

**YÜZEYE MODİFİYE EDİLEN APTAMER UÇ GRUPLARININ
APTAMER-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNE ETKİSİNİN
KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SURFACE
MODIFIED APTAMER END GROUPS ON APTAMER-
PROTEIN INTERACTIONS BY MASS SPECTROMETER**

FUNDA YILDIRIM

**Prof. Dr. BEKİR SALİH
Tez Danışmanı**

**Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

2014

FUNDA YILDIRIM'ın hazırladığı “**Yüzeye Modifiye Edilen Aptamer Uç Gruplarının Aptamer-Protein Etkileşimlerine Etkisinin Kütle Spektrometresi ile İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir B. Denkbaş

Başkan :.....

Prof. Dr. Bekir Salih

Danışman :.....

Prof. Dr. Belma Işık

Üye :.....

Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak

Üye :.....

Doç. Dr. Gökhan Demirel

Üye :.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım ailem, rahmetli dedem Mehmet Yıldırım
ve
hayatımı anlamlandıran tüm sevdiklerime...*

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

FUNDA YILDIRIM

ÖZET

YÜZEYE MODİFİYE EDİLEN APTAMER UÇ GRUPLARININ APTAMER-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNE ETKİSİNİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE İNCELENMESİ

Funda YILDIRIM

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Haziran 2014, 101 sayfa

Aptamerler farklı özelliklerle sentezlenebilen ve hedef moleküllerine (protein, enzim, virüs, hormon vb.) yüksek seçicilikle bağlanabilen deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) zincirleridir. Aptamerler, antikorların zayıf özelliklerini ortadan kaldırarak, araştırmalarda antikorların yerine kullanılmalarıyla bilinmektedirler. Aptamerler tek zincirli doğal DNA veya RNA moleküllerinden seçilirler. Geniş biyoanalitik uygulamalardaki fonksiyonlarını ve bağlanmalarını arttırmak için aptamerler 3' ve 5' uçlarından çeşitli gruplarla (-NH₂, -SH vb.) modifikasyona uğratılırlar. Aptamerler, biyolojik örneklerde düşük miktarlarda bulunan proteinlerin tayinlerinde biyo-işaretleyici (biomarker) olarak kullanılabilirler ve bu sayede karmaşık protein karışımlarından hedef molekülün izole edilmesini sağlarlar. Böylelikle, teşhis ve tedavi edici özelliğe sahip olan hücresel hedefler için seçilen aptamerler sayesinde kanser hücresi ve tümör tayinleri gibi uygulamalarda çok önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Bu tür uygulamaların geliştirilmesi için aptamer-hedef molekül etkileşimlerinin dayandığı bilimsel temellerin belirlenmesi çok önemlidir.

Aptamerlerin yukarıda da bahsedilen eşsiz özelliklerinden dolayı, tez kapsamında yapılan çalışmalarda yüzeye modifiye edilen aptamer uç gruplarının aptamer protein etkileşimlerine etkileri araştırılmıştır. Trombin aptamer çeşidinin etkilerinin

gözlenmesi için 24 farklı modifiye aptamer hedef insan trombin proteini ile etkileştirilmiştir. Öncelikle, 5' ve 3' uçlarında farklı sayıda baz birimine sahip trombin aptameri kovalent olarak tiyol (-SH) veya amin (-NH₂) fonksiyonel gruba sahip uçlarından Sülfö-Süksinimidil-4-(N-maleimidomethyl) sikloheksan-1-karboksilat (Sülfö-SMCC) ya da Bis(sülfösüksinimidil süberat) (BS³) uygun çapraz bağlayıcılarından biri kullanılarak amin fonksiyonlu polimerik yüzeye sabitlenmiştir. Yüzeye sabitlenen her bir aptamer 3,5 pmol/ µL insan trombin protein ile muamele edilmiştir. Katı destek yüzeyine kimyasal bağla bağlanan aptamerle etkileştirilip seçimli olarak zenginleştirme işleminin ardından, katı yüzeyde tripsin enzimi ile parçalama uygulanmıştır. Trombinin triptik parçalama ürünlerinin tanımlama ve dizilim analizleri matris-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırmalı-kütle spektrometrisi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry, MALDI-MS) ile gerçekleştirilmiştir. Her etkileşim için etkin aptamer-protein etkileşimleri karşılaştırılmıştır. Kütle spektrumlarında uç grubunda 6 timin baz birimi bulunan aptamerlerde trombin peptit fragmentleri ile daha fazla karşılaşmıştır. Bunun yanı sıra, aptamer ile zenginleştirme işlemi gerçekleştirilerek birçok proteinin bulunduğu karmaşık çözelti örneğinden trombin zenginleştirilmesi uygulanmıştır. MALDI-MS analiz sonuçları incelenerek trombinin karmaşık bir örnekten tezde geliştirilmiş yöntem kullanılarak aptameri tarafından seçilebileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: yüzey, aptamer, trombin, modifikasyon, Kütle Spektrometresi, peptit fragmentleri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SURFACE MODIFIED APTAMER END GROUPS ON APTAMER-PROTEIN INTERACTIONS BY MASS SPECTROMETER

Funda YILDIRIM

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. BEKİR SALİH

June 2014, 101 pages

Aptamers are deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) chains that can be synthesized with different properties and bind to target molecules (i.e., proteins, enzymes, viruses and hormones) with very high selectivity. Aptamers are widely known as a substitute for antibodies, because they overcome the weaknesses of antibodies. Aptamers are selected from single stranded DNA or RNA molecules made of natural nucleotides. To increase functionality and affinity of aptamers in diverse bioanalytical applications, aptamers have been modified by different functional groups (i.e. -NH₂, -SH etc.) from different parts such as 5' and 3'-terminus. Aptamers can be used as a biomarker for the detection of proteins at very low levels in biological samples and provide isolation of targeted molecules from the complex protein mixtures. Thus, very important developments have been carried out for the detection of cancer cells and tumors using the selected aptamers for the cellular targets having diagnostic and therapeutic capabilities. Therefore, it is very important to identify scientific basis of the aptamer-target molecule interactions to improve these diagnostic and therapeutic applications.

Due to the unique properties of the aptamers mentioned above, in the scope of this thesis, the effects of surface modified aptamer end groups on aptamer protein interactions are investigated. To observe the effects of thrombin aptamer type, 24 different modified thrombin aptamer were used to interact with targeted human

thrombin. Firstly, each aptamer immobilized surfaces was obtained by covalent attachment of thrombin aptamers via thiol (-SH) or amine (-NH₂) functional groups at 5' or 3' ends which contains different number of base units onto the amine functionalized polystyrene divinyl benzene polymeric surface using appropriate crosslinkers such as Sulfo-succinimdyl-4-(N-maleimidomethyl) cylohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) or Bis(sulfosuccinimdyl suberate) (BS³). Surface-immobilized aptamers were incubated with 3.5 pmol/μL human thrombin solution. After the selective enrichment process of thrombin using chemically attached aptamers onto the solid surface, enzymatic digestion process via trypsin was carried out on the surfaces. Analysis were performed for the determination and identification of the peptide sequences in tryptic digests of thrombin protein by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS). The comparisons for the effective aptamer-protein interactions were made. In the mass spectra highly abundant signals of specific thrombin fragments were observed especially in the case of 6 thymine base units containing aptamer. Also, enrichment of the thrombin process was applied to the complex sample solutions which include a number of proteins were analyzed using MALDI-MS and it was observed that thrombin could be enriched with high selectivity from the very complicated protein matrix solutions via this developed method.

Keywords: surface, aptamer, thrombin, modification, mass spectrometry, peptide fragments.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimin başından beri akademik yolda attığım her adımda yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle beni yetiştiren, araştırma grubunda çalışmaktan gurur duyduğum ve desteğini her zaman omuzumda hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Teorik ve pratik bilgilerini bizlerle paylaşmaktan hiç bıkmayan, sorduğum soruların layıkıyla cevabını aldığım, kendisinden akademik ve kişisel anlamdaki paylaşımlarımda pek çok şey öğrendiğim ve kahkahalarının bir ömür boyu sürmesini dilediğim sevgili hocam Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak'a çok teşekkür ederim.

Lisansta hocam, yüksek lisans sürecinde yakın dostum olan, herkesin iyiliğini düşünmekten hiç yorulmayan kanatsız meleğim Araş. Gör. Ülkü Güler'e bana verdiği tüm bilimsel, psikolojik, sosyal destekleri ve kıymetli arkadaşlığı için teşekkür ederim.

SAREG'in bana kazandırdığı güzelliklerin en başında yer alan, desteklerini hiç esirgemeyen, herbirini birbirinden çok sevdiğim hocalarım ve meslektaşlarım Ayşegül Özgen, Araş. Gör. H. Mehmet Kayılı, Araş. Gör. Mehmet Atakay, Hande Kabadayı, Selin Özdemir, Burak Tavşanlı, Aslı Çal, Selim Gerişlioğlu ve Canan Höçük'e teşekkürü bir borç bilirim.

Beytepe yurdundan evimize kadar zamanın getirdiği güzellikleri birlikte yaşadığımız ve tüm zorlukların da birlikte üstünden geldiğimiz, Ankara'daki ailem ve biricik dostum Gizem Ocak'a tüm fedakarlıkları için çok teşekkür ederim.

Fidanları çocuk parkında dikilen sonrasında üniversiteye, tüm hayata doğru büyüyen ve meyve veren dostlukları için Ecem ve Gizem Soğancıoğlu'na çok teşekkür ederim.

Hazırlık günlerinden, bölüm koridorlarına ve yurt odasına yayılan kardeşliği için Deniz Denizcan'a, her derdimi ve mutluluğumu kendisininmiş gibi paylaşan Kemal Mullaoglu'na, Tom yardımıyla tedarik zinciri görevini üstlenen Süleyman Ozan'a, okuldaki daykom Soner Akyüz'e çok teşekkür ederim.

Hayatıma girmesiyle her şeyi güzelleştiren, ufkumu geliştiren, iyi ve kötü anları paylaşmayı dilediğim Ufuk Saçak'a teşekkür ederim.

Gerçekleştirmeyi dilediğim her hayalimde benimle birlikte hayal kuran, mutlu olduğumda benimle sevinip, hüznümü de paylaşarak azaltan, benim ve kardeşlerimin iyiliği için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan en yakın dostum ve meleğim annem Fulya Yıldırım ve biricik babam Ayhan Yıldırım'a bana verdikleri emekler için çok teşekkür ederim. Önce oyuncaklarımızı sonra koca bir hayatı paylaştığımız can kardeşlerim Sena ve Rana Yıldırım'a benim kardeşim oldukları için teşekkür ederim. Onlara layık olmak için elimden geleni yaptığım ve sevgimin sözcüklerle sınırlı kalamadığı canım anneannem Ayla Dinç, dedem Feridun Dinç ve babaannem Fatma Yıldırım'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Başta çekirdek ailem olmak üzere tüm geniş ailem ve sevdiklerime bana verdiği desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Aptamerler.....	4
2.1.1. SELEX Yöntemiyle Aptamer Sentezi.....	5
2.1.2. Aptamer Modifikasyonu	7
2.1.3. Aptamerlerin Antikorlara Göre Üstün Özellikleri	9
2.2. Aptamer Uygulamaları.....	10
2.2.1. Tanı ve Metabolomik Yol Belirleme Uygulamaları	10
2.2.2. Tedavi ve İlaç Salınım Sistemlerinde Uygulamaları	11
2.2.3. Analitik Uygulamalarda Aptamerlerin Kullanımı.....	11
2.3. Aptamer Hedef Molekül Etkileşimleri	12
2.3.1. Trombin Aptameri ve Hedef Molekülü Trombin Proteini Etkileşimi	13
2.4. Aptamer İmmobilizasyonunun Kimyası	15
2.5. Biyokonjugasyon Kimyası ve Çapraz Bağlayıcılar.....	19
2.6. Aptamerlerin Yüze 3' ve 5' Uçları Üzerinden Bağlanması	21
2.7. Kütle Spektrometrisi	22
2.7.1. Bir Kütle Spektrometresinin Bileşenleri.....	23
2.7.1.1. Örnek Giriş Sistemi.....	23
2.7.1.2. Vakum Sistemi.	24
2.7.1.3. İyon Kaynakları.....	24
2.7.1.4. Kütle Ayırıcıları.....	26
2.7.1.5. Kütle Dedektörleri.....	28
2.7.2. Yumuşak İyonlaştırmalı Kütle Spektrometrisi	28

2.7.2.1. Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometrisi	29
2.7.2.2. ESI- Kütle Spektrometrisi	33
2.7.3. Kütle Spektrometresinin Avantajları	34
2.7.4. Aptamerler ve Kütle Spektrometrisi	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	37
3.1. Kimyasallar.....	37
3.2. Deneysel Kısım.....	39
3.3. Trombin Proteininin Kütle Spektrometrik Tekniklerle Enzimatik Parçalanma Koşullarının Belirlenmesi.....	41
3.4. Trombin Proteininin Aptamer Bağlı Yüzeye Bağlanmasında Ortam Sıcaklığı ve pH Değişkenlerinin Ayarlanması.....	42
3.5. Uygun Çapraz Bağlayıcıyla Yüzeye Bağlanan Trombin Aptamerinin Trombin Proteini ile Etkileşimi.....	42
3.6. Aptamer Tutturulmuş Polimerik Yüzeyde Triptik Parçalanmanın İncelenmesi.....	43
3.7. Aptamer Bağlanmamış Yüzeyin Trombin Proteini ile Muamele Edilmesinin İncelenmesi.....	44
3.8. Trombin Aptameri Bağlanmış Yüzey ile Karışım Halindeki Protein Çözeltisinin Etkileşiminin İncelenmesi.....	44
3.9. Düşük derişimli trombin proteininin geliştirilen yöntemle zenginleştirilerek tayin edilmesinin incelenmesi.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Trombin Proteininin Analizleri.....	46
4.2. Trombin Proteininin Enzimatik Parçalanma Koşullarının Belirlenmesi.....	48
4.3. Trombin aptamerinin 5' ya da 3' uçlarından modifikasyonunun hedef protein ile etkileşimindeki etkisinin incelenmesi.....	51
4.4. Trombin aptamerlerinin uçlarındaki farklı fonksiyonel gruplar üzerinde yüzeye bağlanma durumlarındaki değişimlerin trombin-aptamer etkileşimi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.....	54
4.5. Trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etki etmesine göre trombin - aptamer etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	57

4.5.1. Tiyol modifikasyonunda trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etkileri.....	57
4.5.2. Amin modifikasyonunda trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etkileri.....	63
4.6. Aptamer bağlanmamış yüzeyin trombin proteini ile muamele edilmesinin incelenmesi.....	68
4.7. Trombin aptameri bağlanmış yüzey ile karışım halindeki protein çözeltisinin etkileşiminin incelenmesi.....	69
5. SONUÇLAR.....	72
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kütle spektrometrik cihazlar için iyonlaştırma türleri.....	24
Çizelge 2.2. Kütle spektrometrik cihazlardaki kütle ayırıcı türleri.....	26
Çizelge 3.1. 5' ve 3' ucundan tiyol modifikasyonu (S-H) gerçekleştirilmiş farklı baz birimi çeşidi ve sayılarına sahip trombin aptameri dizileri.....	38
Çizelge 3.2. 5' ve 3' ucundan amin modifikasyonu gerçekleştirilmiş farklı baz birimi çeşidi ve sayılarına sahip trombin aptameri dizileri.....	38
Çizelge 4.1. Tripsin enzimi ile parçalanmış trombin proteinine ve tripsin otokataliz ürünlerine ait peptid fragmentlerinin kütleleri.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aptamerleri tanımlayan SELEX yönteminin yıllara göre gelişimi.....	5
Şekil 2.2. SELEX yöntem basamaklarının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.3. Aptamerlerde bulunan nükleositlerin veya fosfodiester bağının modifikasyonlarının şematik gösterimi. ($R_1= H, OH, F, OCH_3, NH_2$; $R_2=$ Hidrofobik, hidrofilik veya yüklü gruplar; $R_3= O, S$; $R_4= O, S$).....	7
Şekil 2.4. Aptamer-hedef molekül etkileşiminin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5. Trombin aptamerinin şematik gösterimleri.....	14
Şekil 2.6. Fosforamit üzerinden bağlanma gerçekleşirken EDC çapraz bağlayıcısının kullanılması.....	15
Şekil 2.7. Tiyoamit üzerinden bağlanma gerçekleşirken PDC çapraz bağlayıcısının kullanılması.....	16
Şekil 2.8. Aptamer immobilizasyon yöntemleri ve reaksiyon yolları.....	18
Şekil 2.9. Sülf-SMCC çapraz bağlayıcısının yapısı.....	20
Şekil 2.10. BS^3 çapraz bağlayıcısının yapısı.....	20
Şekil 2.11. Sülf-SMCC' nin yüzey-aptamer bağlanmasındaki rolü.....	21
Şekil 2.12. Kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik olarak gösterimi.....	23
Şekil 2.13. Uçuş tüpündeki iyonların hareketinin şematik olarak gösterimi.....	28
Şekil 2.14. MALDI-TOF çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.....	29
Şekil 2.15. En çok kullanılan MALDI matrislerinin kimyasal yapıları.....	30
Şekil 2.16. ESI çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	34

Şekil 3.1. Poli(stiren-divinilbenzen) mikrokürelerinin amin fonksiyonel grubu ile modifikasyonunun şematik gösterimi.....	39
Şekil 3.2. Tiyol modifiye aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.....	43
Şekil 3.3. Amin modifiye aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.....	43
Şekil 4.1. Trombin proteininin enzimatik parçalanmaya uğramadan önceki bütün protein formuna ait pozitif modda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.....	46
Şekil 4.2. Trombin proteininin özgün aptameri ile etkileşimi sonrasında elde edilen pozitif modda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.....	46
Şekil 4.3. Aynı koşullarda düşük derişimli (0.07 pmol/µL) trombin proteininin (A) aptamer kullanılarak uygun yöntemle zenginleştirilmesinin öncesinde, (B) 5'-([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG-3' dizilimine sahip trombin aptameri ile uygun yöntemle zenginleştirme sonrasında elde edilen enzimatik parçalanmasının peptit fragment kütlelerini gösteren MALDI-TOF-MS spektrumları.....	48
Şekil 4.4. Aynı koşullarda, (A) 1.0 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalama ve (B) 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalama sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.....	50
Şekil 4.5. Tiyol modifiye (A) 3' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	52
Şekil 4.6. Amin modifiye (A) 3' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	53
Şekil 4.7. (A) 5' ucundan tiyol modifiye trombin aptameri ([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5'ucundan amin modifiye trombin aptameri ([AmC6T]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	55

Şekil 4.8. (A) 3' ucundan tiyol modifiye trombin aptameri (TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]) kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 3'ucundan amin modifiye trombin aptameri (TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]) kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	56
Şekil 4.9. (A) Adenin nükleotidi baz biriminin kimyasal yapısı ve (b) Timin nükleotidi baz biriminin kimyasal yapısı.....	57
Şekil 4.10. 5' Ucundan tiyol modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	59
Şekil 4.11. 3' Ucundan tiyol modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	60
Şekil 4.12. 5' Ucundan tiyol modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda alınan pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	61
Şekil 4.13. 3' Ucundan tiyol modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	62
Şekil 4.14. 5' Ucundan amin modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	64

Şekil 4.15. 3' Ucundan amin modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	65
Şekil 4.16. 5' Ucundan amin modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	66
Şekil 4.17. 3' Ucundan amin modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	67
Şekil 4.18. Aptamer bağlanmamış amin fonksiyonel grulu yüzey ile muamele edilen trombin proteininin enzimatik parçalama sonrasında elde edilen MALDI- TOF-MS spektrumu.....	68
Şekil 4.19. 7 pmol/µL BSA için 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalanma sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.....	69
Şekil 4.20. 7 pmol/µL Sitokrom c için 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalanma sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.	69
Şekil 4.21. Eşit derişimlerde trombin, BSA ve Sitokrom-c protein karışımının aptamer bağlı yüzey ile etkileşimi sonrasındaki triptik parçalamaya ait kütle spektrumu.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikro
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
M	Molar
mM	Milimolar
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol

Kısaltmalar

A	Adenin
ACN	Asetonitril
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskop
B	Manyetik Alan
BSA	Sığır Serum Albümini
BS ³	Bis(sülfosüksinimidil süberat)
CDI	1,1' - karbonildiimidazol
Cl	Kimyasal iyonlaştırma
CHCA	α-siyano-4-hidroksisinnamik asit
Da	Dalton
DHB	2,5-dihidroksi benzoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	1,4-Ditiyotreitol
E	Elektriksel Alan
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EI	Elektron iyonlaştırmalı
ESI	Elektro sprey iyonlaştırma
FAB	Hızlı atom bombardımanı

FD	Alan Desorpsiyon
FTICR	Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IT	İyon kapanı
LD	Lazer Desorpsiyon
m/z	Kütle/yük
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometrisi
MS ⁿ	Ardışık Kütle Spektrometrisi
NH ₂	Amin fonksiyonel grubu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PS-DVB	Polistiren divinil benzen
Q	Dörtkutuplu
QCM	Kuarts kristal mikrodenge
PDC	1,4-fenilen diizosiyanat
RNA	Ribonükleik asit
SA	3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit
SAM	Kendiliğinden biraraya gelmiş tek tabaka
SELEX	Üstel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi
SH	Tiyol fonksiyonel grubu
SI	İkincil iyon
SLD	Lazer desorpsiyonlu yumuşak iyonlaştırma
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
Sülfo-SMCC	Sülfo-Süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat
T	Timin
TFA	Trifloroasetik Asit
TOF	Uçuş zamanlı
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopisi
3-HPA	3-Hidroksipikolinik asit

1. GİRİŞ

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) canlı hücrelerinin genetik varlığını meydana getirmektedir. Fosfat grupları, azotlu bazlar ve monosakkaritleri bir arada bulunduran temel DNA ve RNA yapıtaşlarına nükleotit adı verilir. Oligonükleotitler ise nükleotitlerin birbirleriyle reaksiyona girerek fosfodiester bağlarıyla oluşturduğu DNA ya da RNA zincirleridir [1]. Aptamerler, yapısal uyuma dayalı olarak hedef moleküle yüksek afinite ile özgün olarak bağlanan, yaklaşık 15-60 bazdan oluşan, tek zincirli RNA ve DNA oligonükleotitleridir. Bu yapılar; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, Watson-Crick baz çifti ve aromatik halkaların istiflenmesi kombinasyonlarıyla oluşmaktadır [2]. Aptamerler, teşhis ve tedavi edici özelliğe sahip olan hücresel hedefler için seçilirler. Nükleozitlere, organik boyalara, aminoasitlere, peptitlere, proteinlere, virüslere, ilaçlara ve hücrelerdeki hedef proteinlere bağlanabilirler. Proteinlere seçici ve kuvvetli olarak bağlanabilen afinite ajanları olan antikörelere kıyasla, aptamerler antikor kullanımındaki zorlukların aksine çok fazla avantaja sahiptir. Aptamerler ucuzdur ve kimyasal olarak sentezlenebilmeleri sayesinde kısa sürede elde edilebilirler. Kimyasal olarak kararlı, modifiye edilebilen ve raf ömrü uzun yapılardır. Aptamerler, biyolojik örneklerdeki düşük miktarlarda bulunan proteinlerin tayinlerinde biyo-işaretleyici olarak kullanılabilirler ve bu sayede oldukça fazla matriks yaratabilecek protein karışımlarından hedef molekülün izole edilmesini sağlarlar. Aptamerler, altın parçacıklar ya da yüzeyler, silika veya silikat tabakalar, polimerik yüzeyler gibi çeşitli tabakalara kovalent olarak bağlanıp, sabitlendikten sonra hedef molekülü yakalayıcı yüzeylerin oluşturulmasında kullanılabilirler. Aptamerlerin kullanıldığı biyoanalitik çalışmalarda aptamer-hedef molekül etkileşimlerinin mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması hedef moleküle özgü en uygun aptamer yapısının seçimini oldukça kolaylaştıracaktır [3].

