. Dröge, Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE), *Journal of Visualized Experiments*, (2009).

- [93] J.D. Bumgardner, R. Wiser, P.D. Gerard, P. Bergin, B. Chestnutt, M. Marin, V. Ramsey, S.H. Elder, J.A. Gilbert, Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants, *J Biomater Sci Polym Ed*, 14 (2003) 423-438.
- [94] L. Yan, L. Zhang, H. Ma, D. Chiu, J.D. Bryers, A Single B-repeat of *Staphylococcus epidermidis* accumulation-associated protein induces protective immune responses in an experimental biomaterial-associated infection mouse model, *Clin Vaccine Immunol*, 21 (2014) 1206-1214.
- [95] Y. Guan, Q. Zhu, D. Huang, S. Zhao, L. Jan Lo, J. Peng, An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide, *Scientific Reports*, 5 (2015).
- [96] A.E. Paharik, M. Kotasinska, A. Both, T.N. Hoang, H. Buttner, P. Roy, P.D. Fey, A.R. Horswill, H. Rohde, The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*, *Mol Microbiol*, 103 (2017) 860-874.
- [97] C.T. Chaton, A.B. Herr, Defining the metal specificity of a multifunctional biofilm adhesion protein, *Protein Sci*, 26 (2017) 1964-1973.
- [98] M. Shahdordizadeh, S.M. Taghdisi, M. Sankian, M. Ramezani, K. Abnous, Design, isolation and evaluation of the binding efficiency of a DNA aptamer against interleukin 2 receptor alpha, in vitro, *Int Immunopharmacol*, 53 (2017) 96-104.
- [99] C. Qi, T. Bing, H. Mei, X. Yang, X. Liu, D. Shanguan, G-quadruplex DNA aptamers for zeatin recognizing, *Biosens Bioelectron*, 41 (2013) 157-162.
- [100] J. Tuma Sabah, R.M. Zulkifli, S. Shahir, F. Ahmed, M.R. Abdul Kadir, Z. Zakaria, In vitro selection and characterization of single stranded DNA aptamers for luteolin: A possible recognition tool, *Anal Biochem*, 549 (2018) 72-79.
- [101] K.G. Neoh, X. Hu, D. Zheng, E.T. Kang, Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces, *Biomaterials*, 33 (2012) 2813-2822.
- [102] W. Alshaer, N. Ababneh, M. Hatmal, H. Izmirlı, M. Choukeife, A. Shraim, N. Sharar, A. Abu-Shiekah, F. Odeh, A. Al Bawab, A. Awidi, S. Ismail, Selection and targeting of EpCAM protein by ssDNA aptamer, *PLoS One*, 12 (2017) e0189558.

- [103] L. Kelly, C. Kratschmer, K.E. Maier, A.C. Yan, M. Levy, Improved Synthesis and In Vitro Evaluation of an Aptamer Ribosomal Toxin Conjugate, *Nucleic Acid Ther*, 26 (2016) 156-165.
- [104] S.D. Gur, N. Idil, N. Aksoz, Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads, *Appl Biochem Biotechnol*, 184 (2018) 538-552.
- [105] M. Fernandes Queiroz, K.R. Melo, D.A. Sabry, G.L. Sasaki, H.A. Rocha, Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?, *Mar Drugs*, 13 (2014) 141-158.
- [106] Y. Ning, X. Wang, P. Chen, S. Liu, J. Hu, R. Xiao, L. Li, F. Lu, Targeted inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation by a graphene oxide-loaded aptamer/berberine bifunctional complex, *Drug Deliv*, 29 (2022) 1675-1683.
- [107] L.C. Gomes, S.I. Faria, J. Valcarcel, J.A. Vazquez, M.A. Cerqueira, L. Pastrana, A.I. Bourbon, F.J. Mergulhao, The Effect of Molecular Weight on the Antimicrobial Activity of Chitosan from *Loligo opalescens* for Food Packaging Applications, *Mar Drugs*, 19 (2021).
- [108] S. Tokura, K. Ueno, S. Miyazaki, N. Nishi, Molecular weight dependent antimicrobial activity by Chitosan, *Macromolecular Symposia*, 120 (1997) 1-9.