Hedef moleküle göre seçilen aptamerler genellikle etkileştikleri hedef ligand yapılarının büyük bir kısmını çevrelemektedir. Ligandı çevreleyen aptamerin üç boyutlu kıvrımlı yapısı, yüksek özgünlük ve afinite sonucunda meydana gelen seçimli etkileşimleri sağlamaktadır. Hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri, birçok aptamer ile hedef molekülü arasında meydana gelen temel kuvvetlerdir. Ayrıca sterik etki, istiflenme, şekil uygunluğu ve elektrostatik etkileşimler de

aptamer ve onun hedef ligandı arasındaki etkileşimler için oldukça önemli parametrelerdir [4].

Tez kapsamında çalışılması hedeflenen protein insan vücudu için oldukça öneme sahip olan trombindir. G-kuadrupleks yapıya sahip olan trombin aptameri, trombin proteinine yüksek seçicilikle bağlanarak oldukça kararlı bir aptamer-protein kompleksi meydana getirmektedir. Trombin, protrombinin aktive edilmiş halidir. Birçok fonksiyona sahip çok yönlü bir proteindir. Kanın pıhtılaşmasında merkez rolü üstlenir. Trombosit aktivasyonunu sağlar. Fibrinin fibrinojene dönüşümünü katalizler. Kanamayı durdurmada da kullanılır. Protein c'nin aktive edilme işleminde trombodülin ile birleşerek, trombin aktive edici fibrinoliz inhibitörü olarak rol alır. Güçlü bir mitojen, çizgisiz kas hücrelerini etkileyici, makrofaj ve endotel hücre olarak ta rol alır. Sitokinezin salınmasından, damarlar üzerinde etkili maddelerden ve kimyasallara ilgi duyan maddelerden sorumludur. Sinirsel hastalıkların ilerlemesini kontrol altına alır ve kas gelişiminde anahtar rol oynar. Trombin üretimi azaldığında ya da trombin eksikliğinde hemofili ortaya çıkar. Uygun olmayan bölgelerde düzensiz trombin üretimi trombotik tıkanmalara sebep olur. Tümörlerin büyümesine sebep olur ve kemik absorpsiyonunu başlatır. Toplardamar döngüsünde tromboz ve damar pıhtılarının embole oluşu son yıllarda yapılan çalışmalarda belirlenmiş ve patolojiye katkı sağlamıştır. Fakat tromboz için risk teşhis ve koruma metodlarındaki adım adım ilerlemeler oldukça eksiktir [5].

Hücrede meydana gelen temel mekanizmaların belirlenmesi ile canlı sistemler dahilinde yürüyen biyokimyasal süreçler takip edilebilmektedir. Bu süreçlerin ortamda bulunan diğer metabolik türlerden veya ilaç gibi dışarıdan ortam içerisine ayrıca eklenen yapılardan nasıl etkilendiklerinin incelenmesi, biyoanalitik çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda özellikle maliyeti düşük, hızlı, kolay uygulanabilir, yüksek hassasiyette ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasına imkan veren yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırma faaliyetleri yürütülmektedir [2]. Yapılan çalışmaların çoğunda aptamer ile seçimli olarak etkileşen hedef molekülün içerisinde bulunduğu uygulamaların doğrudan başarılı olup olmadıklarının değerlendirilmesi yapılmaktadır.

Yukarıda açıkça belirtilmiş sebeplerden yola çıkarak, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile aptamer-hedef molekül etkileşimlerine etki edebilecek her türlü parametrenin detaylı bir şekilde incelenmesi hedeflenmiştir. Trombin proteininin hem amin fonksiyonel gruplu hem de tiyol fonksiyonel gruplu olarak sentezlenmiş aptamerleri ile uygun malzeme ve yöntem kullanılarak hazırlanıp amin fonksiyonel gruplu polimerik yüzey üzerinde zenginleştirme çalışmalarının yapılması sonucunda, trombine özgü hangi fonksiyonel gruplu aptamerin ne ölçüde ve nasıl bir aktivitede yüzeye tutunabildiğinin incelenmesi tezin amaçları arasında yer almıştır. Bunun yanı sıra, 3' ve 5' uçlarında farklı fonksiyonel gruplar bulunduran aptamerler kullanılarak, polimerik yüzey üzerine farklı bağlayıcı elemanlarla kovalent olarak bağlanma mekanizmalarının incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda modifiye edilme ucuna göre aptamerin yüzeye ne derece tutunduğu ve aptamerin yüzeye bağlanma ucunun hedef protein seçiciliği üzerindeki etkisi kütle spektrometrik analizler ışığında incelenmiştir. Hedef proteinlere özgü aptamerler sentezlenirken aptamer dizisinin başına getirilen pirimidin Timin (T) veya pürin Adenin (A) baz birimleri, yapıya esneklik sağlayarak aptamerin hedefini daha iyi yakalayabilme durumlarının gözlenmesi için aptamer ile yüzey arasına eklenmiştir. Aptamer dizilimine eklenen baz biriminin sayısının ve cinsinin de aptamer-hedef molekül etkileşimi üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla farklı sayılarda A ve T baz birimleri içeren trombin aptamerleri ile trombin proteini tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı fonksiyonel grupları ve uçları üzerinden yüzeylere bağlanma özelliklerinin değişiminin aptamer-hedef molekül etkileşimlerine etkilerinin Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı-Kütle Spektrometrisi (MALDI-MS) incelenmesi tezin ana hedefini oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen tez çalışması, karşılaştırmalı olarak aptamer- hedef protein özgün etkileşimlerinin moleküler temelde tanımlanması ile gözlenebilme sınırının altında olan düşük derişimlerde de proteinlerin aptamer bağlı yüzeyler üzerinde zenginleştirilip detaylı olarak kütle spektrometrik analizlerinin gerçekleştirilmesine ve böylelikle doğal örneklerdeki protein analizlerinde protein yapılarındaki mutasyonların belirlenmesine yönelik çalışmalara katkı sağlanması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Aptamerler, afinite ve duyarlılıkları bakımından antikora alternatif adaylardır. Proteinlere seçici ve kuvvetli olarak bağlanabilen afinite ajanları olan antikora avantajlarına sahip olmakla birlikte aptamerler ısıya kararlı, ucuz, kolay uygulanabilen, kimyasal olarak sentezlenebilen, modifiye edilebilen ve çok fazla uygulama alanına sahip yapılardır [6]. Bu nedenle aptamerler, antikora kullanımındaki zorlukların aksine çok fazla avantaja sahiptir.

2.1. Aptamerler

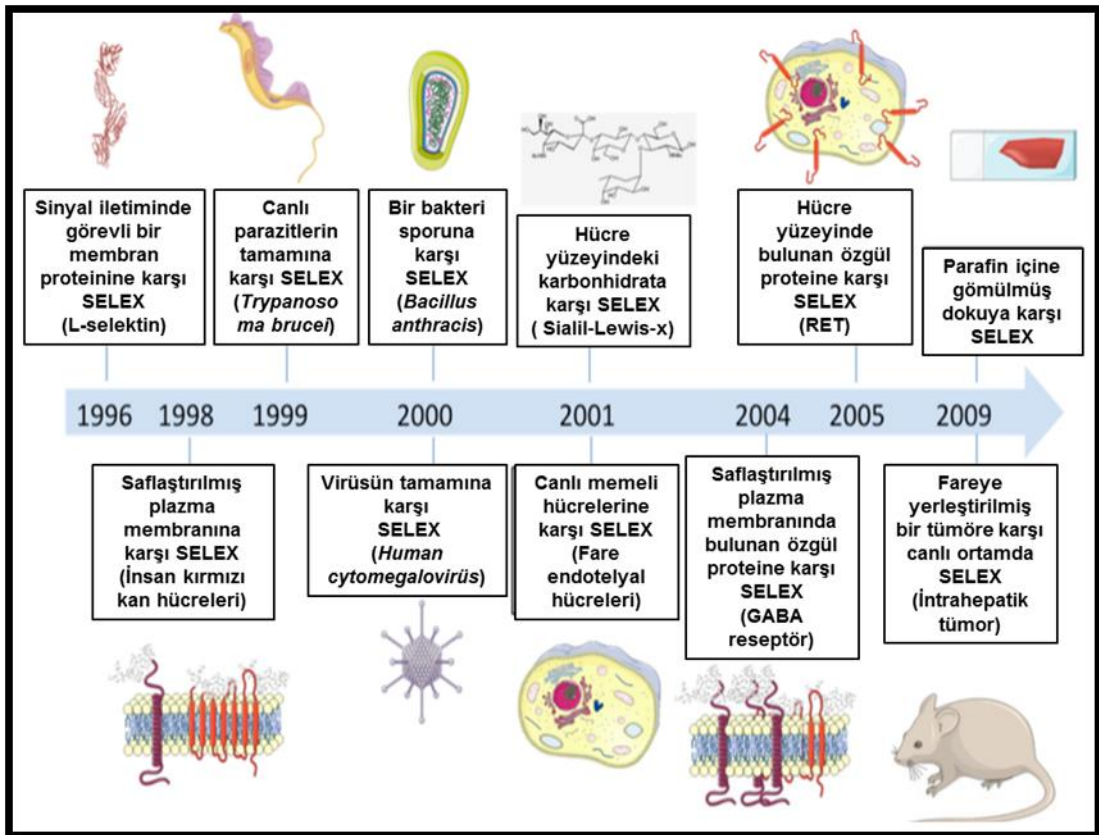
Protein nükleik asit etkileşimleri canlı organizmalar için büyük önem taşımakta ve bu etkileşimler ribonükleik asit (ribonucleic acid, RNA) taşınması, dönüşümleri, deoksiribonükleik asit (deoxyribonucleic acid, DNA) DNA paketlenmesi, genetik yeniden birleşim, replikasyon ve DNA onarımı gibi birçok önemli biyolojik işlemi kontrol etmektedir. Histon proteinlerinin kromatin oluşumuna yardım için DNA ile etkileşimi, bu etkileşimlere iyi bir örnek olarak verilebilir. Çeşitli transkripsiyon faktörleri, protein ekspresyonuna ortam hazırlamak için DNA'nın belirli bölümleri ile etkileşime girer. Yeni afinite bağlayıcıları geliştirmek için harcanan çabalar, aptamerler olarak adlandırılan yeni bir oligonükleotit araştırma sınıfını meydana getirmiştir [7]. Aptamerler, özgün üç boyutlu yapıları sayesinde hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikle bağlanabilen RNA, tek zincirli DNA (single stranded DNA, ssDNA) oligonükleotitleri veya peptid molekülleridir. RNA ve DNA aptamerleri aynı hedef moleküle bağlanmalarına rağmen, kıvrılma ve dizilim bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler [2]. 1990 yılında, üç farklı araştırma grubu eş zamanlı olarak nükleik asitlerin seçilme işlemleri hakkında çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Ellington ve arkadaşları RNA moleküllerinin organik boyaları bağlama etkinliklerini keşfederken, Robertson ve Joyce üretilmiş RNA enzimlerinin DNA'yı belirli bölgelerinden kesebildiğini göstermişlerdir. Tuerk ve Gold ise bakteriyofaj T4 DNA polimeraza karşı RNA ligandları üretmişlerdir [8].

Aptamerler, yapay ortamlarda üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) olarak adlandırılan tekrarlayan işlemler sonucunda üretilirler. Metal iyonları, küçük organik moleküller, peptitler, proteinler, kanser hücreleri ve virüsler olmak üzere çok geniş bir hedef kitlesine yüksek özgüllük ve seçicilikle bağlanırlar [7].

Aptamerler hedef moleküllerine mikromolar (μM) düzeyinden pikomolar (pM) düzeyine kadar bağlanma afinitesi gösterirler. Aptamerlerin hedef molekülüne bağlanmaları oldukça özgündür. Aptamerler, hedef moleküllerine bağlanırken iki molekül arasındaki tek bir kimyasal grup farklılığını ya da şekil farklılıkları olan aynı molekülü bile ayırt edebilirler [9]. Eşsiz bağlanma özellikleri sayesinde, son on yılda aptamerler çok geniş bir araştırma alanına sahip olmuşlardır [7]. Aptamerler, kullanım amaçlarına yönelik teşhis, tanı, tedavi ve biyohassas araştırmalarda, yeni ilaç geliştirilmesi ve ilaç salınım sistemlerinde olmak üzere pek çok bilimsel çalışmada biyomalzeme olarak kullanılmaktadır [2].

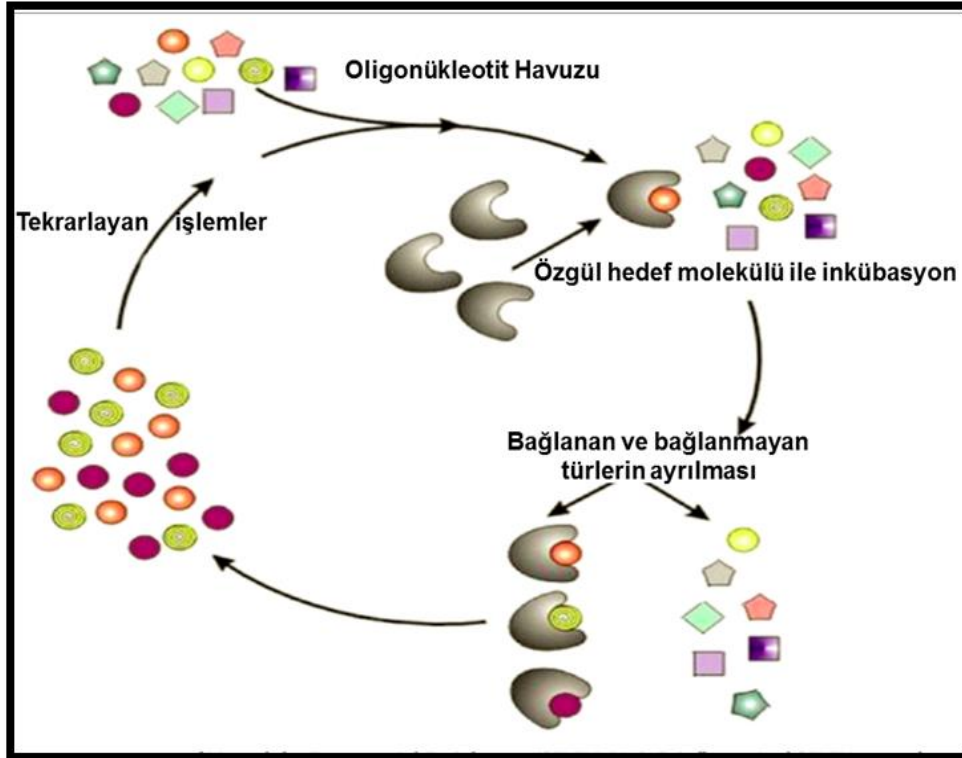
2.1.1. SELEX Yöntemiyle Aptamer Sentezi

SELEX 1990 yılında geliştirilmeye başlanmış, nükleik asit kütüphanesi kullanılarak aptamerleri ve ribozimleri canlı ortamda seçmek ve geliştirmek için kullanılan bir tekniktir [10]. Aptamerler küçük moleküllerden (iyonlar, küçük organik kimyasallar), makromoleküllere (proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler), hücelere ve dokulara kadar yayılan geniş bir hedef kitlesi için seçilmektedirler.



Şekil 2.1. Aptamerleri tanımlayan SELEX yönteminin yıllara göre gelişimi.

SELEX işlemi birbirini tamamlayan birkaç basamaktan oluşmaktadır. İlk olarak, karmaşık ve rastgele bulunan DNA havuzlarından Klenow genişlemesi (Klenow extension) ya da zincir polimerleşme reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) ile çift sarmallı DNA'lar oluşturulur. Çift sarmallı DNA'lar, RNA SELEX işleminde cansız ortamdaki transkripsiyon ile RNA üretimi için ya da DNA SELEX işleminde dizi ayırma işleminde tek zincirli DNA üretmek için kalıp olarak kullanılır. Tekrarlayan seçme ve güçlendirme işlemleri hedef bağlayıcıları zenginleştirmek için gerçekleştirilir. Üretilmiş tek zincirli DNA'lar veya RNA'lar ilk olarak hedef molekülü ile etkileştirilir. Hedefi bağlayıcı türler toplanırken, diğer türler ortamdaki ayrılır. Tek zincirli DNA bağlayıcıları veya RNA bağlayıcılarından ters dönüşümü gerçekleştirilen tamamlayıcı DNA'lar (cDNA), seçilme ve büyültme (amplifikasyon) döngüsünün devam etmesi ve yeni çift sarmallı DNA'ların üretilmesi için PCR tekniği ile büyütülürler. Zenginleştirilecek hiçbir tür kalmayınca kadar seçilme ve büyültme basamakları yürütülür. Bu işlemler 2-26 döngü sürmektedir. Sonuç olarak, bağlayıcılar kopyalanmış olurlar ve ileri karakterizasyon işlemleri için sıralanırlar [9].

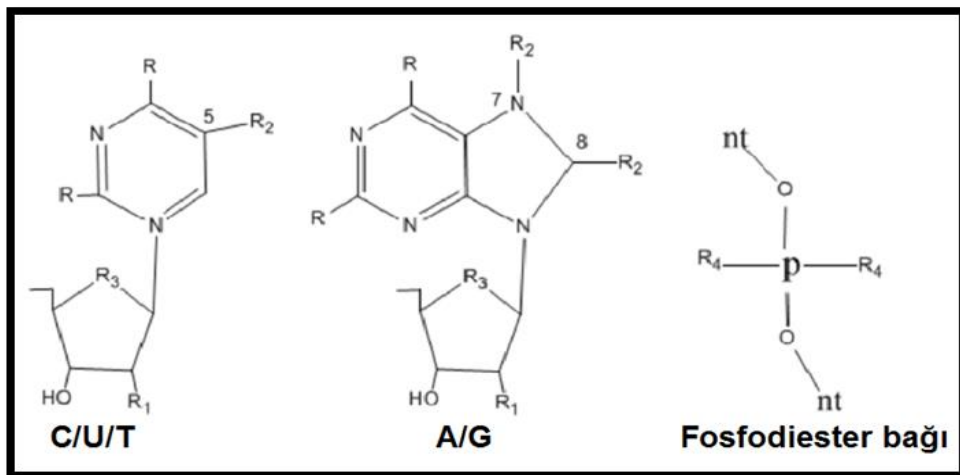


Şekil 2.2. SELEX yöntem basamaklarının şematik gösterimi.

SELEX protokolündeki çeşitlilikler aptamerlerin istenilen özgün özelliklerle birlikte seçilmesini sağlamaktadır. Örneğin Cell-SELEX, hücrenin tümüne karşılık aptamer hedeflenmesinde kullanılmaktadır. Bu teknikle hücre zarı üzerindeki proteinler veya hücre içindeki özgül yapılar hedef olarak alınmaktadır. Özellikle bu yöntem hücreye özgün tanı ve tedavide, hücre hedefli ilaç salınım sistemlerinde yoğun olarak tercih edilmektedir [2]. Toggle-SELEX, alternatif döngülerde benzer hedeflere karşı seçilen daha geniş özgünlüklere sahip aptamerlerin oluşturulması amacıyla kullanılmaktadır [11]. Photo-SELEX tekniğinde, ışığa duyarlı iyot ve brom modifiye edilmiş nükleotitler oligonükleotit kütüphanesinden seçilerek ultraviyole bölgede ışınım yapacak şekilde hedef proteinle kovalent bağ oluştururlar. Reaksiyon sadece aptamer-hedef molekül kompleksinde gerçekleşir [12]. Bu tekniklerin yanı sıra, atomik kuvvet mikroskobu (atomic force microscopy, AFM), elektroforetik hareketlilik kayma analizi (electrophoretic mobility shift assays, EMSA), yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance, SPR) gibi yöntemler de SELEX ile birlikte kullanılmaktadır [2].

2.1.2. Aptamer Modifikasyonu

Aptamerler doğal nükleotitlerden meydana gelmiş tek zincirli DNA veya RNA moleküllerinden seçilmektedirler. Aptamerlerin fonksiyonlarını, afinitelerini ve nükleaz enzimine karşı direncini arttırmak ve farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için farklı modifikasyonlar yapılmaktadır (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Aptamerlerde bulunan nükleositlerin veya fosfodiester bağının modifikasyonlarının şematik gösterimi. (R₁= H, OH, F, OCH₃, NH₂; R₂= Hidrofobik, hidrofilik veya yüklü gruplar; R₃= O, S; R₄= O,S)

Bu modifikasyonlar SELEX işlemleri sırasında, sonrasında ya da tüm SELEX işlemleri boyunca ve sonrasında da olmak üzere uygulanabilir. SELEX süresince uygulanan modifikasyonlar uyumlu bir enzimoloji (T7 RNA polimeraz, ters transkriptaz ve DNA polimeraz) gerektirmektedir. SELEX sonrası uygulanan modifikasyonlarda aptamer fonksiyonlarına zarar verebilecek işlemler özenle gözden geçirilmelidir [13]. Şimdiye kadar riboz monosakkaritinin 2' pozisyonundan, pirimidinin 5 pozisyonundan, pürinlerin 8 pozisyonundan, 2'-deoksipürinlerin 7 pozisyonundan, fosfodiester bağının oksijen molekülünden olmak üzere yaklaşık 100 farklı türde modifikasyon aptamerler için uygulanmaktadır [14]. Aptamerlerin farmakokinetiği nükleaz enzime karşı dirençleri, dokulardaki kavrama ve dağılımları, organizmalarda kan içerisindeki döngülerinin zamanı gibi özelliklerine göre belirlenir. Aptamerlerin modifikasyona uğratılması tedavi ve canlı ortamdaki tanıyı kolaylaştırabilmek için gereklidir. Aptamerlerin modifikasyonunun gerçekleştirilmesinin diğer nedeni, aptamere yeni fonksiyonların kazandırılmasıdır. Proteinler 20 farklı aminoasitten oluşurken, nükleik asitler 4 farklı nükleotitten meydana gelirler. SELEX ve Post-SELEX süresince fonksiyonel grupların sayısını ve nükleik asitlerin karmaşıklığını arttırmak için aminoasit, hidrofobik, hidrofilik, yüklü grupların veya floresans yapan türlerin modifikasyonları uygulanır. Floresans modifikasyonları sinyal veren aptamerler üretebilmek için SELEX işlemi sırasında ve sonrasında uygulanmaktadır. Bu modifikasyonlar için, her sinyal verici aptamerin bir florofor grubu vardır [15]. Aptamerin hedef molekülüne bağlandığında, aptamere bağlı olarak bulunan florofor grubunun yapısal yer değişikliği gerçekleştiğinden floresans şiddeti değişmeye uğrar. Floresans modifikasyonunun diğer çeşidi aptamer işaretlemesi (aptamer beacon) olarak adlandırılır. Bu modifikasyon türünde aptamere bağlanan ligand, florofor grubunu, 5' ve 3' uç gruplarındaki söndürücü grupları kırar. Bu durum floresans şiddetinde artışla sonuçlanır. F, OCH₃, NH₂ modifikasyonları aptamerlerin nükleaz direncini artırır. İnsan serumunda normal RNA aptamerinin yarılanma ömrü saniyeler ya da saatler arasında değişirken, modifiye edilmiş aptamerlerin bu değerleri gün mertebesinde dir. Bu modifikasyonlar nükleaz rezistansını artırmanın yanı sıra, aptamerlerin termal kararlılıklarının artmasına ve kimyasal çeşitliliğinin de artmasına olanak sağlar. Tiyoil modifikasyonları aptamerin nükleaz direncini arttıran bir diğer yoldur [16]. Literatürde, α-trombin aptamerine SELEX sırasında uygulanmış 4'-thioCTP ve 4'-thioUTP tiyoil modifikasyonları verilmiştir [9].

50 pg/ μ L nükleaz enzimi varlığında modifikasyona uğramamış aptamerin yarılanma ömrü 22 dakika iken, modifikasyon gerçekleştirilen tiyoaptamerin yarılanma ömrü 19,5 saattir [17].

2.1.3. Aptamerlerin Antikorlara Göre Üstün Özellikleri

Antikorlar (immünooglobulinler) omurgalıların bağışıklık sistemleri tarafından üretilen ve bakteri, mantar, virüs gibi enfeksiyona sebep olan işgalcilerden korunmayı sağlayan glikoprotein yapılı moleküllerdir. Antikorlar antijenlere özgün olarak bağlanırlar [18]. Antikorlar, moleküler tanımlama için geniş bir uygulama alanı olan en çok bilinen moleküller olarak otuz yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Aptamerler, antikorların zayıf özelliklerini ortadan kaldırarak, geniş kullanım alanıyla antikorların yerini almasıyla bilinmektedirler. Aptamerlerin antikora göre avantajları;

- Aptamerlerin yüksek kararlılıkları: Proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kolaylıkla denatürasyona uğradığı ve üçüncül yapılarını kayb ettikleri bilinmektedir. Oligonükleotitler ise termal olarak daha kararlıdırlar ve tekrar eden denatürasyon/renatürasyona rağmen yapılarını korumaya devam ederler. Bu yüzden, oligonükleotit yapılı aptamerlerin protein yapılı antikora göre en üstün avantajı yüksek sıcaklıklarda kararlı yapıya sahip olmalarıdır. Bunun yanı sıra, aptamerler oda sıcaklığında kararlıdırlar, kararlı olduklarından saklamak için dondurma işlemi gerektirmezler. Böylece, aptamerler geniş bir analiz aralığında kullanılabilirler ve sınırsız raf ömürleri vardır.
- Aptamerlerin üretimi (sentez ve modifikasyon): Monoklonal antikorların belirlenmesi ve üretimi çok zahmetli ve çok sayıda koloninin tarama işlemini gerektirdiğinden oldukça pahalıdır. Bunun yanı sıra, aptamerler seçildikten sonra yüksek kesinlikte ve istenilen miktarda kimyasal reaksiyonlar sayesinde saatler içerisinde sentezlenebilirler. Kimyasal işlemleri, antikorların üretimi için gereken işlemlere göre daha ucuzdur. Kararlılıklarının artırılması için kimyasal reaksiyonlar kullanılarak kolaylıkla modifiye edilebilirler. İstenilen antikorun hazırlanması için canlı bir hayvana ihtiyaç duyulurken, aptamerlerin sentezi SELEX ile canlı vücudu gerektirmeden gerçekleştirilir.

- Aptamerlerin hedef olarak belirlediği ürünlerin çeşitliliği: Aptamerler, iyonlar veya küçük moleküller gibi antikolar tarafından tanınamayan bazı ligandlara karşı yüksek afinite ve özgünlük gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı aptamerler tanıyıcı bileşenler olarak biyosensör uygulamalarında geniş olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında, aptamerlerin non-immünojenik ve zehirli olmayan malzemeler olması dolayısıyla tanı ve tedavi gibi birçok medikal uygulamada kullanıldıkları görülmektedir [2].
- İmmünojenesite (Bağışıklık-sağlayıcılık): Aptamerler, bağışıklık sistemi tarafından yabancı molekül olarak algılanmazlar. Antikorların tersine, negatif bir bağışıklık cevabına sebep olmazlar [19].

2.2. Aptamer Uygulamaları

Aptamerler tıpta teşhis, tanı aracı ve yeni ilaç geliştirilmesi, ilaç salınım sistemlerinde biyohassas malzeme olarak pek çok araştırmada kullanılmaktadır. Kanser, viral enfeksiyonlar gibi farklı türlerdeki hastalıkların özgül tanıyıcıları olarak aptamerlerin kullanılmasını kapsayan çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Geliştirilmiş aptamerlerin uygulamaları öncelikli olarak tanı, tedavi ve analitik yöntemlere yöneliktir. Aptamer uygulamalarının en göze çarpanı 2004 yılında Gıda ve İlaç Dairesi tarafından da onaylanmış, yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastalığı tedavisi için vasküler endotelial büyüme faktörüne (vascular endothelial growth factor, VEGF) özgül aptamerin kullanılmasıdır [20]. Bu gelişmelerden sonra aptamer teknolojisi ile ilgili çalışmaların ve uygulamaların sayısı artmıştır.

2.2.1. Tanı ve Metabolomik Yol Belirleme Uygulamaları

Küçük molekül tayini için aptamer uygulamalarından bazıları tanı ve adli bilim alanlarıdır. Yeni uygulama alanlarından bir tanesine örnek olarak, metabolik yolda önem arz eden S-adenozilhomosistein (SAH) molekülüne monoklonal antikora kıyasla yüksek seçicilik ve afiniteyle bağlanan RNA aptameri verilebilir [21]. SAH molekülü homosisteinin tek kaynağıdır ve kanda ya da serumdaki artışı kardiyovasküler sistem hastalıkları tanısında önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Başka çalışmalarda ise, hücre içi sinyal iletimi metabolik yolunun belirlenmesi için aptamerler özgül inhibitörler olarak kullanılmıştır [22].

2.2.2. Tedavi ve İlaç Salınım Sistemlerinde Uygulamaları

Nükleik asit aptamerlerinin özgünlüğü ve yüksek bağlanma afiniteleri, bağışıklık sistemine zarar vermemeleri, cansız ortamda istenilen hedef molekül için seçimli olarak hazırlanmaları, kan döngüsüne kolaylıkla katılmaları aptamerleri yeni ilaç üretiminde kullanılmak adına güçlü bir aday yapmıştır [22]. Aptamerlerin hücre zarındaki reseptörlere bağlanabilmesi ile ilaç veya diğer çeşitli ürünlerin hücre içine salınımı sağlanabilmektedir. Buna örnek olarak, prostat kanser hücrelerinin içine gönderilen antikanser ilacı doksorubisinin iletiminde aptamer kullanılması verilebilir. İkili aptamer sonda sistemi kullanılarak ilaç yüklenmiş aptamer, prostat kanserinin belirteci olan prostat özgün zar reseptörüne gönderilir ve ilaç etkin olarak kanserli hücre içine salınır [23]. Güncel klinik çalışmalarda, nükleik asit aptamerinin (AS1411) akut myeloid lösemi, Von Willebrand faktörüne özgül aptamerinin (ARC1779) karotis *damar* hastalığı ve trombine özgül aptamerinin (NU172) antikoalügasyona karşı tedavi amacıyla uygulandığı görülmektedir [24].

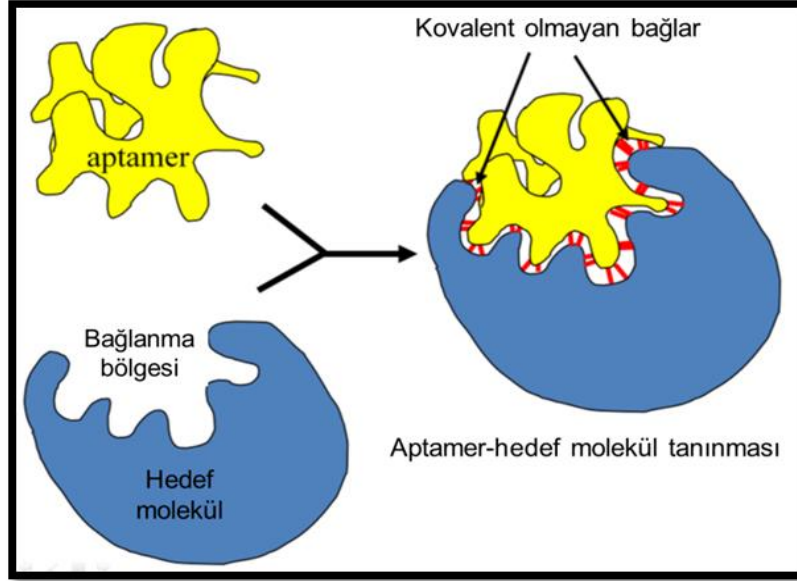
2.2.3. Analitik Uygulamalarda Aptamerlerin Kullanımı

Nükleik asit aptamerlerinin kimyasal olarak sentezlenebilmesinin yanı sıra, çeşitli destek yüzeylerine sabitlenebilir ve denatürasyona karşı dayanıklı olması, aptamerlerin yüksek verimli analitik tekniklerde kullanılabilir olmasını sağlamıştır [22]. Aptasensörler, tanıyıcı element olarak aptamerlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Çalışma ilkelerine göre; elektrokimyasal, optik ve kütleyle duyarlı çeşitleri bulunmaktadır [2]. Aptamer hedefini bağlayıcı kısmından floresans maddeyle modifiye edildiğinde, hedef molekülle etkileşim sırasında bağlanma bölgesindeki floresans değişimi gözlenebilir. Aptamerin 3' ya da 5' uçlarından bu modifikasyonlar gerçekleştirildiğinde, kompleks oluşumunda konformasyonel yeniden yerleşmeler olur. Fiber optik aptasensör uygulamasına örnek olarak, trombinin silika mikro yüzeyler üzerine tutturulmuş floresans yapabilecek şekilde modifiye DNA aptamerinin yer değiştirmesi ile tayin edilme çalışması verilebilir [22]. Aynı zamanda, florofor bir gruba ya da gadolinyum ile modifiye edilmiş aptamerler manyetik rezonans görüntüleme tekniklerinde de kullanılmaktadır. Tek bir proteini görüntülemenin yanı sıra, hücrenin tamamını görüntüleyici ajanlar olarak kullanılmışlardır. 2010 yılında Kim'in grubu; C6 hücreleri için görüntülenme tekniklerini kullanarak, kimyasal olarak modifiye edilmiş aptameri kanser hücrelerinde hedef molekül olan transmembran proteinine daha yüksek afinitede

bağlayarak modifiye aptamerin orijinal aptamere göre üstünlüğünü ispatlamıştır [25]. Hedef proteinleri saflaştırmak için kullanılan, antikor ve antijenin etkileşimine dayalı olarak çalışan genel laboratuvar tekniklerinden birisi immünoafinite kromatografisidir. Antikora göre pek çok avantajı olan aptamerler; afinite de daha seçici olmaları, hedefe özgünlükleri, kararlılıkları, daha küçük boyutta, kolay modifiye ve sabitlenebilir olmaları sayesinde immünoafinite kromatografisinde de uygulanmaktadır. Drolet ve arkadaşları immünoafinite kromatografisinde aptamerleri kullanarak insan L-selektin proteinini saflaştırmışlardır [26]. Le ve arkadaşları, iki aptamer kullanarak sandviç aptamer afinite kromatografisini geliştirerek, trombin proteini için hassasiyeti ve seçimliliği arttırmışlardır [27]. Western Blot analizlerinde, antikor yerine aptamer kullanılması çalışmaları Hah ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Western Blot analizinde iki farklı çeşit antikorun ve çok sayıda belirtecin kullanılması gerekmektedir. Bu analizler için aptamerlerin uygulanması, işlemi sadece bir basamağa indirgeyerek sadece bir aptamer kullanılarak hedef proteinin belirlenmesini sağlar [28].

2.3. Aptamer Hedef Molekül Etkileşimleri

Özgül aptamer hedef molekül bağlanma işleminin anlaşılması için bu etkileşimin biyofiziksel olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu etkileşimlerin çoğunda elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu öngörülmektedir. Hermann ve Westhof [29] aptamer hedef molekülünün bağlanmasında elektrostatik etkileşimlerin yerini belirlemek amacıyla farklı RNA aptameri ve protein çiftlerinin yapılarını karakterize etmişlerdir. Yapılan analizler sonunda hedef protein molekülünün pozitif yüklenmiş kısımlarıyla RNA aptameri kıvrımlarında elektronegatif paket gruplarının etkileştiğini bulmuşlardır. Bunun yanı sıra, Cowan ve arkadaşları [30] 23 baz gruplu özgün RNA aptameri ve onun aminoglikozit ligandı [29] arasındaki elektrostatik etkileşimleri, hidrojen bağı etkileşimleri ile kıyaslamak için izotermal titrasyon kalorimetrisi kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmalar, bağlanma enerjilerinin % 80'i hidrojen bağına ait olduğunu ve aptamerlerin nasıl seçici olarak ligandına bağlandığını göstermektedir. Diğer moleküller arası kuvvetler, aromatik halka istiflenmesi, van der Waals ve şekil uygunluğu bu etkileşimlerin gerçekleşmesinde rol almaktadır [22]. Şekil 2.4.'te aptamer-hedef molekül tanınması şematik olarak gösterilmiştir.



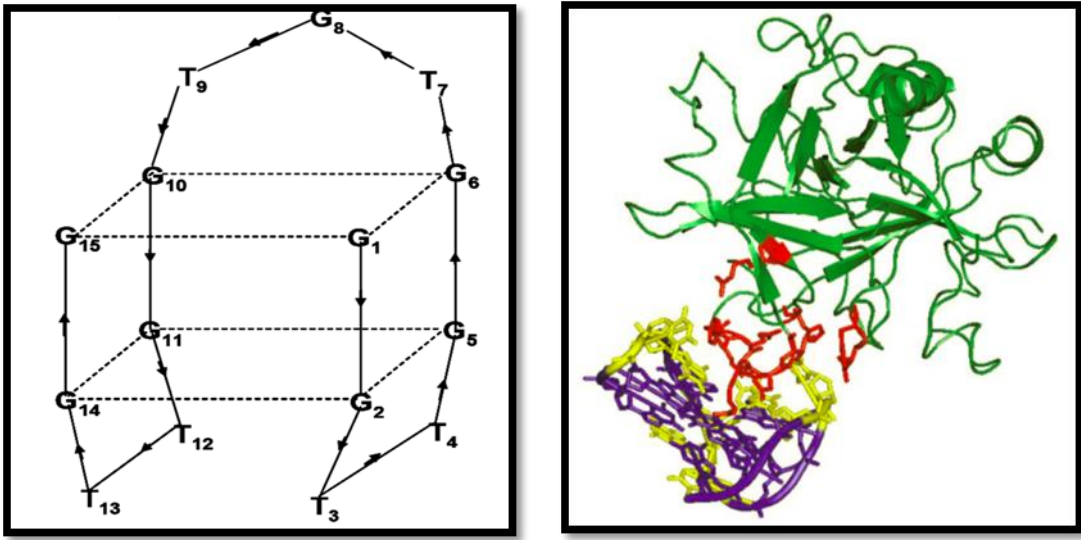
Şekil 2.4. Aptamer-hedef molekül etkileşiminin şematik gösterimi.

Aptamerler DNA ve RNA sekans havuzlarından metal iyonları (Zn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2}), nükleotit ve kofaktörler (adenin, guanin, biotin), aminoasitler (arginin, triptofan, histidin), antibiyotikler (neomisin, kanamisin), organik boyalar (sibakron mavisi, malehit yeşili), karbonhidratlar (selüloz, kitin), yağlar (kolik asitler), proteinler (lizozim, α -trombin, interferon γ), peptitler (vazopresin, anjiyotensin) ve bazı küçük organik moleküller (kokain, etanolamin) gibi çeşitli hedef moleküllere seçici bir şekilde bağlanma özelliklerine göre seçilirler [31]. Hedef ligandın büyük bir kısmı özgün aptameri tarafından çevrelenir. Aptamerin üç boyutlu kıvrımlı yapısı, özgünlük ve afinite ile çok fazla seçimli etkileşim sağlayarak, moleküler tanımlayıcı olarak görev yapar [32]. Aptamerlerin bağlanma afiniteleri genellikle liganda bağlıdır ve çeşitli protein hedefleri için pikomolarla (1×10^{-12} M) yüksek nanomolar (1×10^{-9} M) aralığında değişir. Hedef molekülü küçük organikler olarak belirlendiğinde, ayrışma sabiti beklendiği gibi az sayıda etkileşim sonucu, (genellikle mikromolar) yüksektir. Her durumda, etkileşimler özgündür ve aptamerler çok benzer bileşiklerini birbirlerinin arasından bile ayrılabilirler [33].

2.3.1. Trombin Aptameri ve Hedef Molekülü Trombin Proteini Etkileşimi

1992 yılında Bock ve arkadaşları aptamerleri izole etmiş ve o günden bu yana aptamerlerin yapısının aydınlatılması, bağlanma özelliklerinin ve bağlanmanın gerçekleştirilmesi için gereken şartların ayarlanması, tıp alanında teşhis ve tedavi uygulamaları gibi pek çok konuda aptamer araştırmaları gerçekleştirilmiştir [34].

Trombin proteininin izoelektronik noktası 7,5'tir, lizin ve arginin bakımından zengin olan iki tane önemli bağlanma noktası (egzosit) bulundurmaktadır. Egzosit 1 olarak adlandırılan kısmı fibrinojen bağlanan, egzosit 2 kısmı ise heparin bağlanan kısımdır. Tek zincirli DNA yapısında ve temel dizilimi 5'- GGT TGG TGT GGT TGG -3' olan trombin aptameri SELEX metodu ile sentezlenir. Trombin aptameri kararlı, istifli, G-kuadruplex yapıya sahiptir ve bir yüzeye tutturulduğunda da bir bütün halinde yapısı bozulmadan kalır. Bazı diğer aptamerlerin aksine, trombin aptameri trombine bağlandığında aptamer yapısı değişmez. Şekil 2.5.'te trombin aptamerinin şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.5. Trombin aptamerinin şematik gösterimleri.

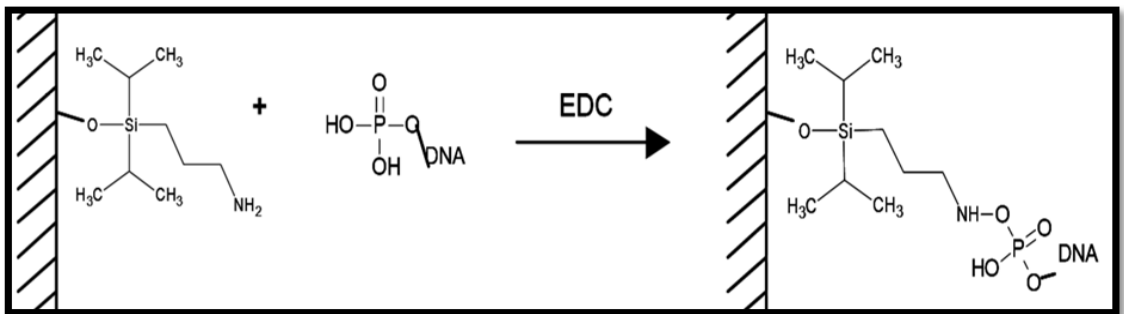
Trombin aptameri yapısının alt kısmında bulunan TT döngülerinin trombine 1 numaralı ekzositten yerleşerek trombine olan özgün bağlanmayı sağladığı bilinmektedir. İki farklı trombin molekülüne bağlanan trombin aptamerinin X ışınları kristalografisi ile yapısı incelendiğinde etkileşimin birisi için TT döngülerinden, diğeri için ise TGT döngüsü ile sonlanan kısımdan gerçekleştiği belirlenmiştir. Tsiang ve arkadaşları trombinin 1 nolu ekzosit bölgesinin dışında özgül bir bağlanma olmadığını, DNA trombin aptamerinin trombine seçici ve trombine yüksek afinite ile bağlandığını bulmuşlardır. Potyrailo ve arkadaşları aptamerin diğer proteaz proteinlerine bağlanmadığını göstermişlerdir. Rye ve Nustad, yüksek derişimlerde sığır serum albümini ve IgG proteinlerinin bulunduğu karışık bir ortamda bile trombin aptamerinin trombin proteinine özgül olarak bağlandığını bulmuştur. Bunun yanında dizilimi karıştırılmış trombin aptameri (5'- GGT GGT TGT TGT GGT -3') trombin proteinine bağlanma göstermemiştir [35].