EKLER

EK 1 – Örnek primer çiftinin yapısal analizi: saç tokası, homo-dimer ve hetero-dimer oluşturma potansiyelleri

A) pET-26b-B1.0-F: ACGACTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		-3.29	40.9	-65.2	-207.64	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		-2.21	38.1	-52.5	-168.66	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		-2.1	40.7	-41.9	-133.5	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
4		-1.75	33.3	-64.9	-211.79	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Homo-dimer oluşma durumu:	Hetero-dimer oluşma durumu:
Delta G: -11.52 kcal/mole Base Pairs: 6 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG 3' GCATTAGCCTAGCGGTAGTTGGTACCTTAGCA	Delta G: -7.84 kcal/mole Base Pairs: 5 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC
Delta G: -6.5 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : 3' GCATTAGCCTAGCGGTAGTTGGTACCTTAGCA	Delta G: -6.96 kcal/mole Base Pairs: 5 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG :: : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC
Delta G: -4.62 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : : 3' GCATTAGCCTAGCGGTAGTTGGTACCTTAGCA	Delta G: -6.6 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : : : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC

B) pET-26b-B1.0-R: CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTACATCATCC

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		-1.39	43.7	-23.6	-74.49	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		-1.23	33.7	-43.3	-141.09	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		-1.09	36.2	-30.2	-97.62	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Homo-dimer oluşma durumu:	Hetero-dimer oluşma durumu:
Delta G: -9.96 kcal/mole Base Pairs: 6 5' CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTACATCATCC 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC	Delta G: -7.84 kcal/mole Base Pairs: 5 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC
Delta G: -5.36 kcal/mole Base Pairs: 4 5' CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTACATCATCC : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC	Delta G: -6.96 kcal/mole Base Pairs: 5 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG :: : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC
Delta G: -5.02 kcal/mole Base Pairs: 3 5' CCAATTCTCGAGTGGACCATATTTTGTACATCATCC : : : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC	Delta G: -6.6 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ACGATTCCATGGTTGATGGCGATCCGATTACG : : : 3' CCTACTACACTGTTTTATACCAGGTGAGCTCTTAACC

EK 2 – DNA dizi analizi yaptırılan örnekler ile beklenen gen dizilimlerinin karşılaştırılmasına ait görüntüler

NW Score	Identities	Gaps	Strand
960	480/480(100%)	0/480(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Sbjct 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Query 61	ATGGCAATGCTGATGGGATCCGATACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAA		120
Sbjct 61	ATGGCAATGCTGATGGGATCCGATACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAA		120
Query 121	CGCGAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCA		180
Sbjct 121	CGCGAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCA		180
Query 181	GGAAACAAAACAAATACACGCGCAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGT		240
Sbjct 181	GGAAACAAAACAAATACACGCGCAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGT		240
Query 241	GAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGT		300
Sbjct 241	GAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGT		300
Query 301	GGCGAAGAAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		360
Sbjct 301	GGCGAAGAAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		360
Query 361	CAAGAGGACGCTTCAGGTAACAGAGGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACA		420
Sbjct 361	CAAGAGGACGCTTCAGGTAACAGAGGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACA		420
Query 421	CCACCACTGGATGATGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		480
Sbjct 421	CCACCACTGGATGATGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		480

NW Score	Identities	Gaps	Strand
823	413/414(99%)	0/414(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTGTATGGCGATCCGATTACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGGAA		60
Sbjct 1	ATGGTGTATGGCGATCCGATTACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGGAA		60
Query 61	TTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCAAGAA		120
Sbjct 61	TTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCAAGAA		120
Query 121	AAAAAATTACACCGCCAAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGTGAAGT		180
Sbjct 121	AAAAAATTACACCGCCAAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGTGAAGT		180
Query 181	GAACCAACAGAAAAATAACAAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGTGA		240
Sbjct 181	GAACCAACAGAAAAATAACAAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGTGA		240
Query 241	GAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		300
Sbjct 241	GAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		300
Query 301	GACGTTCCAGGTAAACAGGAGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACACCA		360
Sbjct 301	GACGTTCCAGGTAAACAGGAGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACACCA		360
Query 361	GTGGATGTGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	414	
Sbjct 361	GTGGATGTGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	414	

pET-26b_B1.0 ve pET-28a_B1.0 ürünlerinin DNA dizi analizi sonuçları.

NW Score	Identities	Gaps	Strand
1423	713/714(99%)	0/714(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Sbjct 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Query 61	ATGGCAATGCTGATGGGATCCGATACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAA		120
Sbjct 61	ATGGCAATGCTGATGGGATCCGATACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAA		120
Query 121	CGCGAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCA		180
Sbjct 121	CGCGAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCA		180
Query 181	GGAAACAAAACAAATACACGCGCAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGT		240
Sbjct 181	GGAAACAAAACAAATACACGCGCAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGT		240
Query 241	GAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGT		300
Sbjct 241	GAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGT		300
Query 301	GGCGAAGAAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		360
Sbjct 301	GGCGAAGAAATCAAGCCAGGTCATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		360
Query 361	CAAGAGGACGCTTCAGGTAACAGAGGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACA		420
Sbjct 361	CAAGAGGACGCTTCAGGTAACAGAGGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACA		420
Query 421	CCACCACTGGATGATGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		480
Sbjct 421	CCACCACTGGATGATGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		480
Query 481	GAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGAAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		540
Sbjct 481	GAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGAAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		540
Query 541	AAAGTGTTCAAAAGGTGAACCGAAGCAAAAACAAATACAGCCCAACCACTAAGA		600
Sbjct 541	AAAGTGTTCAAAAGGTGAACCGAAGCAAAAACAAATACAGCCCAACCACTAAGA		600
Query 601	CAATTAACAGGAAAAAATAGGCAAGGTAATCAACAGAAAAACCACTAAGA		660
Sbjct 601	CAATTAACAGGAAAAAATAGGCAAGGTAATCAACAGAAAAACCACTAAGA		660
Query 661	GTGGCAAAATGTTGAGTATGGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	714	
Sbjct 661	GTGGCAAAATGTTGAGTATGGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	714	