2.4. Aptamer İmmobilizasyonunun Kimyası

Aptamerlerin immobilizasyonu (sabitlenmesi) için uygulanan pek çok yöntem bulunmaktadır ve bu yöntemlerin temeli daha önceden DNA hibritleri ve biyomoleküller için geliştirilmiş tekniklere dayanmaktadır [36]. Aptamerlerin işaretlenmelerinin ve hazırlanmalarının kolay oluşu, kararlı olmaları, immobilizasyon teknikleri için avantajlıdır. Bu sebeple, aptamerler iyi geliştirilmiş DNA veya RNA sensör teknolojilerinde geri dönüşümlü aptasensörler olarak kullanılmaktadır [37]. Aptamerlerin katı yüzeylere bağlanıp sabit edilmesi için temelde kullanılan iki teknik; kovalent bağlanma ve afinite bağlanmadır [35]. Aptamerler altın, silikat veya işlevsel olarak modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde sabit edilebilirler.

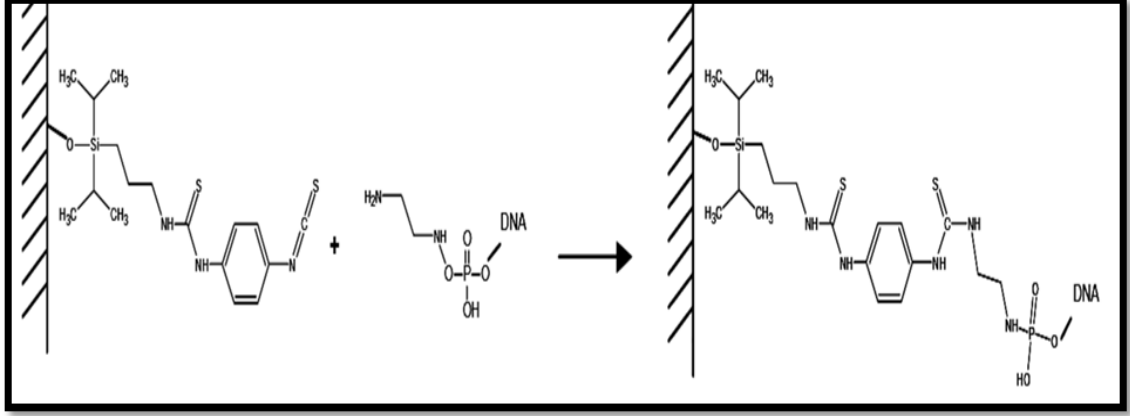
***Silikat ve silisyum alt-tabakalara aptamer immobilizasyonu:**

Aptamerlerin silika yüzeye bağlanarak sabitlenebilmesi için öncelikle silika yüzeyin amin veya karboksil fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmesi gerekmektedir. Böylece aptamerler modifiye edilmiş yüzeylere amit ya da fosforamid üzerinden kovalent olarak bağlanabilirler. Silika yüzeyin tek tabakalı veya üç boyutlu kaplama olması silanizasyon gerçekleştirilirken kullanılan bileşenlerin monosiloksi siloksan veya trisiloksi siloksan olmasına göre değişir. Amin fonksiyonel grubu modifiye edilmiş yüzeylere aptamerin bağlanması fosforamid ya da tiyoamid bağ oluşumu ile gerçekleşir. Fosforamid üzerinden bağlanmada aptamere bağlı olan bir fosfat grubu bulunmalı ve protein çapraz bağlayıcı olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) kullanılmalıdır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Fosforamidit üzerinden bağlanma gerçekleşirken EDC çapraz bağlayıcısının kullanılması.

Tiyoamit üzerinden bağlanma gerçekleşirken 1,4-fenilen diizosiyanat (PDC) çapraz bağlayıcısı kullanılması (Şekil 2.7.) ve aptamerin ucuna eklenmiş amin grubu modifikasyonu gerekmektedir [38].



Şekil 2.7. Tiyoamit üzerinden bağlanma gerçekleşirken PDC çapraz bağlayıcısının kullanılması.

Silikatlar; cam parçacıklar, kapiler tüpler, silika jel veya kürecikler gibi şekillerde elde edilebilirler ve kolayca bulunabilirler. Düşük fiyatta olmalarına ve yaygın kullanılabilirliklerine ek olarak, silikat yüzeyler ayrıca spektroskopik sinyal kazanımı için optik şeffaflık avantajı sağlamaktadırlar [39].

***Altın yüzeylere aptamer immobilizasyonu:**

Aptamerlerin altın yüzeylere bağlanma yöntemleri genellikle, altın filmler üzerinde tiyolün kemisorpsiyonuyla oluşturulmuş diğer biyolojik olmayan tek tabakalı yüzeyleri takip eder. Altın yüzey üzerinde kendiliğinden biraraya gelmiş tek tabakalı (self-assembled monolayer, SAM) yüzey oluşturmak için tiyol uçlu bir aptamer kullanılabilir [40]. Temiz bir altın substrat kullanılarak, tiyol uçlu aptamerin sıvı tampon çözeltisine batırılmasıyla altın yüzey üzerinde tek tabaka oluşturur. Altın yüzey düzlemsel bir substrat olabilir, bu yüzeyler yüzey plazmon rezonans [36] ya da kuvars kristal mikrodenge (QCM), sensörler [41] ve elipsometride [36] kullanılıp analiz edilebilirler. Substrat olarak altın kullanılması; yüzey üzerine moleküllerin immobilizasyonlarının kolay olması, tek tabaka oluşturabilme yeteneği ve tek tabakaların oldukça düzenli yapıya sahip olması gibi pek çok avantaja sahiptir [40]. Son zamanlarda altın nanoparçacıklar üzerinde tek tabaka oluşumuyla ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır [42]. Literatürde, sensör yüzeyinin modifiye edilmesi ve biyotin aptamerinin altın yüzeye immobilizasyonu ile trombin tayin edilmesi çalışması yapılmıştır. Kuvars kristalinin altın yüzeyleri, trombin

aptameri yüzeye sabitlenerek modifiye edilmiştir. Tombelli ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tiyol/dekstran/streptavidin ile modifiye edilmiş olan altın sensör yüzeyine biyotin-streptavidin etkileşimlerine dayanarak biyotinlenmiş aptamer bağlanmıştır[43]. Bunun yanında, trombin tayini için altın-tiyol bağları etkileşimine dayanarak kimyasal absorpsiyon ile tiyollenmiş aptamer sensör yüzeyi üzerine sabit edilmiştir [44].

*Katı destek yüzeylerine aptamer immobilizasyonu:

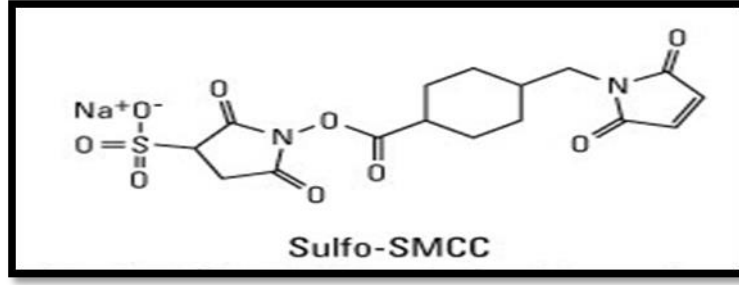
Aptamerlerin yüzeye bağlanması için yüzeylerin işlevsel olarak modifiye edilmiş olması gerekmektedir. Yüzeyin işlevselleştirilme yönteminin seçilmesi, aptamerin hangi çeşit uç fonksiyonel grubu içerdiğine bağlıdır. Biyotin uçlu aptamerler, avidin ve türevinin sabitlendiği işlevsel yüzeyler üzerine bağlanabilirler. Yüzey bağlamasında en sık kullanılan gruplar hidroksil, amin ve karboksilik asit gruplarıdır. Amin veya tiyol uçlu aptamerlerin kovalent bağlanması, biyomoleküllerin daha önceden benzer uygulamalarda kullanılan metotlar yardımıyla geliştirilmiştir. Immobilizasyon yöntemlerinin çoğu ve reaksiyon yolları Şekil 2.8.'de yer almaktadır [36]. Hidroksil içeren yüzeyler 1,1' - karbonildiimidazol (CDI) ile modifiye edilerek reaktif bir ara ürün oluştururlar. Böylece amin uçlu aptamer gruplarıyla kararlı bir kabamat bağı oluşturulur [41]. Amin uçlu yüzeyler, aptamer bağlanması için pek çok yenilik sağlarlar. Bunun örneklerinden biri, amin gruplu yüzeyin simetrik biyofonksiyonel dialdehid bağlayıcı olan glutaraldehid ve aldehid ile bir imin bağı oluşturması, kimyasal süreçlerin amin uçlu aptamer gruplarıyla devam edebilmesi için diğer aldehidi serbest bırakması olarak verilebilir [45]. Simetrik diazotiyosiyanatlar amin bağlı yüzeylerin hem tiyol uçlu hem de amin uçlu aptamerlere bağlanmasında biyofonksiyonel bağlayıcılar olarak kullanılabilirler [39].

2.5. Biyokonjugasyon Kimyası ve Çapraz Bağlayıcılar

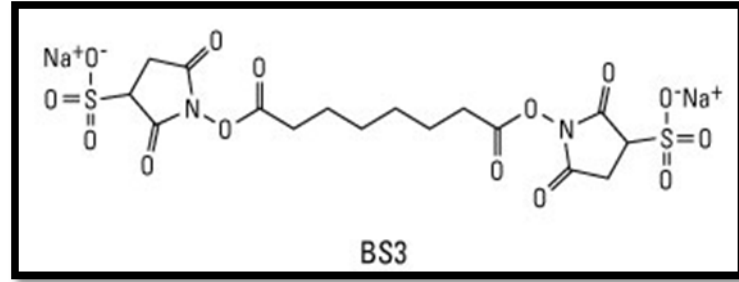
Biyokonjugasyon, her bir bileşenin kendi özelliklerinin birleşimine sahip, iki ya da daha fazla molekülün birleşerek yeni bir kompleksi oluşturmasıdır. Bireysel aktiviteleriyle beraber doğal ya da sentetik bileşikler, özgün maddelerin oluşturmak için kimyasal olarak birleştirilebilirler. Kompleks bir karışımda hedefi ayırt ederek bağlanabilen protein, başka bir molekülle çapraz bağlanabilir ve tayin edilebilmeleri için izlenebilir eşlenik oluşturabilir. Algılama bileşeni hedef bileşen için görünürlük sağlar çünkü yeri belirlenebilir kompleks oluşturur. Çapraz bağlı ve modifiye edilmiş kimyasallar, peptit ve proteinlerin, şeker ve polisakkaritlerin, nükleik asit ve oligonükleotitlerin, yağların ve kimyasal olarak türevlendirilebilen diğer düşünülebilir bütün moleküllerin doğal hallerini ve fonksiyonlarını değiştirmek için uygulanabilirler. Dikkatli modifikasyonlar ve konjugasyon stratejileri ile proteinlerin yapıları ve işlevleri incelenebilir, aktif bölge konformasyonu keşfedilebilir ya da reseptör-ligand etkileşimleri açıklanabilir. Biyokonjüge reaktifler; sıfır uzaklıklı çapraz bağlayıcılar, homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar, heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar, trifonksiyonel çapraz bağlayıcılar gibi çeşitli gruplara ayrılır [46].

Sülfo-SMCC ve BS³ Çapraz Bağlayıcıları:

Süksinimidil-4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksilat (SMCC) ve onun suda çözünebilen benzeri olan Sülfo-Süksinimidil-4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksilat (Sulfo-SMCC) (Şekil 2.9.), amin ve sülfidril içeren moleküllerin kovalent konjugasyonuna izin veren N-hidroksisüksinimid (NHS) ester ve maleimid gruplar içeren heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılardır. Bis(sülfosüksinimidil süberat) (BS³) (Şekil 2.10) molekülü de NHS esteridir ve birincil aminler ile pH 7-9 aralığında kararlı amin bağları oluştururan homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcıdır.



Şekil 2.9. Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısının yapısı.

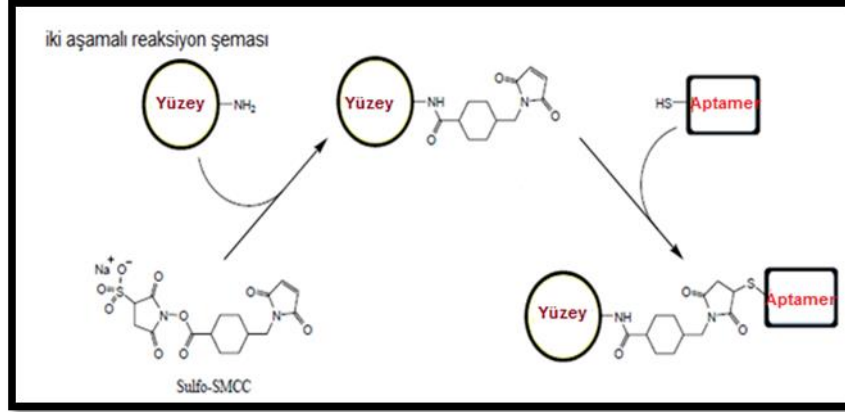


Şekil 2.10. BS³ çapraz bağlayıcısının yapısı.

Sülfö SMCC, NHS esterleri birincil aminler ile pH 7-9 arasında reaksiyona girerek amit bağları oluştururlar. Bu sırada maleimidler sülfidril gruplarıyla pH 6,5-7,5' te reaksiyona girerler ve kararlı tiyoeter bağları oluştururlar. Sulu çözeltilerde NHS esteri hidrolitik bozunması, hızın pH ile arttığı, yarışmalı reaksiyondur. Maleimid grup'u NHS-ester grubuna göre daha karardır fakat pH değerleri > 7,5 olduğunda yavaşça hidroliz olur ve sülfidril için reaksiyon özgünlüğünü kaybederler. Bu sebeple bu çapraz bağlayıcılarla konjugasyon genellikle pH 7,2-7,5' ta gerçekleştirilir ki NHS-ester (amin hedefli) reaksiyonu, maleimid reaksiyonundan (sülfidril hedefli) önce ve ardarda olur. Bu reaktiflerdeki sikloheksan halkası, bu halkayı içermeyen diğer benzer reaktiflere göre maleimid gruplarının hidroliz hızını düşürür. Bu özellik, SMCC veya Sulfo-SMCC ile daha önceden maleimid aktive edilmiş proteinlerin, sülfidril içeren moleküllerin sonraki konjugasyonu için, liyofilize edilmesini ve saklanmasını sağlar. Birçok maleimid aktive edilmiş protein ürünleri bu şekilde üretilir. SMCC ve Sulfo-SMCC sıklıkla antikor-enzim ve hepten taşıyıcı protein konjugasyonları hazırlama için iki aşamalı reaksiyonlarda kullanılır. İlk olarak, amin içeren protein, bir kaç kat molar fazlalıkta çapraz bağlayıcı ile reaksiyona girer ve ardından reaksiyona girmemiş fazla reaktif, diyaliz ile ya da

tuzdan arındırma ile uzaklaştırılır. Son olarak, sülfidril içeren molekül eklenir ve birinci proteine önceden bağlanmış maleimid gruplarıyla reaksiyona girer.

Sulfo-SMCC suda ve yaklaşık 10 mM' a kadar sulu tampon çözeltilerde çözünebilir fakat çözünürlük artan tuz derişimiyle azalır [47]. Şekil 2.11'de heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcı olan Sülfö-SMCC'nin aptamer ile yüzey arasındaki kurduğu bağ şematik olarak incelenebilir.



Şekil 2.11. Sülfö-SMCC'nin yüzey-aptamer bağlanmasındaki rolü.

2.6. Aptamerlerin Yüzeye 3' ve 5' Uçları Üzerinden Bağlanması

Aptamerlerin 3' ve 5' uçlarında hidroksil ve fosfat grupları bulunmaktadır. Tiyol fonksiyonel grup modifikasyonlu aptamerler göz önünde bulundurulduğunda, aptamerlerin uç gruplarındaki verimin, 5' ucu 3' ucundan daha geniş olduğundan aynı değildir [37]. Bağlayıcı ve fonksiyonel grup ucu katı destek yüzeye aptamerin 5'-ucu ya da 3'-ucundan bağlanabilir. Literatürde, iki pozisyonda aptasensör geliştirmede kullanılmaktadır. Buna rağmen, sadece birkaç çalışmada bu iki çeşit uç çalışabilirliğine değinilmiştir [33]. Trombin, lizozim, IgE ve risin (toksik bir protein) için biyotin uçlu aptamerlerde bu etki incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki, bu etki aptamere özgü olarak değişmektedir. Anti-lizozim ve anti-IgE aptamerleri 3'-ucundan immobilizasyonu takiben 14–30% daha fazla duyarlılık göstermektedirler. Anti-risin ve anti-trombin aptamerleri ise 5'- ucundan immobilizasyonu takiben 26–28% daha fazla duyarlılık göstermektedirler.

2.7. Kütle Spektrometrisi

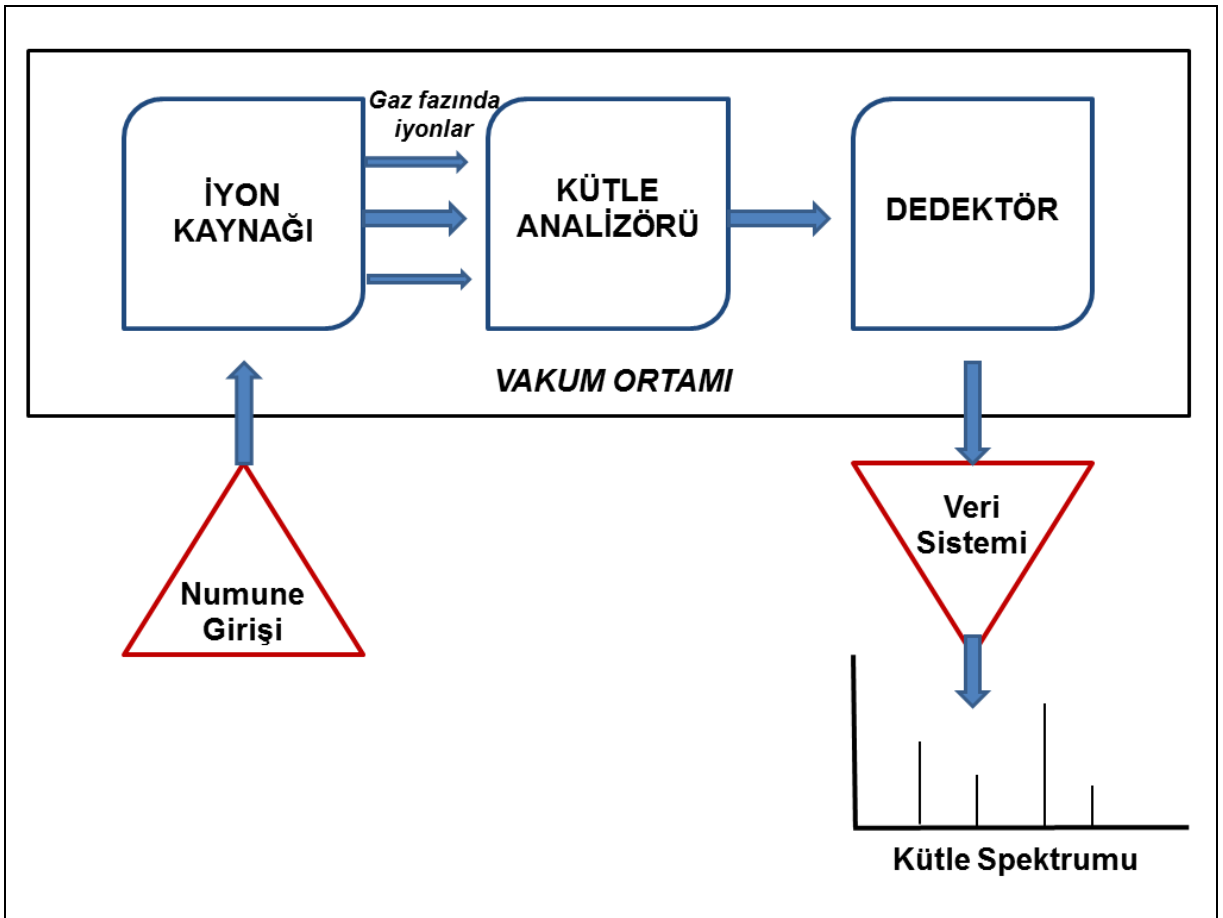
Kütle spektrometrisi kullanılarak atom veya moleküllerden gaz fazında iyonların oluşturulması ve bu iyonların kütlelerine göre birbirinden ayrılması sağlanır. Kütle spektrumları, oluşan iyonların bağıl miktarlarının (kütle/yük) oranına göre elde edilir [48]. Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için, o maddenin vakum altında gaz fazına geçirilmesi ve sonrasında iyonlaştırılması gerekmektedir. Kütle spektrometrisindeki en dikkat edilmesi gereken parametrelerden biri analiz sırasında yüksek vakum kullanılması (en az 1×10^{-5} Pa) zorunluluğudur. Bu vakum sayesinde oluşan iyonlar ve hava molekülleri arasındaki çarpışmalar engellenmektedir. İyonlaştırma, kütle spektrometrisinde bulunan ve en önemli bileşenlerden biri olan iyon kaynağında gerçekleştirilir. Gaz fazında iyonlaştırılan bu iyonlar kütle ayırıcısı olarak adlandırılan diğer kısımda kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır ve alınan sinyaller dedektörden bilgisayara aktarılır, kütle spektrumu olarak kaydedilir [49].

Sir Joseph J. Thomson (1856–1940) tarafından gerçekleştirilen negatif yüklü katot ışın parçacıklarının (1897) ve pozitif ışınların (1913) parabol kütle spektrografı ile [50] analiz edilmesi çalışmalarını kütle spektrometrisinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. 1918 yılında Arthur J. Dempster elektron iyonlaştırma ve termal iyonlaştırma konularında çalışmalarını sürdürerek ilk spektrometriyi geliştirmiştir [51]. 1920'lerde Francis Aston hız odaklı ilk kütle spektrometrisini geliştirmiş [52] ve izotoplar hakkında çalışmalar yapmış, kütle kusurlarını ölçerek [53] kütle spektrometrisi ile ilgili gelişmelere büyük katkı sağlamıştır. 1950'li yıllardan günümüze dek pek çok bilim insanının katkılarıyla kütle spektrometrisi son derece hızlı bir şekilde değişmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Örneğin türü ve analiz özelliklerine göre kimya, biyokimya, eczacılık, tıp gibi çeşitli alanlarda gerekli analitik bir araç haline gelmiştir. Bilinmeyen örneklerin yapı aydınlatılması, adli ve çevre bilimleri ile ilgili analizler, ilaçların kalite kontrolü, besinler ve polimerler gibi pek çok farklı alanlarda araştırmalar kütle spektrometrisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir [54]. Birçok farklı uygulama alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmakta olan kütle spektrometrisinden bazıları sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi ayırma yöntemleriyle de birleştirilerek çok daha etkin analizlerin yapılması sağlanmaktadır [55]. Ard arda dizilen kütle spektrometrisinden oluşan ardışık kütle spektrometrisi (Tandem

Mass Spectrometry, MSⁿ) kullanılarak elde edilen kütle spektrumu yorumlanarak moleküllerin yapısal özellikleri hakkında detaylı bilgiler elde edilebilir. Ardışık MS kullanılarak proteinlerin, oligonükleotitlerin, oligosakkaritlerin dizilimlerini belirlemek günümüzde artık mümkündür.

2.7.1. Bir Kütle Spektrometresinin Bileşenleri

Kütle spektrometrisinin temel bileşenleri Şekil 2.12.'de şematik olarak gösterilmektedir. Tüm kütle spektrometrisi cihazlarında numune girişi, vakum sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri sistemi bulunmaktadır.



Şekil 2.12. Kütle spektrometrisinin temel bileşenlerinin şematik olarak gösterimi.

2.7.1.1. Örnek Giriş Sistemi

Örneği iyon kaynağına transfer eder. Örnek moleküllerinin atmosferik basınçtan iyon kaynağındaki yüksek vakuma transfer edilmesi sırasında basınç problemlerinin ortadan kaldırılması gerekmektedir.

2.7.1.2.Vakum Sistemi

Kütle spektrometrik çalışmalar yüksek verimli vakum pompaları ile sağlanan 10^{-5} ile 10^{-7} Torr basınç altında gerçekleştirilmelidir [56]. Düşük basıncın kullanılması, moleküller ve iyonların reaksiyonunu en aza indirir ve oluşturulan iyonların tespitini, kararlılığını sağlar.

2.7.1.3. İyon Kaynakları

İyon kaynağına yüksüz halde gelen örnek, burada iyonlaştırılır ve kütle analizörüne gönderilir. İyon kaynakları, çalışılacak örneğin türüne ve analiz özelliklerine göre değişmektedir [57]. Örneğin iyonlaştırılması, genel olarak tüm kütle spektrometrik cihazlarla gerçekleştirilen analizler için en kritik ve zorlayıcı basamaktır. Kütle spektrometrisi kullanılarak gerçekleştirilen analizin başarısı, iyonlaştırma basamağında yüksüz bir bileşiğin gaz fazında iyonik türlere dönüştürülmesine bağlıdır. Bu basamakta dikkat edilmesi gereken noktalar iyonlaşma sırasında aktarılan iç enerji ve analitin fizikokimyasal özellikleridir [58]. İyonlaştırma teknikleri temel olarak Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

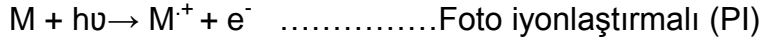
Çizelge 2.1. Kütle spektrometrik cihazlar için iyonlaştırma türleri.

Atomik İyonlaştırma	Moleküler İyonlaştırma	
	Örnek Çeşidi	İyonlaştırma Türü
Termal İyonlaştırma	Gaz	Elektron Bombardımanlı
Kıvılcım Kaynağı	Gaz	Kimyasal İyonlaştırma
İndüktif Eşleşmiş Plazma	Gaz	Foto İyonlaştırma
Yük Boşalması	Gaz	Alan İyonlaştırma
Rezonans İyonlaştırma	Gaz	Yarı Kararlı Atom Bombardımanlı
	Çözelti	Termosprey
	Çözelti	Elektrosprey
	Çözelti	Atmosferik Basınç Kimyasal
	Çözelti	Atmosferik Basınç Fotoiyonlaştırmalı
	Katı	Plazma Desorpsiyon
	Katı	Alan Desorpsiyon
	Katı	İkincil İyon-MS
	Katı	Hızlı Atom Bombardımanlı
	Katı	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon

İyon kaynakları gaz faz, sıvı faz ve katı faz iyon kaynakları olarak üç başlık altında incelenebilir. Gaz faz iyon kaynaklarında ilk olarak örnek buharlaştırılır ve daha sonra iyonlaştırılır [57]. Elektron bombardımanlı (EI) iyon kaynağında yayılan elektronlar, buharlaştırılmış örnek molekülünden elektron koparır [59].



Kimyasal iyonlaştırmalı (CI) iyon kaynağında örnek molekülleri reaktif bir gaz ile çarpıştırılır [60]. Pozitif iyonlu, yük değiştirmeli ve negatif iyonlu olmak üzere farklı yöntemleri bulunmaktadır. Foto iyonlaştırmalı (PI) iyon kaynağında ise, elektronunun bağlanma enerjisinden daha fazla enerjideki fotonlar, gaz halindeki örnek molekülünden elektron koparır [61].



Alan İyonlaştırma tekniğinde ise, gaz halindeki örnek molekülleri yüksek elektrik alana maruz bırakılırlar [62] . Genel olarak gaz fazı iyon kaynaklarının kullanımı, yeterince uçucu ve termal olarak kararlı türlerle sınırlıdır. Bileşiklerin büyük bir kısmı termal olarak değişkendir ve yeterli buhar basıncına sahip değildirler. Bu bileşiklerin molekülleri, direk olarak yoğunlaşmış hallerinden gaz faza ekstrakte edilmek zorundadırlar. Sıvı-faz iyon kaynaklarında analit çözelti halinde bulunmaktadır. Çözelti damlacıklar halinde sisleştirilerek kaynağa verilir, iyonlar atmosferik basınç altında üretilir ve bazı vakum aşamalarıyla kütle spektrometrisine odaklandırılır. Elektrosprey iyonlaştırma (EI), atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaştırma ve atmosferik basınçlı fotoiyonlaştırma kaynakları bu tür iyonlaştırma kaynağı örnekleridir. Katı-faz iyon kaynaklarında, analit uçucu olamayan katman halindedir. Çok çeşitli örnek hazırlama yöntemleriyle, katı ya da viskoz sıvı olabilen matriks yardımıyla elde edilirler. Bu katman, daha sonra enerjik parçacıklarla veya katmanın yüzeyinin yakınlarındaki iyonu desorbe eden fotonlarla uyarılır. İyonlar, elektrik alan tarafından ekstrakte edilebilirler ve analizöre doğru odaklandırılırlar. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon (MALDI), ikincil iyon (SI), plazma desorpsiyon (PD) ve alan desorpsiyon (FD) kaynaklarının hepsi bu stratejiyi kullanarak iyon üretirler. Hızlı atom bombardımanlı iyon kaynaklarında uçucu olamayan sıvı matriks kullanır. Temelde iyon kaynakları iyonları, nötral molekülleri gaz fazında iyonlaştırarak, elektron fırlatma, elektron

yakalama, protonlanma, proton uzaklaştırma, iyon katılımı ile iyon oluşturma veya yüklü türlerin yoğunlaştırılmış fazdan gaz faza transferleri üzerinden üretirler. İyonlaştırma işlemi, sıklıkla, gaz-faz iyon-molekül reaksiyonlarını içerir [58].

2.7.1.4. Kütle Ayırıcıları

Kütle ayırıcıları, iyon kaynağında oluşan iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırırlar. Bütün kütle analizörleri, yalnız ya da birleştirilmiş, statik ya da dinamik elektriksel ve manyetik alan (B) kullanırlar. Kütle analizörlerinin yaygın türleri arasındaki temel farklılıklar, ayırmayı sağlamak için kullanılan alanlardaki şartlardan kaynaklanır [58]. Kütle spektrometrik cihazlardaki kütle ayırıcı türleri Çizelge 2.2.'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. Kütle spektrometrik cihazlardaki kütle ayırıcı türleri.

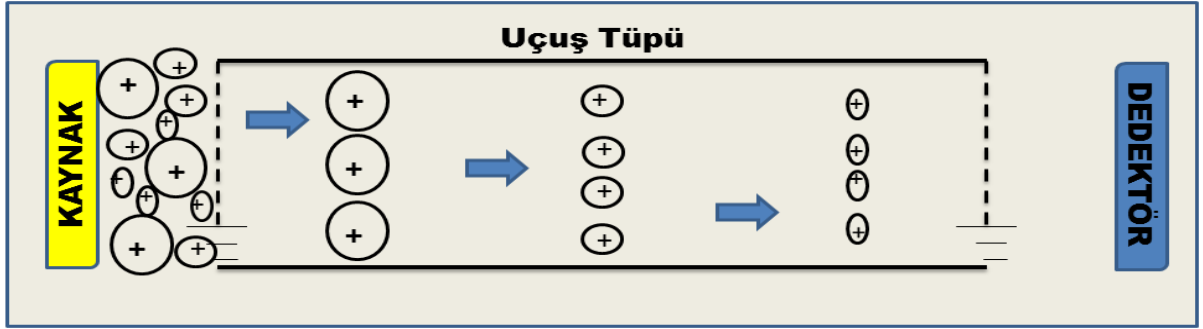
Kütle Ayırıcı Türleri	Sembol	Ayırma prensibi
Elektriksel Alan	E veya ESA	Kinetik enerji
Manyetik Alan	B	Momentum
Dört kutuplu	Q	m/z (alan kararlılığı)
İyon tuzaklı	IT	m/z (rezonans frekansı)
Uçuş zamanlı	TOF	hız (uçuş zamanı)
Fourier dönüşümlü orbitrap	FT-OT	m/z (rezonans frekansı)
Fourier dönüşümlü iyonsiklotron rezonans	FTICR	m/z (rezonans frekansı)

Manyetik (B) veya elektriksel (E) alanlı ayırıcılarda yüksek ayırma gücünde ölçümler alınabilmektedir. Vakum altında ayırıcıya gelen hızlandırılmış iyonlar, kütle farkı gözetmeksizin yaklaşık olarak aynı kinetik enerjiye sahiptir. Bu iyonlar manyetik alana girdiklerinde doğrusal olan yoldan sapar ve dairesel bir yol izleyerek merkezkaç kuvvetinin etkisi altında kalırlar. Dedektöre ulaşan dairesel yolun yarıçapı değişmediğinden, farklı m/z oranlarındaki iyonlar bu yolu izleyerek dedektöre ulaşırlar. Kütle spektrumunda daha büyük ayırıcılıkla pikler elde edilmesi istendiğinde, iyonlar manyetik ayırıcıya girmeden önce elektriksel bir ayırıcıdan geçirilerek kinetik enerjilerinin tam olarak aynı olması sağlanır [62]. İyon tuzaklı (IT) kütle ayırıcıları, yüklü iyonları tuzaklı bir bölgede tutup hareketlerini zamana göre belirleyebilme prensibine göre çalışır. İyonların hareketi üçlü elektrot yapısının kenarları etrafında oluşturulan elektriksel alanın zamana bağlı değişimi ile kontrol edilir. Kütle spektrumu, uygulanan radyo frekansının değişimi ile iyonların bu tuzaklı alandan sıralı olarak fırlatılması sonrasında elde edilmektedir [61]. İyonsiklotron rezonanslı kütle ayırıcısında, iyonlar hızlandırıcıdan çıktıktan sonra ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alana ve hem iyonların ilerleme yönüne hem de uygulanan manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alana maruz bırakılırlar. Ayırma gücü yüksek olan bir kütle ayırıcısıdır.

Dört kutuplu (Q) kütle ayırıcısında, birbirlerine paralel şekilde konumlandırılmış dört adet metal çubuk bulunmaktadır ve iyonlar bu çubuklara uygulanan elektriksel alandaki kararlılıklarına göre ayrılırlar [58]. Karşılıklı konumdaki çubuklar birbirleri ile elektriksel bir ilişki içerisindedir. Radyo frekansı bu çubuklar arasına uygulandığında bir potansiyel fark ve özel bir titreşim alanı oluşturulur. İyonların dedektöre yönlendirilmesi sağlanır [48]. Belirli kütle/yük oranlarına sahip olan iyonlar verilen voltaj değerlerinde dedektöre ulaşırken, diğer iyonlar kararlı olmayan bir yörüngeye sahiptirler ve metal çubuklarla çarpışırlar [58].

Uçuş zamanlı (TOF) kütle ayırıcısı için temel prensip, farklı kütlelerdeki iyonların vakum altındaki uçuş hızlarının farklılığıdır. Eşit kinetik enerjiye sahip iyonlar farklı kütlelerde iseler, farklı hızlara sahiptirler. Hızları farklı olan eşit kinetik enerjiye sahip olan iyonlar vakumda bulunan bir uçuş tüpünün sonunda bulunan detektöre farklı zamanlarda ulaşırlar. Bu süre uçuş zamanı olarak adlandırılır. Uçuş zamanı değeri ölçülerek farklı kütle/yük oranına sahip iyonlar tayin edilir. Küçük mol

kütlesine sahip olan iyonlar büyük iyonlara göre daha hızlıdır. Şekil 2.13'te uçuş tüpündeki iyonların hareketi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.13. Uçuş tüpündeki iyonların hareketinin şematik olarak gösterimi.

Bir kütle ayırıcısının performansı kütle aralığı, ayırıcılığı, etkinliği, kütle kesinliği, lineer dinamik aralığı, hızı, hassasiyeti ve uyumluluğu gibi kriterlerin göz önünde bulundurulmasıyla belirlenir.

2.7.1.5. Kütle Dedektörleri

Kütle ayırıcısında kütle/yük oranlarına göre ayrılan iyonlar, dedektöre ulaşırlar ve burada kayıt edilirler. Faraday kafesi, fotoğraf plakası, elektron çoğaltıcı, çok kanallı plakalar ve foton çoğaltıcı gibi çeşitli dedektör sistemleri vardır. Kütle ayırıcısından gelen iyonlar, dedektörde foton veya elektronlara dönüştürülerek elde edilen sinyaller bilgisayar programı yardımıyla kütle spektrumu olarak izlenirler [48].

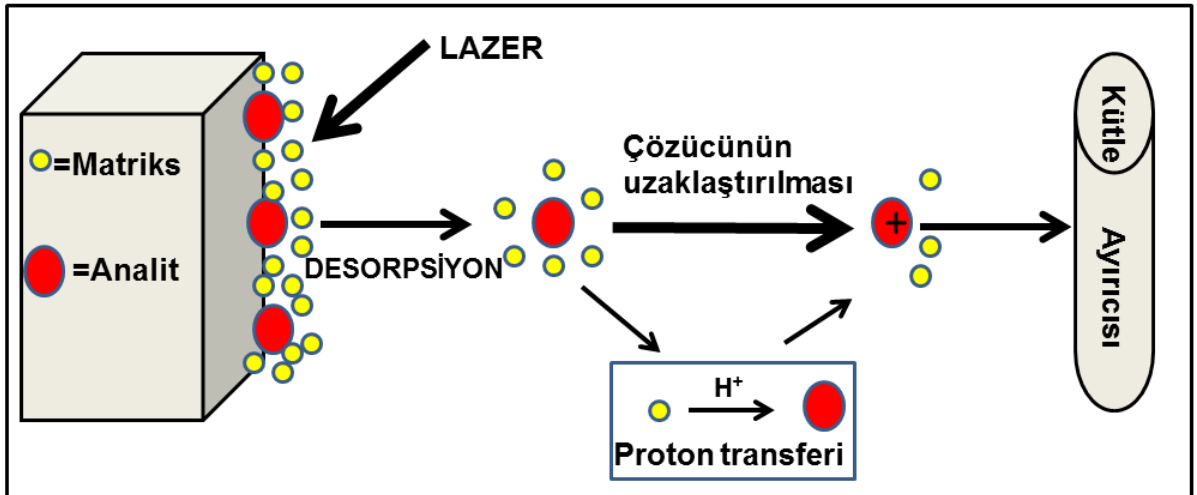
2.7.2. Yumuşak İyonlaştırmalı Kütle Spektrometrisi

EI ve FAB iyonlaştırma teknikleri sert iyonlaştırma teknikleridir. Bu teknikler molekülün parçalanmasına sebep olurlar, parçalanmalar her molekül için özgüdür. Yapıda meydana gelen parçalanmalar nedeniyle büyük mol kütlesine sahip olan moleküllerin sert iyonlaştırma teknikleri ile analiz edilmesi uygun değildir. Bu gibi moleküllerin analizleri yumuşak iyonlaştırma teknikleri olan MALDI [63] ve ESI [64] ile mümkündür. Yumuşak iyonlaştırma teknikleriyle moleküllere zarar vermeden, molekülde herhangi bir parçalanma meydana gelmeden analiz gerçekleştirilebilir. M^+ ve $[M+H]^+$ moleküler iyon pikleri oluşur ve 1.000.000 Dalton'a (Da) kadar mol

kütleleri tayin edilebilir. Bu teknikler sayesinde özellikle protein ve DNA moleküllerinin analizlerinde büyük gelişmeler yaşanmıştır [65].

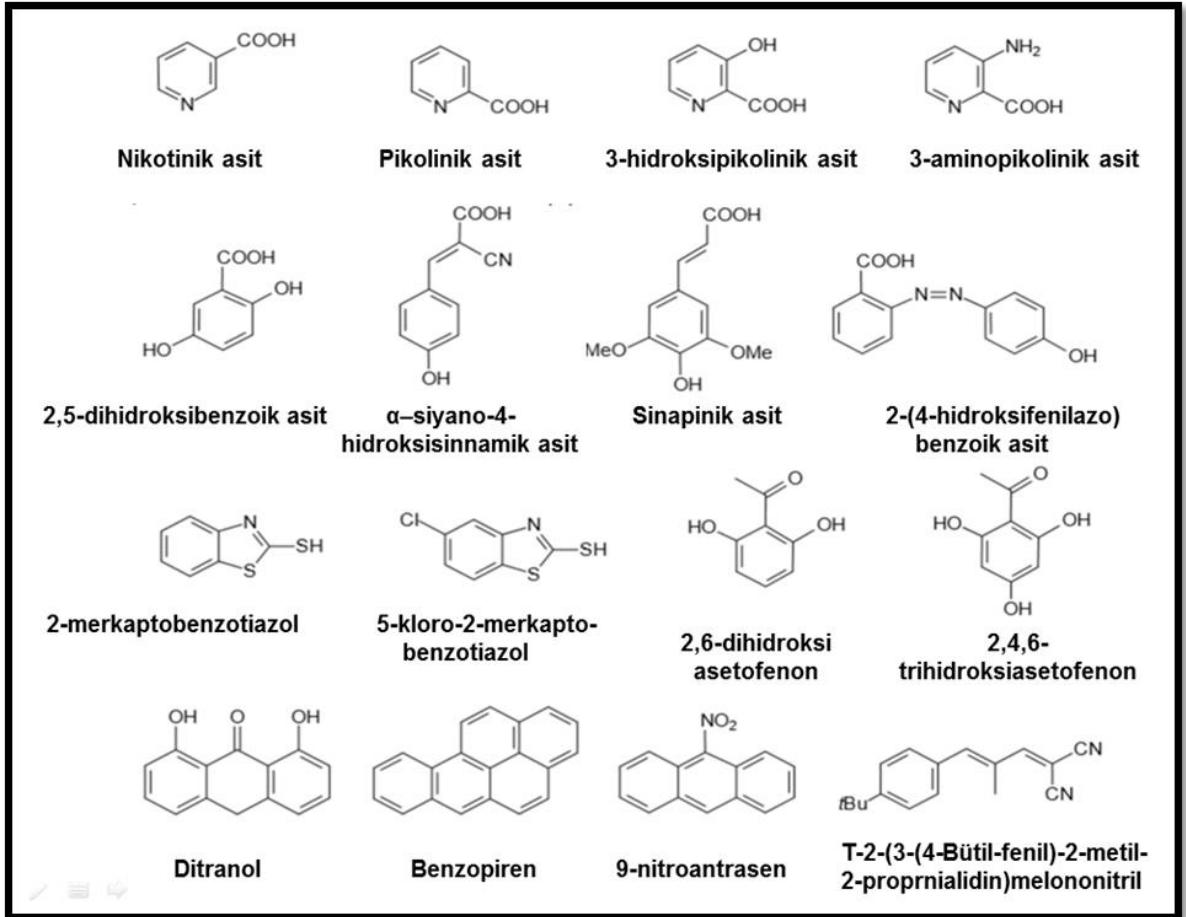
2.7.2.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı Kütle Spektrometrisi

Lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (LDI) tekniği ile iyonlaştırma kütle spektrometrik çalışmalarda örneğe direkt olarak lazer ışını göndererek, örnek bütün halinde iyonlaştırılır. Direkt olarak gönderilen lazer enerjisinin fazlasını kontrol etmek zordur ve genellikle termal bozunmalar meydana gelmektedir [61]. Bu iyonlaştırma tekniği kullanılarak protein, peptit ve nükleik asitler gibi uçuculuğu çok düşük olan moleküllerin analizini yapmak zordur. 1987 yılında Japon bilim adamı Tanaka LDI tekniği kullanarak proteinlerle ilgili yaptığı çalışmaları yayınlamıştır. 1988'de Tanaka ve Alman bilim adamları (Karas ve Hillenkamp) birbirlerinden bağımsız olarak, yüksek mol kütleli örneklerin parçalanmadan analizini gerçekleştirebilecek yeni tekniği geliştirmişlerdir. 2002 yılında Tanaka Nobel ödülüne layık görülmüştür. Matriks yardımcı-lazer desorpsiyon/iyonlaştırma olarak adlandırılan bu teknikte Şekil 2.14.'te şematik olarak gösterildiği gibi lazerden gelen enerjiyi absorplayan bir matriks yardımı ile örnek desorbe edilir ve iyonlaştırılır [55].



Şekil 2.14. MALDI-TOF çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.

MALDI iyonlaştırması sırasında, örnek matriks karışımı üzerine lazer yolları. Ultraviyole (UV) ve infrared (IR) dalga boyu aralığında değişen azot lazeri (337 nm), ekzimer lazerleri (193, 248, 308 ve 351 nm), Nd:Yag μ^3 ve Nd:Yag μ^4 lazerleri (355 ve 266 nm), Er:Yag lazeri (2.94 μm) and TEA-CO₂ lazerleri (10.6 μm) olmak üzere farklı lazer kaynakları bulunmaktadır [54]. Matriks lazerden gelen enerjiyi absorblar ve kristal halindeki analit moleküllerine bu enerjiyi transfer ederler. Örnek molekülleri uygulanan dalga boyundaki enerjiyi absorplamamalıdır. Matriks olmadan analitler yüksek enerji altında sadece desorbe olurlar ve parçalanırlar. Matriksler, düşük mol kütleli UV veya IR ışığını absorblayabilen organik bileşiklerdir. Örneğin türüne göre farklı matriksler kullanılmaktadır ve başlıca örnekleri Şekil 2.15'te bulunmaktadır.



Şekil 2.15. En çok kullanılan MALDI matrikslerinin kimyasal yapıları.