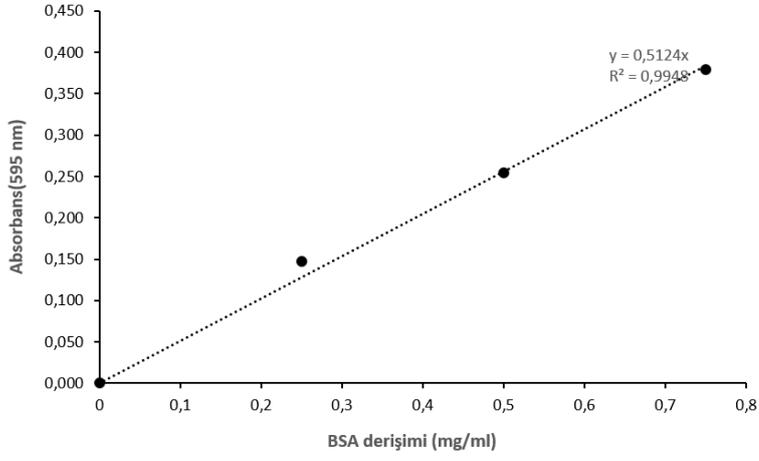
NW Score	Identities	Gaps	Strand
1296	648/648(100%)	0/648(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTGTATGGCGATCCGATTACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGGAA		60
Sbjct 1	ATGGTGTATGGCGATCCGATTACGTCACCGAAGAAATCCGTTGATAAAAAACCGGAA		60
Query 61	TTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCAAGAA		120
Sbjct 61	TTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGTCTTCAAAAAGGTGAACCAAGAA		120
Query 121	AAAAAATTACACCGCCAAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGTGAAGT		180
Sbjct 121	AAAAAATTACACCGCCAAACCACTAAGAACCCTAACAGGGGAAAAAGTTGGTGAAGT		180
Query 181	GAACCAACAGAAAAATAACAAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGTGA		240
Sbjct 181	GAACCAACAGAAAAATAACAAAAACCAAGTGGATGAGATGCTTATTATGGTGA		240
Query 241	CAATCAACCAAGGTATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		300
Sbjct 241	CAATCAACCAAGGTATAAGATGAATTTGATCAAACTGACCGAAAGGTAGC		300
Query 301	GAGGTTCCAGGTAAACAGGAGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACACCA		360
Sbjct 301	GAGGTTCCAGGTAAACAGGAGTTAAAACTCGATACAGCGGAAGTAGTACACCA		360
Query 361	GTGGATGTGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		420
Sbjct 361	GTGGATGTGTGCAAAAATAGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA		420
Query 421	ATTCGTTGATAAAAAACCGAAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGT		480
Sbjct 421	ATTCGTTGATAAAAAACCGAAATTTGATCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAGT		480
Query 481	GTTCAAAAAGGTGAACCGAAGCAAAAACAAATACAGCCCAACCACTAAGA		540
Sbjct 481	GTTCAAAAAGGTGAACCGAAGCAAAAACAAATACAGCCCAACCACTAAGA		540
Query 541	ACAGGAAAAAAGTTGGCAAGGTAATCAACAGAAAAACCACTAAGA		600
Sbjct 541	ACAGGAAAAAAGTTGGCAAGGTAATCAACAGAAAAACCACTAAGA		600
Query 601	GAATGTTGAGTATGGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	648	
Sbjct 601	GAATGTTGAGTATGGTCCACTCGAGCCACCCACCACCACTGA	648	

pET-26b_B1.5 ve pET-28a_B1.5 ürünlerinin DNA dizi analizi sonuçları.