MALDI'de kullanılan örneklerin uygulandığı örnek tutucular genellikle paslanmaz çelik veya altından üretilmiştir. Matriks çözeltisi ile karıştırılan örnek, bu tutucuların üzerinde bulunan kuyucuklara yerleştirilip plakanın üzerinde kristallenmeye bırakılır, çözücü uzaklaştırılır. Bahsedilen bu yöntem kurutulmuş damlacık olarak adlandırılır ve örnek hazırlama yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Bunun yanı sıra vakum kurutma, öğütülmüş kristal, hızlı buharlaştırma, kaplama, sandviç, ince tabaka, yavaş kristallendirme, elektrosprey ve matriks kaplanmış yüzeyler olmak üzere birçok katı matriks örnek hazırlama yöntemi bulunmaktadır. Sıvı matriks hazırlama yöntemleri; kimyasal sıvı, parçacık katkılı sıvı ve kimyasal katkılı sıvıdır. Özel örnek hazırlama yöntemleri ise; katı destek olarak, 2D jeller üzerinde hazırlama ve çözünmeyen katı örneklerden hazırlama olmak üzere sınıflandırılabilir. MALDI-Kütle Spektrometrisi çalışmalarında, analizi en çok etkileyen önemli ve zor kısım örnek hazırlama bölümüdür. Çalışılacak analit için, uygun matriksin seçimi, örnek: matriks oranının belirlenmesi analizin başarısını belirleyen unsurlar arasındadır. Örnek tutucu üzerine farklı bölgelere birden fazla örneğin uygulaması yapılarak analizlerin kısa sürede gerçekleştirilebilmesi yöntemin avantajlarından biridir. Molekül yapısı mümkün olduğunca az parçalanma ile ve genelde tek yüklü olarak iyonlaştırılır. Pozitif iyon modunda alınmış kütle spektrumunda sinyaller $[M+H]^+$ olarak protonlanmış, tek bir türe aittir. Lazer yardımıyla örnek tutucu üzerinden desorbe edilen analit molekülleri kütle ayırıcısına doğru hızlanırlar. Genellikle MALDI ile birleştirilen TOF ve Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (FT-ICR) kütle ayırıcılarıdır. TOF kütle ayırıcısının sınırlı kütle ayırıcılığı gibi bir dezavantajı olsa da; teorik olarak sınırsız kütle aralığı, hızlı analiz süresi, aynı anda tüm yüklü taneciklerin belirlenmesi, kullanım ve dizayn kolaylığı, MALDI iyonlaştırması için daha uygun olması gibi avantajları sayesinde FT-ICR'ye göre daha çok tercih edilmektedir [66]. TOF kütle ayırıcısında, lazer yardımıyla iyonlaştırma kaynağında desorbe edilmiş iyonlar elektriksel alan içinde sabit bir kinetik enerji ile hızlandırılırlar [52].

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot V \quad \dots\dots\dots\text{Eşitlik 2.1.}$$

Eşitlik 2.1'de 'm' iyonun kütlesini, 'v' iyonun hızlandırılma bölgesinden sonraki hızını, 'z' iyonun yükünü, 'e' elektronun yükü ve 'V' uygulanan elektriksel alanın

gerilimini ifade etmektedir. İyonun hızı, $(m/z)^{-1/2}$ ile doğru orantılıdır. Sonrasında bu iyonlar, elektriksel alan uygulanmayan serbest bir tüp içerisinde geçtiklerinde, kütlesi daha küçük olan iyonlar büyük iyonlara göre daha hızlı olduklarından dedektöre daha önce ulaşırlar.

$$L = v \cdot t \quad \dots\dots\dots\text{Eşitlik 2.2.}$$

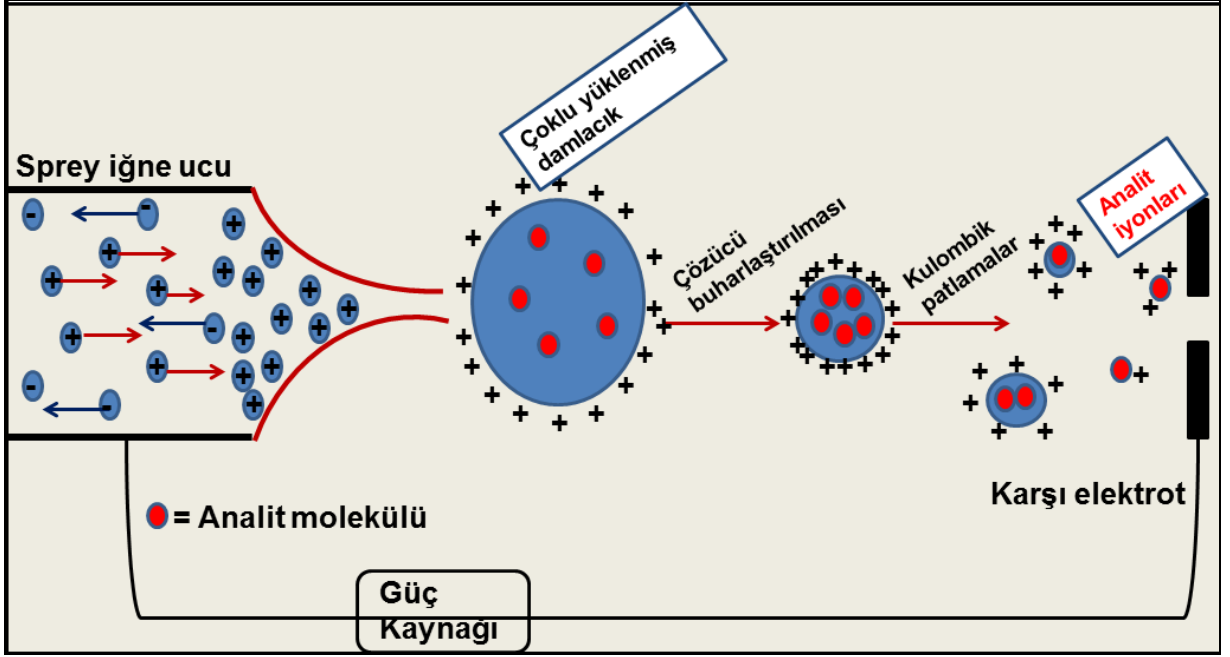
'L' elektriksel alan uygulanmayan tüpün uzunluğunu 't' uçuş süresini ifade ettiğinden hız eşitliği L/t ifadesi cinsinden Eşitlik 2.2.'de görüldüğü gibi ifade edilebilir.

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot V \cdot t^2}{L^2} \quad \dots\dots\dots\text{Eşitlik 2.3.}$$

Eşitlik 2.3.'ten m/z oranının, uçuş süresinin karesi ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Bu yüzden bir iyonun kütlesi analizörün, kütlesi ve yükü bilinen örneklerle bir kez kalibrasyonunun yapılmasıyla, uçuş zamanı ölçülerek belirlenebilir [55]. TOF kütle ayırıcı sistemlerinde lineer ve refletron olmak üzere iki çalışma modu bulunmaktadır. Lineer TOF'ta iyonlar elektriksel alan içerisinde sabit bir enerji ile hızlandırılıp, elektriksel alan uygulanmayan tüpün içine girerler. Dedektöre çarpıp sinyal üretirler. Mol kütlesi arttıkça (100-900 kDa), kütle ayırıcılığı (<300) azalır. Refletron modda ise tüpün sonunda da karşı bir elektriksel alan uygulanarak iyonların yönünün değiştirilmesi amaçlanır. Aynı kütledeki iyonlar arasından yüksek hıza sahip olan iyon refletrona erken ulaşır. Karşı elektriksel alan içerisinde derinlere giderek, yönlerini değiştirmek için iyon refletronda daha uzun süre kalırlar. Düşük hızlı iyonlar ise geç gelirler, refletronda derine kadar inemez ve daha az zaman harcarlar. İyon refletronunda voltaj uygun bir seviyeye ayarlandığında, aynı kütledeki fakat farklı hızlardaki iyonlar dedektöre aynı zamanda ulaşırlar. Böylelikle keskin olarak ayrılmış sinyaller elde edilir [52]. Refletron modda düşük mol kütleli örnekler (1000-9000 Da) tayin edilebilir fakat bir avantaj olarak ayırıcılık (10000 civarında) yüksektir [55]. Yapılan son çalışmalar, MALDI-TOF-MS sisteminin modern biyokimya ve polimer araştırmalarında temel bir analitik araç olduğunu göstermektedir [54].

2.7.2.2. ESI- Kütle Spektrometrisi

1970'li yıllarda Malcom Dole ve arkadaşları tarafından elektrosprey iyonlaştırma tekniğinin kimyasal türleri bir bütün olarak iyonlaştırmada kullanılabileceğini öne süren çalışmalar gerçekleştirilmiş ve ESI tekniği icat edilmiştir [67]. ESI kullanılarak yüksek mol kütleli ve biyolojik olarak önemli bileşiklerin analizlerinin kütle spektrometrisi ile tayini çalışmaları ilk olarak Fenn ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [68]. Fenn bu çalışmasıyla 2002 Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [69]. Uçucu olmayan ve termal olarak kararsız örneklerin iyonlaştırılmalarına olanak sağlamaktadır. Moleküller parçalanmadan iyonlaştırılarak, zayıf etkileşimlerle oluşmuş kompleksler bütün (intact) halinde analiz edilebilirler. Elektrosprey iyonlaştırmada örnek, kuvvetli bir elektriksel alan yardımıyla direkt olarak çözeltiden püskürtülür [68]. Tipik bir ESI kütle spektrumu çok yüklü iyonların dağılımını göstermektedir. Çoklu yüklenmenin avantajlarından biri büyük moleküllerin, kütle/yük oranı küçük olan bir kütle ayırıcısı (örneğin dört kutuplu) ile tayin edilebilmelerini sağlamaktır. Elektrosprey iyonlaştırma sırasında çözelti halinde bulunan örnek, akış hızı ayarlanabilen (nanolitre mertebesine kadar) bir şırınga ile cihazın içerisine pompalanır. Elektrik potansiyeli uygulanmış iğne şeklindeki kapiler kullanılarak çözeltideki analit molekülleri yüklenir, püskürtülür ve yüklenmiş damlacıklar oluşturulur [70]. Analit moleküllerinin etrafını saran veya damlacıklar içerisinde bulunan çözücü moleküllerinin buharlaştırılarak uzaklaştırılması için kurutucu gaz gönderilir ya da ısıtma işlemi gerçekleştirilir. Yüklenmiş analit molekülleri, yükleri sebebiyle birbirine karşı itme kuvveti uygular ve bu itme kuvveti ile kulombik patlamalar oluşur. Aynı türlerin farklı yüklü iyonları oluşturulmuş olur [58]. Şekil 2.16'da ESI'nın şematik olarak gösterimi görülmektedir. Hazırlanan örnek çözeltisine az miktarlarda asit veya baz eklenmesi ile zor iyonlaşan türlerin iyonlaştırılmaları da ESI ile kolaylıkla sağlanabilir. ESI kullanılarak hem pozitif hem de negatif modda çalışmak mümkündür. Çözücü olarak su veya su-organik çözücü (metanol, asetonitril gibi) karışımları kullanılabilir. ESI ile "Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)" gibi kromatografik yöntemler kolaylıkla birleştirilerek analiz yapılabilmektedir.



Şekil 2.16. ESI çalışma prensibinin şematik gösterimi.

Ardışık dört kutuplu kütle ayırıcısı 1970'lerden beri kullanılmakta ve günümüzde halen çok kuvvetli olan bir sistem olarak yer almaktadır. Kromatografik cihazlarla ve iyon kaynağı ile birleştirilerek kullanımı oldukça iyi olan bu kütle ayırıcısı aynı zamanda çoklu tarama modunda da çalışabilmektedir. ESI-MS katyon/taç eter etkileşimlerinden ilaç/reseptör etkileşimlerine kadar geniş bir yelpazede moleküler tanımlama araştırma alanında, bağlanma sitokiyometrisinin belirlenmesi ve bağlanma afinitesi hesaplanması yapılmak amacı ile kullanılmaktadır [71].

2.7.3. Kütle Spektrometresinin Avantajları

- ✓ Kesin molekül ağırlığı ölçümü gerçekleştirilebildiğinden moleküllerin ne olduğunu belirlemek anlamında eşsiz moleküler özgüllük ve örneğin parçalanma ürünlerinin yapısal tanımlaması hakkında kolaylıkla bilgi elde edilmesini sağlamaktadır.
- ✓ Yüksek tayin hassasiyetine sahiptir. Tek bir molekül bazında tayin gerçekleştirebilir. Attomol ve zeptomol değerlerindeki moleküllerin tayinleri ispatlanmıştır.
- ✓ Farklı sınıftan birçok bileşiğin yapılarının aydınlatılmasında eşsiz çok yönlülüğe sahiptir.

- ✓ Tüm elementler ile çalışılabilir.
- ✓ Uçucu, uçucu olmayan, polar, nonpolar, katı, sıvı ya da gaz olmak üzere farklı türlerdeki örnekler analiz edilebilir.
- ✓ Ayırma tekniklerinin kullanıldığı cihazlarla birleştirilerek karmaşık örneklerin analizleri de gerçekleştirilebilir.

Yukarıda belirtilen tüm bu özellikler sayesinde kütle spektrometrisinin geniş bir uygulama ve araştırma alanı bulunmaktadır [61].

2.7.4. Aptamerler ve Kütle Spektrometrisi

Geniş ve detaylı moleküler tanımlama özellikleri, aptamerin ve bağlanma bölgelerinin haritalandırılması, aptamer ve hedefin şekil değişimlerini araştırmak için kinetik çalışmalar, bağlanma sitokiyometrisi ve denge sabitlerinin belirlenmesi gibi pek çok çalışma aptamer etkileşimlerini anlayabilmek adına gerçekleştirilmiştir. Aptamer protein etkileşimlerini karakterize edebilmek için nükleer manyetik rezonans (NMR), yüzey plazmon rezonans (SPR), X ışınları kristalografisi, kuartz kristal mikrobalsan (QCM), izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC), dairesel dikroizm (CD), floresans anizotropi gibi pek çok teknik kullanılmıştır.* Bununla birlikte, bu tekniklerin çoğu aptamer ve hedef molekül arasındaki bağlanmayı etkileyebilecek bir floresan işaretleyici ya da yüzey sabitlenmesi gerektirir. Örneğin X ışınları kristalografisi için çok homojen ve yüksek saflıkta kristaller gerekmektedir ve kristal geliştirme işlemi çok uzun, çoğu kez de başarısızdır. Çok az sayıda aptamer-ligand yapıları bu teknikle aydınlatılabilmektedir [72]. NMR tekniği detaylı bilgiler sağlanmasına rağmen çok fazla malzeme ve uzun analiz süresi gerektirir. Küçük yapıli moleküller için kısıtlayıcı bir tekniktir. Kimyasal kaymaların küçük olması yapının aydınlatılmasını zorlaştırır [73]. Tüm bu sebeplerden ötürü, aptamer protein etkileşimlerinin araştırılması için işaretleyicilerin kullanılmadığı, hassas ve güvenilir bir metot geliştirilmesi gerekmektedir. Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı (MALDI) gibi yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin kullanıldığı kütle spektrometrisi biyomoleküllerin ve komplekslerinin çalışılması için etkin bir araç olarak ortaya çıkmıştır [74]. Bu teknikler yardımıyla biyomoleküller kolaylıkla gaz fazına transfer edilebilir ve uygun örnek hazırlama işlemleriyle non-

kovalent etkileşimler korunabilir. Diğer analitik metotların aksine, kütle spektrometrisi biyomolekül çalışmalarında pek çok avantaj sağlamaktadır. Çok düşük örnek miktarlarıyla analizlerin gerçekleştirilmesi, kimyasal işaretleme gerekle duyulmaması, analizlerin çok kısa sürede tamamlanması ve spektrumların daha kolay yorumlanabilir olması bu avantajlar arasında yer almaktadır.* ESI, protein-DNA komplekslerinde DNA'nın proteinlere bağlanma ilgisini ve kompleksin sitokiyometrisini belirlemek için kullanılmaktadır [75]. Ayarlanmış deneysel ve aletsel koşullar altında, aptamer-hedef molekül etkileşimlerinde hem kompleksin sitokiyometrisi hem de bağlanma afiniteleri hakkında bilgi elde etmek için ESI kullanılır [76]. MALDI kütle spektrometrisi katı yüzeye sabit edilmiş aptamerlerin hedef molekülleri seçimli olarak zenginleştirme çalışmalarında kullanılmıştır [7]. Aptamerler hedef molekül tanımlamasında yüksek seçicilik göstererek çok kullanışlı olmalarına rağmen, kullanımlarının daha faydalı hale dönüştürülebilmesi için kütle spektrometrisi sistemlerle birlikte çalışılmasını gerektirmektedirler [2].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasallar

İnsan trombin proteini, sığır serum albümini (BSA), sitokrom c, tripsin, amonyum bikarbonat (ABC), trifloroasetik asit (TFA), α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (α -CHCA), 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), sinapinik asit (SA, 3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit), 3-Hidroksipikolinik asit (3-HPA), diamonyum sitrat, tris(hidroksimetil)aminometan, hidroklorik asit (HCl), asetonitril (ACN), 1,4-Ditiyotreitöl (DTT), iyodoasetamid, fosforik asit (H₃PO₄) Sigma Aldrich (A.B.D.) den alınmıştır. Sülfosüksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat (Sülfosülfosüksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat (Sülfosülfosüksinimidil süberat) (BS³) çapraz bağlayıcı ajanları Thermo Scientific (A. B. D.) den temin edilmiştir. Amin fonksiyonel gruplu polistren divinil benzen (PS-DVB) grubumuz tarafından sentezlenmiştir [77]. Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de tez kapsamında kullanılan aptamer dizileri listelenmiştir. 5' veya 3' uçlarından amin veya tiyol modifiye sentezlenmiş, HPLC ile saflaştırılmış belirtilen trombin aptamerleri Sigma Aldrich (A.B.D.)'den satın alınmıştır.

Çizelge 3.1. 5' ve 3' ucundan tiyol modifikasyonu (S-H) gerçekleştirilmiş farklı baz birimi çeşidi ve sayılarına sahip trombin aptameri dizileri.

5' Ucundan Tiyol Modifiye (S-H) Trombin Aptamerleri	3' Ucundan Tiyol Modifiye (S-H) Trombin Aptamerleri
[ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]
[ThiC6]TTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]
[ThiC6]TTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]
[ThiC6]AAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]
[ThiC6]AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]
[ThiC6]AAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]

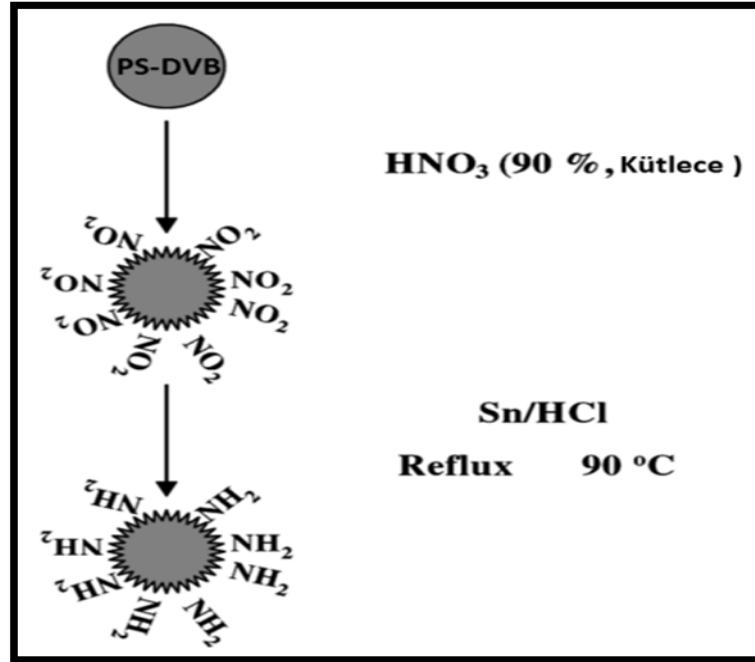
Çizelge 3.2. 5' ve 3' ucundan amin modifikasyonu gerçekleştirilmiş farklı baz birimi çeşidi ve sayılarına sahip trombin aptameri dizileri.

5' Ucundan Amin Modifiye Trombin Aptamerleri	3' Ucundan Amin Modifiye Trombin Aptamerleri
[AmC6T]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]
[AmC6T]TTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]
[AmC6T]TTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG	TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]
[AmC6T]AAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]
[AmC6T]AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]
[AmC6T]AAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG	AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]

Yapılan çalışmalarda hazırlanan sulu çözeltilerde 18.2 M.Ω.cm dirence sahip deiyonize su kullanılmıştır (Puris Expe-Ultrapure Water System, Mirae St Co. Ltd. Kore).

3.2. Deneysel Kısım

Amin fonksiyonel gruplu polistren divinil benzen mikroküreleri: PS-DVB (kütlece 12% DVB) mikroküreleri ticari olarak Aldrich firmasından satın alınmıştır. Buz banyosunda, %90' lık HNO₃ üzerine PS-DVB küreleri eklenmiştir. Mikrokürelerin eklenmesi tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı 25 °C' de 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında, mikroküreler soğuk su ile birkaç defa yıkanıp süzülerek reaksiyona girmeyen HNO₃ ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Son olarak, mikroküreler asetonla yıkanmış ve vakum fırınında 60 °C' de kurutulmuştur. NO₂ gruplarının NH₂ gruplarına dönüştürülmesi için indirgenme reaksiyonu gerçekleştirmek amacıyla 90 °C' de nitrolanmış mikroküreler HCl ve metalik kalay varlığında reflux (Şekil 3.1.) edilmiştir [77].



Şekil 3.1. Poli(stiren-divinilbenzen) mikrokürelerinin amin fonksiyonel grubu ile modifikasyonunun şematik gösterimi.

İnsan trombin proteininin ve trombin aptamerlerinin çözeltisi: Deiyonize suda çözünerek 70 pmol/μL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlandı. Suyu seyreltilerek derişimleri 7 pmol/μL, 3,5 pmol/μL ve 0,07 pmol/μL olan çözeltiler hazırlandı.

Tris-HCl tampon çözeltileri: Destek yüzey bağlanmasında 1 M ve yıkama çözeltileri olarak 0,1 M tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözeltilerinin hazırlanmasında 12,14 g ve 1,214 g Tris(hidroksimetil)aminometan 90 mL deiyonize suda çözüldükten sonra, oda sıcaklığında pH 7,5 oluncaya kadar HCl ilave edilip, son hacim 100 mL' ye su ile tamamlanmıştır.

Çapraz bağlayıcıların hazırlanması: Tiyol modifiye aptamerlerin amin fonksiyonel gruplu PS-DVB mikrokürelere bağlanması için Sülfö-SMCC heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcısı 2 µg/µL olacak şekilde su ile ve amin modifiye aptamerler için BS³ homobifonksiyonel çapraz bağlayıcısı 2 µg/µL olacak şekilde 100 mM fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

α-CHCA matriks çözeltisi: Düşük molekül ağırlıklı türlerin, parçalanma ürünlerinin MALDI kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmak üzere, 10 mg/mL α-CHCA çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

SA matriks çözeltisi: Yüksek molekül ağırlıklı türlerin, bütün haldeki trombin proteininin MALDI kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmak üzere, 10 mg/mL sinapinik asit matriks çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

DHB matriks çözeltisi: Yüksek molekül ağırlıklı türlerin MALDI kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmak üzere 10 mg/mL DHB çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

3-HPA matriks çözeltisi: 50 mg/mL su/asetonitril (50:50; v/v) çözücü karışımında hazırlanan 3-HPA çözeltisi ile 50 mg/mL suda çözünen hazırlanmış diamonyum sitrat çözeltisinin sırasıyla 9:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanıp aptamer çözeltilerinin MALDI kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmıştır.

Oluşabilecek çapraz kontaminasyonu ve bozulmayı engellemek amacıyla matriks çözeltileri deneylerde kullanılacak miktarlarda ve taze olarak hazırlanmıştır. Seçilen uygun miktarlardaki matriks çözeltileri örnek ile belirli oranda karıştırılarak kurutulmuş damlacık veya sandviç metodu ile örnek tutucusu üzerine sabitlenmiş ve analize hazır hale getirilmiştir.

Kütle Spektrometrisi Parametreleri: Voyager-DE™ PRO MALDI-uçuş zamanlı (TOF)-kütle spektrometrisi (Applied Biosystems, Amerika) yardımıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometrik sistemde 337 nm dalga boyunda azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmıştır. Analizler süresince kütle spektrometresi içindeki vakum 5×10^{-8} torr civarında tutularak, iyonların hızlandırılması için 20 kV potansiyel fark uygulanmıştır. Spektrumlar lineer modda ve ortalama 100 lazer vuruşu sonucunda alınmıştır. Kütle hatalarını engellemek için kütle spektrometresi anjiyotensin (1296,5 g/mol), insulin (5733,5 g/mol) ve standart matriks çözeltileri ile kalibre edilmiştir. Veriler kaydedilerek yorumlanmıştır.

İnsan Trombini çözeltilisinin analizi

3,5 pmol/μL derişimindeki trombin çözeltilisi, SA matriksi ile karıştırılarak MALDI-Kütle Spektrometrisi ile analiz edilmiştir.

3.3. Trombin Proteininin Kütle Spektrometrik Tekniklerle Enzimatik Parçalanma Koşullarının Belirlenmesi

Enzimatik parçalamanın gerçekleştirilmesi için, protein aminoasit diziliminde arjinin ve lizin aminoasitlerinin bağlı olduğu diğer aminoasitlerdeki peptit bağlarını karboksil uçlarından parçalayıp küçük peptit birimleri oluşturan tripsin enzimi kullanılmıştır. 1 mg/mL derişiminde hazırlanan stok tripsin çözeltilisi, triptik parçalama için kullanılmıştır. Enzimatik parçalama işleminden önce, 100 μL trombin proteininde bulunan disülfid bağlarının kırılması için ortama 10 μL 10 mM 1,4-ditiyotreitol (DTT) eklenerek 80 °C' de yarım saat boyunca bu protein çözeltilisi inkübe edilmiş ve sonrasında 10 μL 20 mM iyodoasetamid çözeltilisinden eklenerek karanlıkta yarım saat bekletilmiştir. Aynı derişimdeki iki farklı trombin çözeltilisinden birine 1 mg/mL tripsin çözeltilisinden 3 μL; diğerine 0,1 mg/mL tripsin çözeltilisinden 3 μL eklenerek triptik parçalama işlemi başlatılmıştır. Enzimatik parçalama süresince ortama tampon çözelti olarak pH değeri 8,3 olan 20 μL 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiştir. Triptik parçalamaya 37°C'de sıcak su banyosunda 2,5 saat inkübasyon ile devam edilmiştir. 1 μL TFA ile sonlandırılan parçalama işlemindeki ürünler, (1:5) oranında α-CHCA matriksi ile karıştırılarak MALDI-Kütle Spektrometrisi' nde analiz edilmiştir.

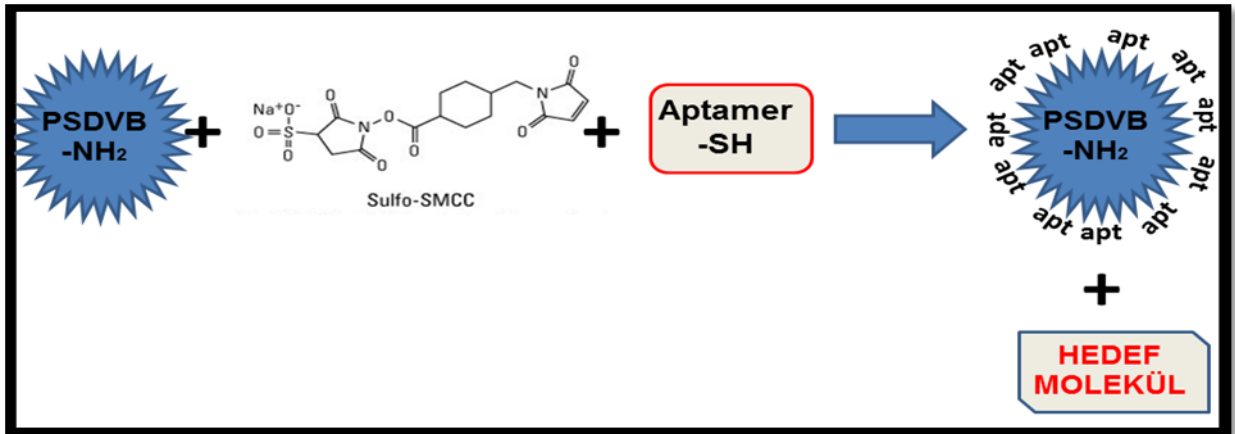
3.4. Trombin Proteininin Aptamer Bağlı Yüzeyle Bağlanmasında Ortam Sıcaklığı ve pH Değişkenlerinin Ayarlanması

Trombin proteininin yüzeyle inkübasyonu için farklı derişimlerde Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltiler içerisinde 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanıldığında pH metrede ölçülen değer 6,8 olarak kaydedilirken; 1,0 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanıldığında etkileşim süresince ölçülen pH değeri 7,4 olarak belirlenmiştir. Kullanılan çapraz bağlayıcıların da aptamer bağlama koşulları göz önünde bulundurulduğunda, daha etkili bağlanmanın gerçekleştirilebilmesi için 1,0 M Tris-HCl tampon çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda, trombin proteininin üç boyutlu yapısının bozulabileceği ve aptamerin hedef moleküle bağlanma şartlarından birisinin de proteinin üç boyutlu yapısı olduğu göz önünde bulundurularak aptamer bağlı yüzey ile trombin proteininin etkileşimi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

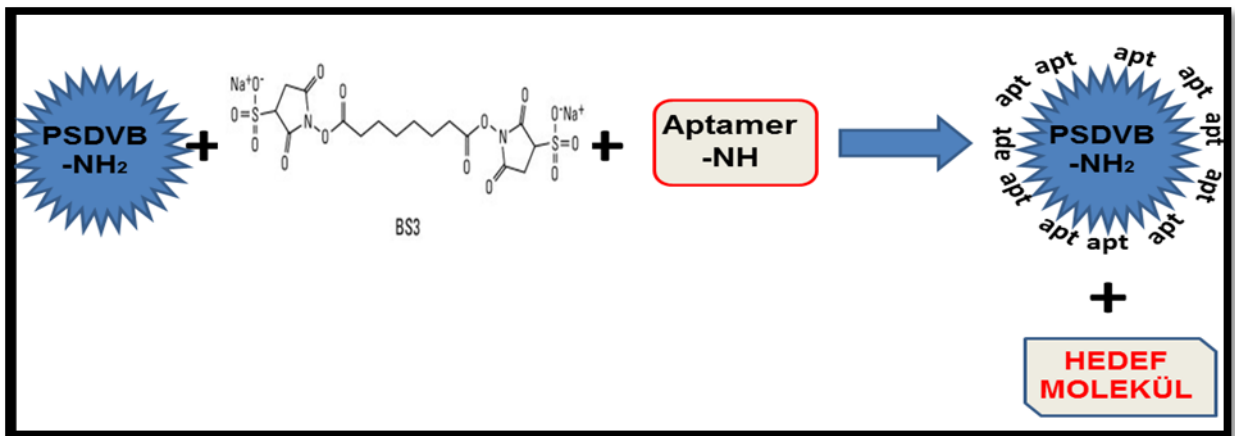
3.5. Uygun Çapraz Bağlayıcıyla Yüzeyle Bağlanan Trombin Aptamerinin Trombin Proteinini ile Etkileşimi

Amin fonksiyonel gruplu poli(stirendivinil-benzen) (10 mg) hassas olarak tartılmıştır. Üzerine pH=7,2 ve 1,0 M Tris-HCl tampon çözeltisinden 200 µL eklenmiştir. Tiyol modifiye aptamerleri amin modifiye yüzeye bağlamak için 2,0 µg/µL Sülfö-SMCC heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcısından 200 µL, amin modifiye aptamerleri amin modifiye yüzeye bağlamak için 2,0 µg/µL BS³ homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcısından 200 µL eklenip; pH metre yardımıyla sürekli olarak pH değerlerinin kontrolü yapılmış ve bağlanmanın en aktif olarak gerçekleştiği pH 7,2 değerinde bağlanma gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlayıcı yüzey ile etkileştirildikten sonra, yüzeye bağlanmamış çapraz bağlayıcıların uzaklaştırılması için 3 kez 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisi ile yıkamalar gerçekleştirilmiş ve santrifüj işlemi yapılarak yüzey aptamerin bağlanmasına hazır hale getirilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında, belirlenen 7,0 pmol/ µL 200 µL trombin aptameri ve 200 µL 1,0 M Tris-HCl tamponu hazırlanmış yüzeye eklenerek 4-5 saat boyunca etkileşime bırakılmıştır. Etkileşim sonrasında; aptamer yüklenmiş parçacıklar üzerindeki sıvı alınarak, tampon çözeltisiyle yıkanan polimerik yüzeye hedef molekül olan insan trombin proteininin 3,5 pmol/µL çözeltisinden 200 µL eklenerek aptamer hedef molekülü etkileşimi başlatılmıştır.



Şekil 3.2. Tiyol modifiye aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.



Şekil 3.3. Amin modifiye aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.

Şekil 3.2. ve Şekil 3.3. amin modifiye PS-DVB mikrokürelere çapraz bağlayıcı yardımıyla bağlanan trombin aptamerinin, hedef molekülü olan trombin proteiniyle etkileşim süreçlerini özetlemektedir. Bu süreçler; 5' veya 3' ucundan tiyol veya amin modifikasyonu gerçekleştirilmiş farklı baz birimi çeşidi ve sayılarına sahip trombin aptameri dizileri için tekrarlanmıştır.

3.6. Aptamer Tutturulmuş Polimerik Yüzeyde Triptik Parçalanmanın İncelenmesi

Trombin proteini tutturulmuş aptamer bağlı polimerik yüzey 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisiyle yıkandıktan sonra, yüzeye 20 µL 9 mM DTT eklenerek 80 °C' de yarım saat inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına dönen örneğe, 20 µL 20 mM iyodoasetamid eklenerek karanlıkta yarım saat bekletilip disülfid bağlarının kırılması gerçekleştirilmiştir. 40 µL 50 mM amonyum bikarbonat ve 5 µL 0,1 mg/mL tripsin çözeltisinden ilave edilerek triptik parçalamaya 37 °C' de 2,5 saat devam edilmiştir.

3 µL TFA eklenerek enzimatik parçalama işlemi sonlandırıldıktan sonra örnek α-CHCA matriksi ile (1:5; v/v) karıştırılarak MALDI kütle spektrometrisi ile analize hazır hale getirilmiştir.

3.7. Aptamer Bağlanmamış Yüzeyin Trombin Proteini ile Muamele Edilmesinin İncelenmesi

Tartılan 10 mg amin fonksiyonel gruplu PS-DVB mikroküreleri aptamer etkileşimi gerçekleştirilmeden, 200 µL 3,5 pmol/µL trombin çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bekleme süresi sonrasında tampon çözeltisiyle yıkanan yüzeye aynı değişkenlere sahip triptik parçalama işlemi uygulanmıştır. Parçalama sonrasında örnek MALDI-TOF Kütle Spektrometresinde analiz edilmiştir.

3.8. Trombin Aptameri Bağlanmış Yüzey ile Karışım Halindeki Protein Çözeltisinin Etkileşiminin İncelenmesi.

5' ucundan, tiyol modifiye olmak üzere sentezlenen trombin aptameri ([ThiC6]TTTTT GGTTGGTGTGGTTGG), amin fonksiyonel gruplu PS-DVB mikrokürelerine Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısı aracılığıyla belirlenen yöntem kullanılarak bağlanmıştır. Elde edilen aptamer bağlı yüzeyin; insan trombin proteini, sığır serum albümini (BSA), sitokrom c proteinlerinden 7 pmol olacak şekilde eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edilen 1 mL karışım ile inkübe edilmesinin ardından, yüzeyde kalan supernatant ayrılarak yıkama tampon çözeltisi ile yıkamalar gerçekleştirilmiştir. Yüzeydeki protein, tripsin enzimi ile parçalamaya uğratılmıştır. MALDI-TOF-MS kullanılarak analizlerin gerçekleştirilmesi için, elde edilen peptit çözeltisi α-CHCA matriksi ile (1:5; v/v) karıştırılarak kurutulmuş damlacık metoduyla örnek tutucusuna uygulanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

3.9. Düşük derişimli trombin proteininin geliştirilen yöntemle zenginleştirilerek tayin edilmesinin incelenmesi

0.07 pmol/µL derişime sahip trombin proteinine aynı şartlarda triptik parçalama uygulandıktan sonra MALDI-Kütle Spektrometrisi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Aynı derişimdeki 200 µL trombin çözeltisi amin fonksiyonel gruplu PS-DVB polimerik yüzeye tutturulmuş 5' ucundan, tiyol modifiye olmak üzere sentezlenen

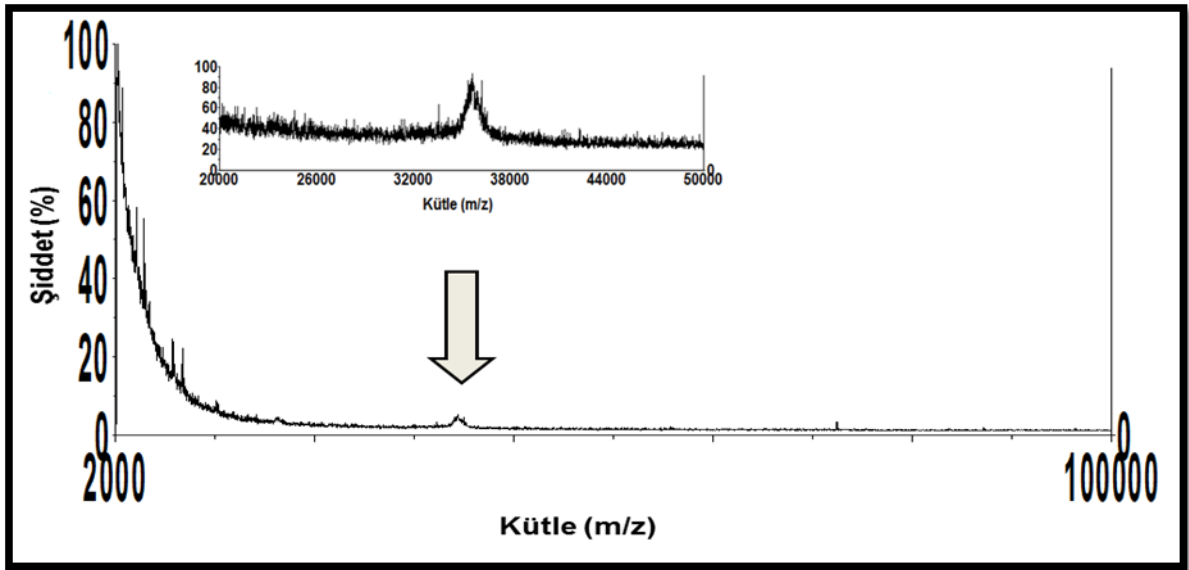
trombin ([ThiC6]TTTTT GGTGGTGTGGTTGG) aptameri ile muamele edilip protein-aptamer etkileşimi tamamlanıp, enzimatik parçalamadan sonra MALDI-Kütle Spektrometrisi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları yorumlanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

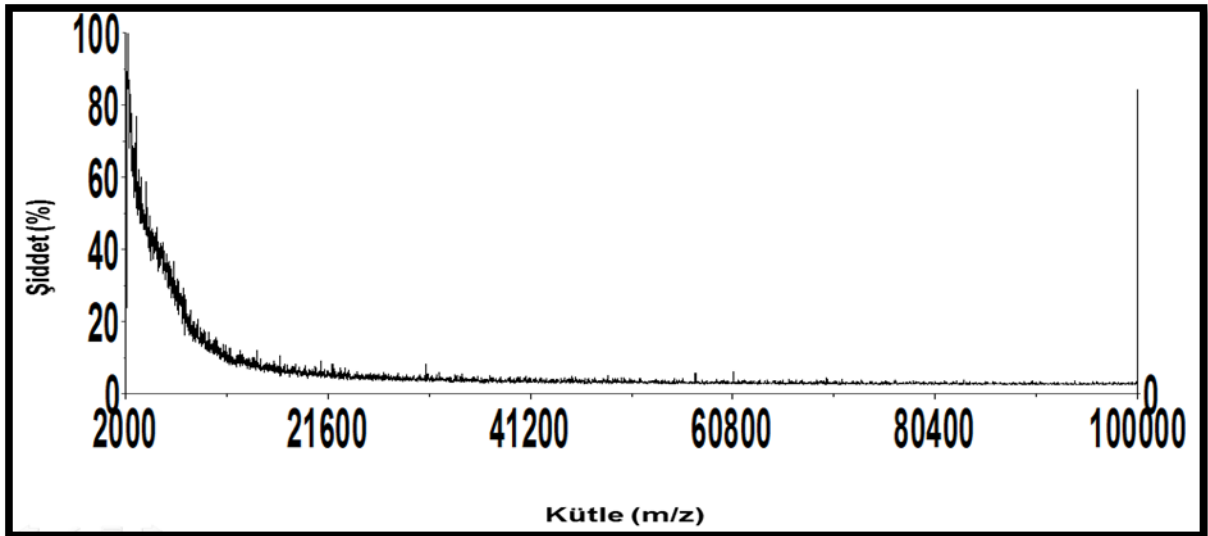
4.1. Trombin Proteininin Analizleri

Trombin proteininin enzimatik parçalanmaya uğramadan önceki analiz sonucunu gösteren Şekil 4.1.'deki spektrumda trombine ait yayvan bir pik gözlemlenmiştir.

Aptamer bağlı yüzey ile etkileşim sonrası trombine ait Şekil 4.2.'deki spektrumda yayvan pik gözlemlenmemektedir. Bu spektrumlar, aptamerin hedef molekülüyle etkileştiğini ve serbest trombin derişiminin oldukça fazla miktarda azaldığını göstermektedir.



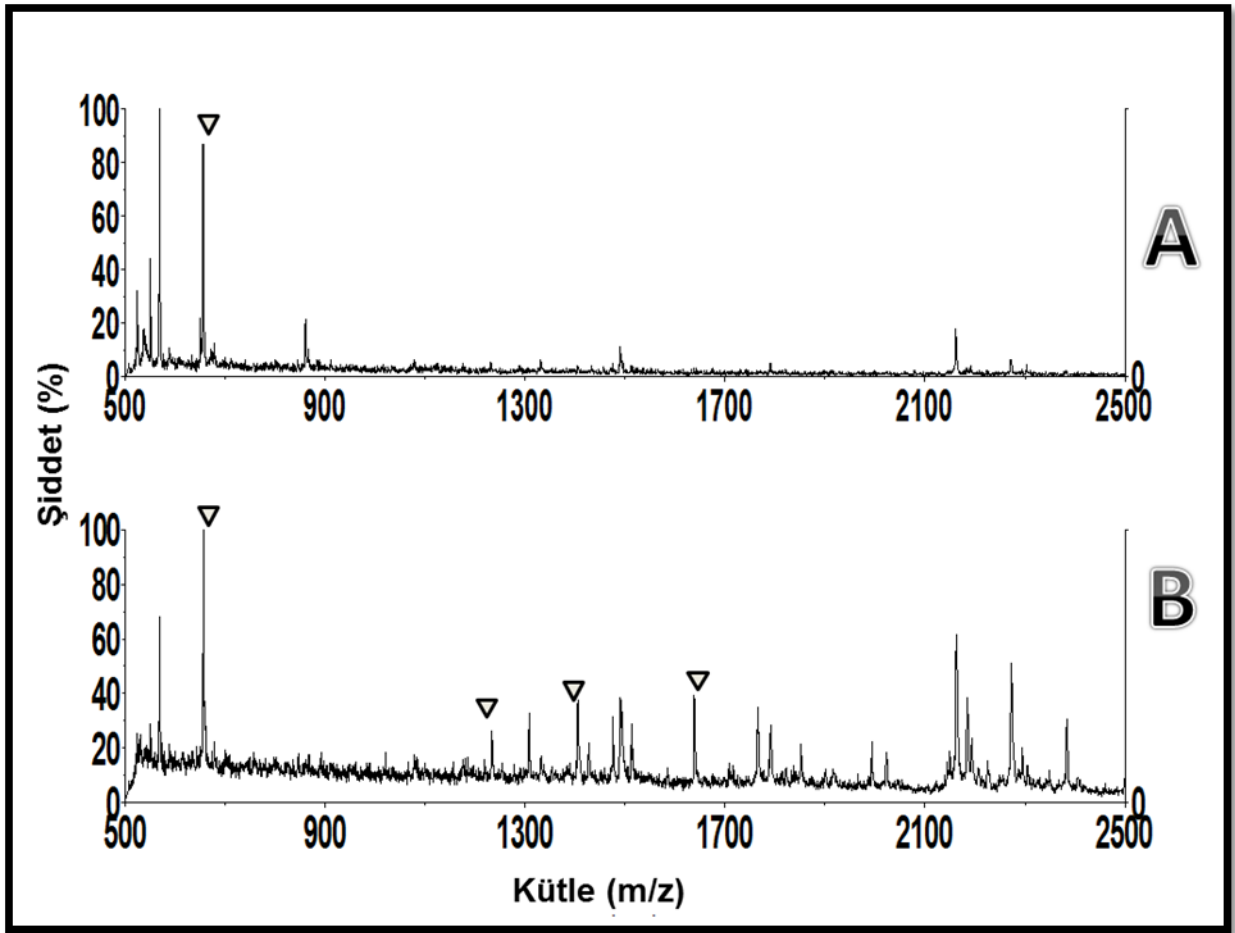
Şekil 4.1. Trombin proteininin enzimatik parçalanmaya uğramadan önceki bütün protein formuna ait pozitif moda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.