NW Score	Identities	Gaps	Strand
1392	696/696(100%)	0/696(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Sbjct 1	ATGAAATACCTGCTGCGAACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTGCTCCGACCGCGGG		60
Query 61	ACAAAATTAACGAGATATAATATGACAGCCACCTGGTCAACACAGCTGGTCAAGT		120
Sbjct 61	ACAAAATTAACGAGATATAATATGACAGCCACCTGGTCAACACAGCTGGTCAAGT		120
Query 121	CAATTAABAAATCAAGTTAGTTTATGATAGATTTGCACTTAACATTAGATAGCAAC		180
Sbjct 121	CAATTAABAAATCAAGTTAGTTTATGATAGATTTGCACTTAACATTAGATAGCAAC		180
Query 181	AATCGTCAAGGTAATACAACTGGTGCAGATGGTGGGGCTTATGTTCAAGCAAAAAGAT		240
Sbjct 181	AATCGTCAAGGTAATACAACTGGTGCAGATGGTGGGGCTTATGTTCAAGCAAAAAGAT		240
Query 241	GGGGATGATTTCTAAAAACGGTGTATCTACGTGAAAAAGGTACACTAGTGCAGCT		300
Sbjct 241	GGGGATGATTTCTAAAAACGGTGTATCTACGTGAAAAAGGTACACTAGTGCAGCT		300
Query 301	GGTTTCAGGATGATACAGGATATAATACAGATCCATTAGATAAAATACAGAAACAA		360
Sbjct 301	GGTTTCAGGATGATACAGGATATAATACAGATCCATTAGATAAAATACAGAAACAA		360
Query 361	CGTGTCAAGGCTATAGAGGGTATGGGACATTTGATAAAAAGTCCCAAGGTAATACT		420
Sbjct 361	CGTGTCAAGGCTATAGAGGGTATGGGACATTTGATAAAAAGTCCCAAGGTAATACT		420
Query 421	CTAAAGTAGGATCAGGATCCATCAACAGATTTCTTAACATAGCAGATATAACTACT		480
Sbjct 421	CTAAAGTAGGATCAGGATCCATCAACAGATTTCTTAACATAGCAGATATAACTACT		480
Query 481	AATGATTTAGATGTAATAATTCATGGTCAAAAAATTAATAATGTTAATTTGAAATATA		540
Sbjct 481	AATGATTTAGATGTAATAATTCATGGTCAAAAAATTAATAATGTTAATTTGAAATATA		540
Query 541	GCTTCAAACTAACTTTACAGCTACTTATGCTGGTAAACCTGGACGGCTACGTTACT		600
Sbjct 541	GCTTCAAACTAACTTTACAGCTACTTATGCTGGTAAACCTGGACGGCTACGTTACT		600
Query 601	GAATAGGATGAGTCAACGATAGTAACTTTTATGATACATCAAGTCAATATGGC		660
Sbjct 601	GAATAGGATGAGTCAACGATAGTAACTTTTATGATACATCAAGTCAATATGGC		660
Query 661	AATGGTAATCTCGAGCCACCCACCACCACTGA	696	
Sbjct 661	AATGGTAATCTCGAGCCACCCACCACCACTGA	696	

A1.0 gen gölgesinin DNA dizi analizi sonucu.

EK 3 – Ticari BSA kullanılarak hazırlanan Bradford standart eğrisi örneği



EK 4 – Aptamer kütüphanesi için tasarlanan primer bölgesinin homo-dimer ve hetero-dimer oluşturma durum analizi

F-Apt: TAGCGAAGATACCCAGGACG

Homo-dimer oluşma durumu:		Hetero-dimer oluşma durumu:	
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : : : 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>

R-Apt: AGAGCGAACCATAACGGATG

Homo-dimer oluşma durumu:		Hetero-dimer oluşma durumu:	
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : : 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : 3' GCAGGACCCATAGAGCGAT</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG : : : : 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TAGCGAAGATACCCAGGACG 3' GTAGCCAATACCAAGCGAGA</p>

EK 5 –A1.0 ve B1.0 protein bölgeleri ile etkileşen aday aptamerlerin dizilerinin karşılaştırılması.

	*****	*****
ac1	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac3	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac4	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac5	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac7	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac8	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac9	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac11	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac12	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac13	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac14	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac17	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac19	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac20	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac21	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac22	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac23	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac25	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac27	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac28	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac29	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac30	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac31	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac33	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac34	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac35	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac36	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac37	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac39	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac41	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac43	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac44	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac45	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac46	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac50	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac51	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC
ac52	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGG
ac53	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC

	*****	*	*	*
bc1	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc2	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc3	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc4	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc5	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc6	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc7	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc9	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc10	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc11	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT
bc14	TAGCGAAGATA	CCAGGACGGC	AGCTATGG	ACTGCTTGATGGTGGTTGTAATTATGTGCCATCGGTTATGGTTCGCTCT

*: primer bölgeleri

EK 6- Tezden Türetilmiş Bildiriler

Altun, E., Çelik, E., Yavuz Ersan, H., 5-8/09/2022. Single stranded DNA library screening towards inhibiting *Staphylococcus epidermidis* related infections on orthopedic implants. 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NanoTR-16), Ankara, Türkiye, Book of Abstracts, 346 (poster sunumu).