Şekil 4.2. Trombin proteininin özgün aptameri ile etkileşimi sonrasında elde edilen pozitif moda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.

Yüksek molekül ağırlığına sahip türler, fazla bulunmadıkları durumlarda ortamdaki diğer türler tarafından baskılanmaya eğilimlidirler ve MALDI-TOF-MS ile izlenmeleri zorlaşmaktadır. Proteinlerin MALDI analizlerinde, yüksek kütleyle sahip türlerin bulunduğu ortamdaki baskılamadan dolayı küçük kütlelerdeki iyonların birbirlerinden ayrılması zor olmakta ve pik genişlemeleri gözlemlenmektedir. Bu durum, hem ayırıcılığı düşürmekte hem de elde edilen piklerin şiddetlerinde azalmalara yol açmaktadır. Proteinlerin bütün halinde analizlerinin zor olması ve tayin edilebilme sınırlarının düşük olması sebebiyle tez çalışmasında gerçekleştirilen analizlerde enzimatik parçalama uygulayarak peptit fragmentleri üzerinden yorumlamalar yapılmaktadır.

Düşük derişimdeki trombin proteininin zenginleştirilmesinin incelenmesi amacıyla 0.07 pmol/ μ L derişime sahip trombin proteinine uygun yöntemle zenginleştirme gerçekleştirilmiştir. Derişimi düşük olan trombine zenginleştirme yapılmadan, çözelti ortamında tripsin ile parçalama uygulandıktan sonra gerçekleştirilen MALDI-MS analizinde trombine ait peptit fragment kütlelerinin sinyallerine neredeyse hiç rastlanmamıştır. Fakat aynı derişime sahip trombin proteini uygun yöntemle aptamer bağlı yüzeyde etkileşime tabi tutulduktan sonra yapılan enzimatik parçalamalar, trombine ait peptit fragment sayısında artışın, şiddetli ve ayırıcılığı yüksek iyon sinyallerinin görülmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, gözlenebilme sınırının altında kalan derişimlerdeki trombin çözelti halinde tayin edilemiyorken, aptamer bağlı polimerik yüzeyde zenginleştirilerek tayin edilebileceği Şekil 4.3' te görülmektedir.



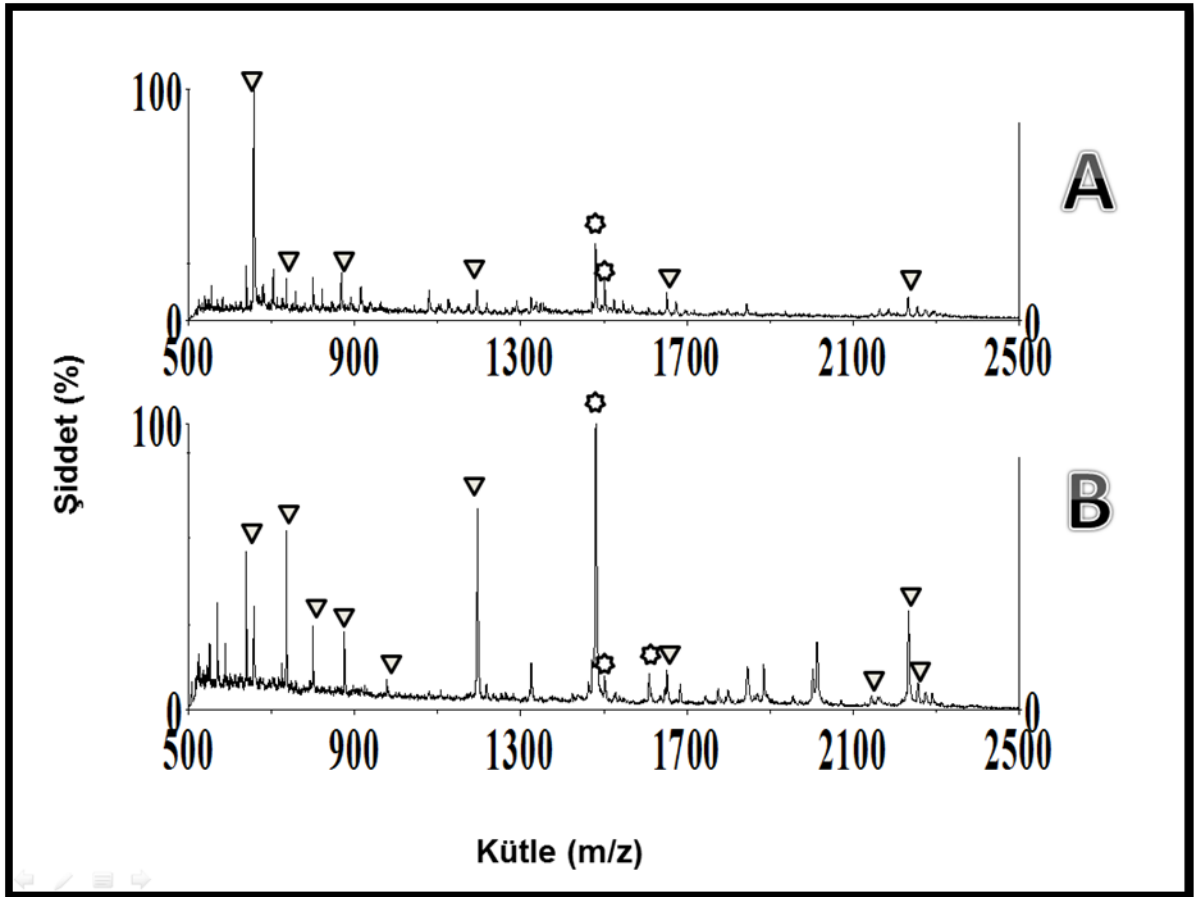
Şekil 4.3. Aynı koşullarda düşük derişimli (0.07 pmol/ μ L) trombin proteininin (A) aptamer kullanılarak uygun yöntemle zenginleştirilmesinin öncesinde, (B) 5'-([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG-3' dizilimine sahip trombin aptameri ile uygun yöntemle zenginleştirme sonrasında elde edilen enzimatik parçalanmasının peptit fragment kütlelerini gösteren MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.2. Trombin Proteininin Enzimatik Parçalanma Koşullarının Belirlenmesi

Enzimatik parçalamayı gerçekleştirmek amacıyla tripsin enzimi seçilmiş ve değişik miktarlarda tripsin enzimi kullanılarak 37 °C' de 2,5 saat boyunca parçalama işlemleri yapılmıştır. Buradaki kritik nokta; enzimin gereğinden fazla kullanılması durumunda enzimin otokataliz ürünlerinin trombine ait peptit fragment sinyallerini baskılıyor olmasıdır. Şekil 4.4' te görüldüğü üzere, enzim derişimi düşürüldüğünde baskılama azalacağı için çok daha yoğun trombin peptit sinyalleri elde edilebilmektedir.

Çizelge 4.1. Tripsin enzimi ile parçalanmış trombin proteinine ve tripsin otokataliz ürünlerine ait peptit fragmentlerinin kütleleri.

<i>Trombin Peptit Fragment Kütleleri</i>	<i>Tripsin Otokataliz Ürünleri Kütleleri</i>
656.35	1077.52
671.32	1478.73
720.39	1611.80
798.46	2163.05
874.47	2273.15
947.55	
954.55	
977.48	
1189.57	
1194.60	
1234.65	
1333.67	
1490.80	
1652.86	
1775.93	
1912.97	
2000.09	
2013.95	
2144.97	
2254.01	



Şekil 4.4. Aynı koşullarda, (A) 1.0 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalama ve (B) 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalama sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.

Trombine ait peptit fragmentler ▽ ve

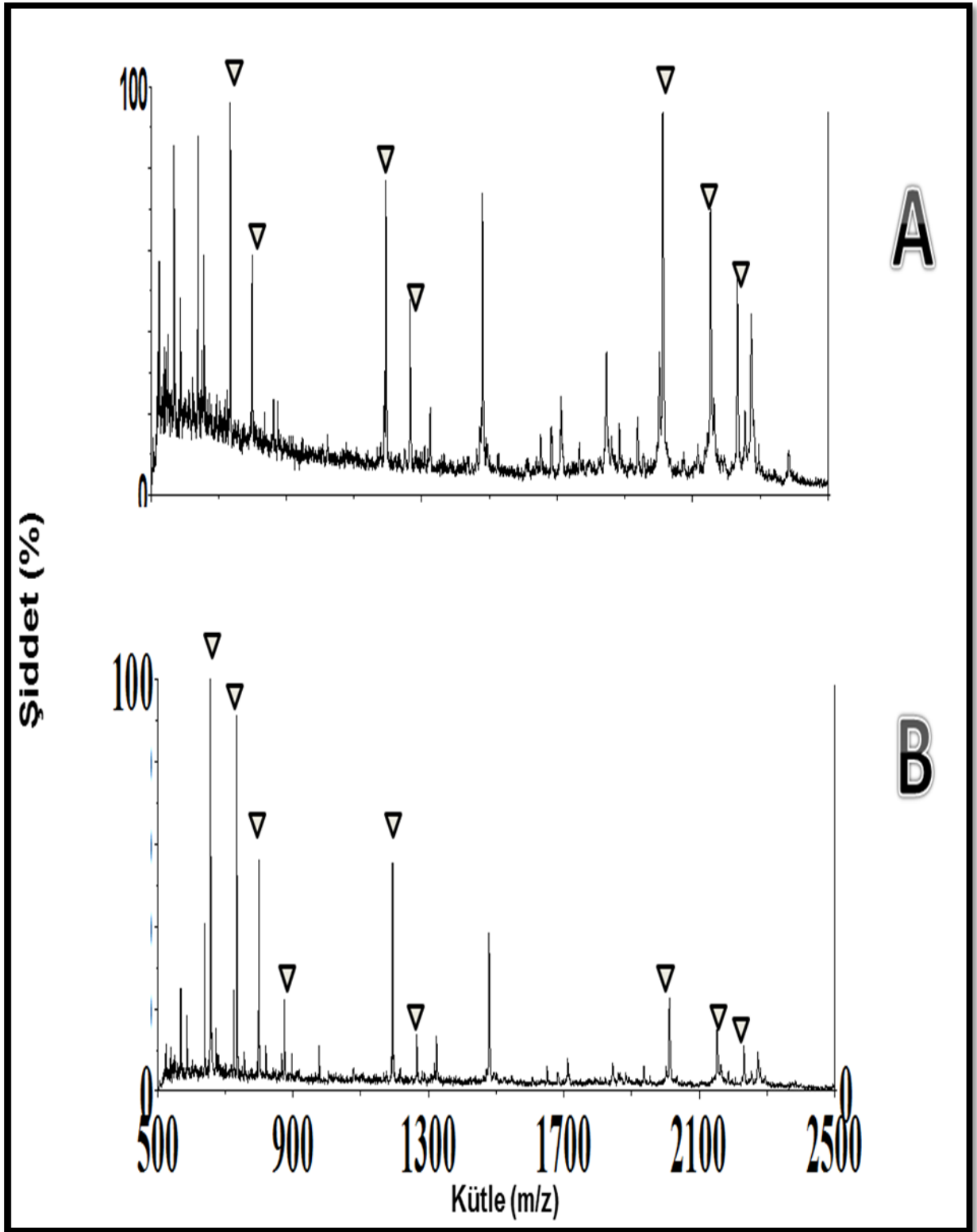
tripsin enzimine ait peptit fragmentleri * simgesi ile ifade edilmiştir.

Kütle spektrometrik analizlerin yorumlanmasıyla; trombin proteinine ait maksimum sayıda peptit fragmentlerinin sinyallerinin elde edilebilmesi için enzimatik parçalama süresi, ortam sıcaklığının ayarlanması, kullanılan enzim derişimi gibi koşullar optimize edilmiştir. Tripsin otokataliz ürünlerinin trombine ait peptit fragment sinyallerini baskılamaması adına triptik parçalama işlemleri için 0,1 mg/mL gibi düşük bir derişimde tripsin enzimi kullanılmıştır.

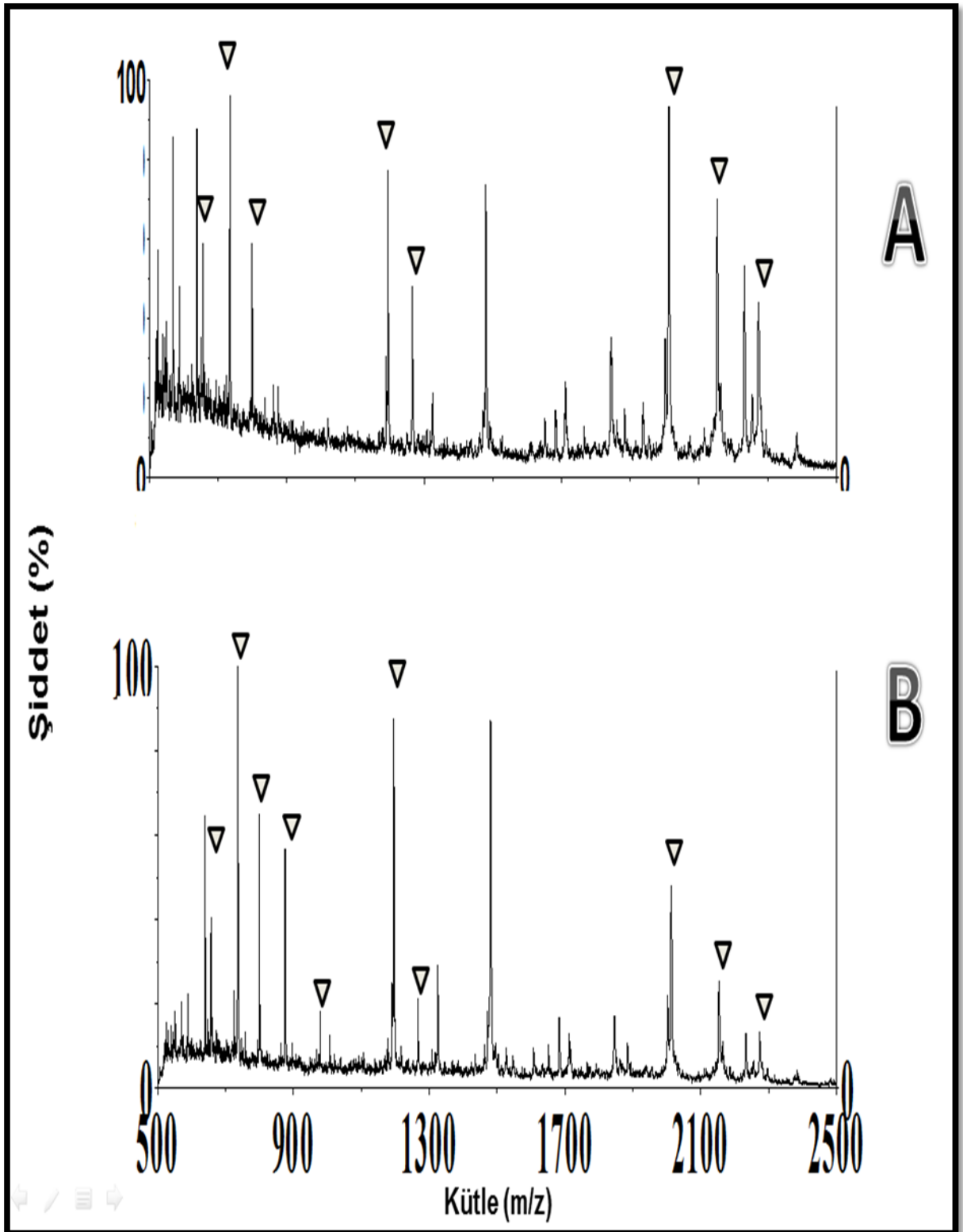
4.3. Trombin aptamerinin 5' ya da 3' uçlarından modifikasyonunun hedef protein ile etkileşimindeki etkisinin incelenmesi:

Aptamerlerin yüzeye 5' ya da 3' uçlarından bağlanmalarının aptamer-protein etkileşimi üzerine etkisinin incelenmesi için; 5' ucundan ([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) ve 3' ucundan (TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]) tiyol modifiye edilmiş aptamerler geliştirilmiş olan analitik yöntemle polimerik yüzeye bağlanmış ve hedef proteinle etkileştirilmiştir. Geliştirilen yöntem kullanılarak, 5' ucundan ([AmC6T]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) ve 3' ucundan (TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]) amin modifiye edilmiş aptamerler de polimerik yüzeye bağlandıktan sonra trombin proteini ile etkileşime tabi tutulmuştur.

Aptamere bağlanan trombin proteininin triptik parçalama işlemleri sonrasında yapılan MALDI-TOF-MS analiz sonuçları Şekil 4. 5. ve Şekil 4. 6. 'da görülmektedir. 5' ucundan ya da 3' ucundan gerçekleştirilmiş modifikasyonlar için trombine ait peptit fragmentleri göz önüne alındığında çok büyük bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Spektrumlar incelendiğinde, aynı dizilime sahip trombin aptamerine tiyol ya da amin modifikasyonu uygulanıp yüzeye bağlandıktan sonra trombin hedef proteini ile etkileşiminin gösterdiği peptit fragmentleri sayısında 3' veya 5' ucuna arasında çok büyük bir fark olmadığı görülmektedir. Literatürde 5' ucundan gerçekleştirilen tiyol modifikasyonların veriminin yüksek olmasının beklenmesinin yanı sıra, yüzey plazmon rezonans (SPR) ve elektrokimyasal analiz teknikleriyle yapılan deneysel çalışmaların sonucunda tiyol modifikasyonuna sahip trombin aptamerinin 5' ve 3' uçlarının trombine olan ilgisinin aynı olduğu belirtilmektedir [37]. Tez kapsamında yapılan çalışmalar, incelenen literatür bilgisini destekler niteliktedir. Bu bilgilere ek olarak, amin modifikasyonuna sahip trombin aptamerinin de trombin ile olan etkileşime ilgisinin 5' ve 3' uçlarında çok farklı olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Tiyoil modifiye (A) 3' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.6. Amin modifiye (A) 3' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5' ucundan modifikasyona uğratılmış trombin aptameri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

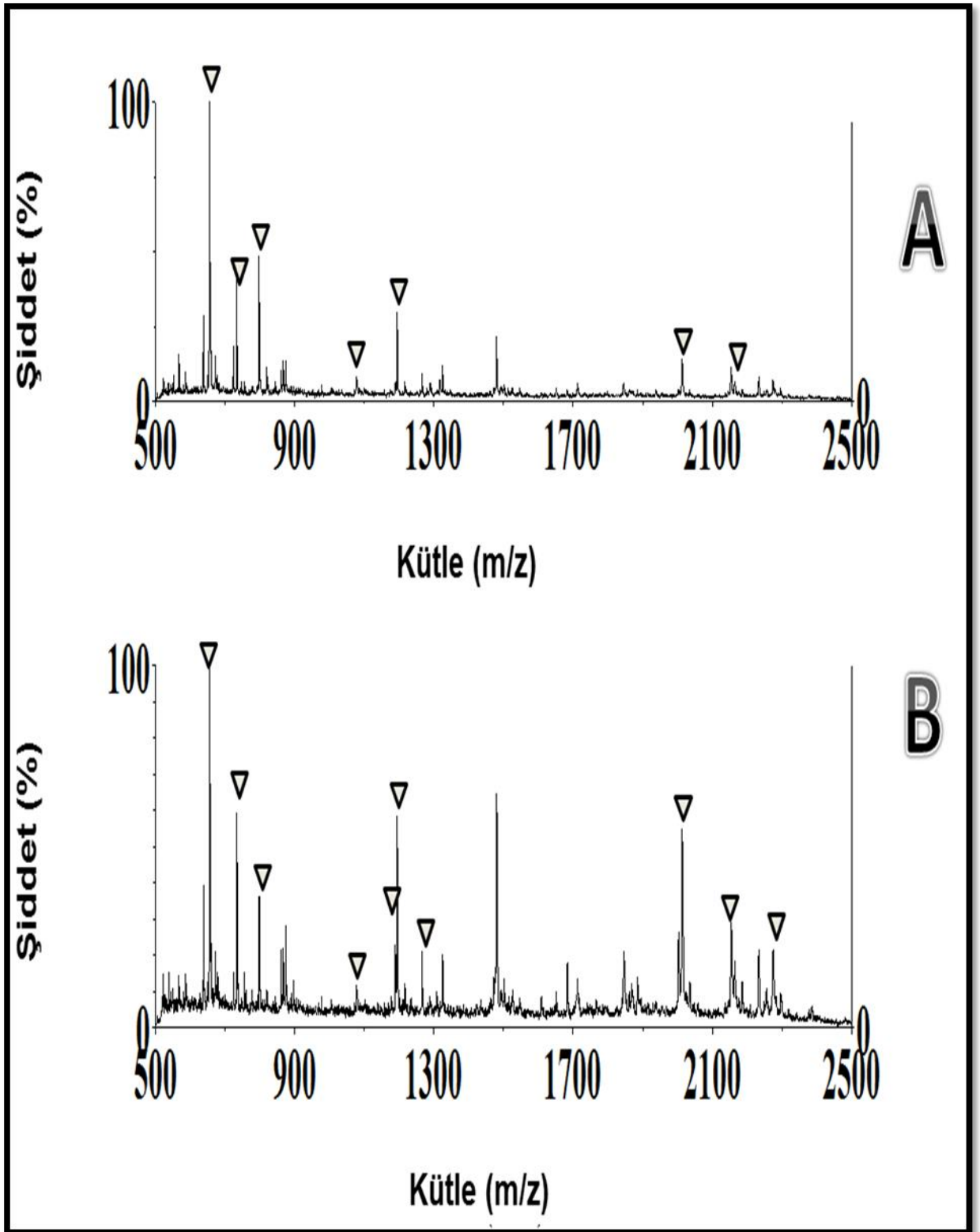
4.4. Trombin aptamerlerinin uçlarındaki farklı fonksiyonel gruplar üzerinden yüzeye bağlanma durumlarındaki değişimlerin trombin-aptamer etkileşimi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.

Trombin aptamerleri bağlanmanın gerçekleşeceği uç modifikasyona bağlı olarak uygun çapraz bağlayıcılarla amin fonksiyonel gruplu PS-DVB mikrokürelere sabitlenerek hedef proteinle etkileştirilmiştir.

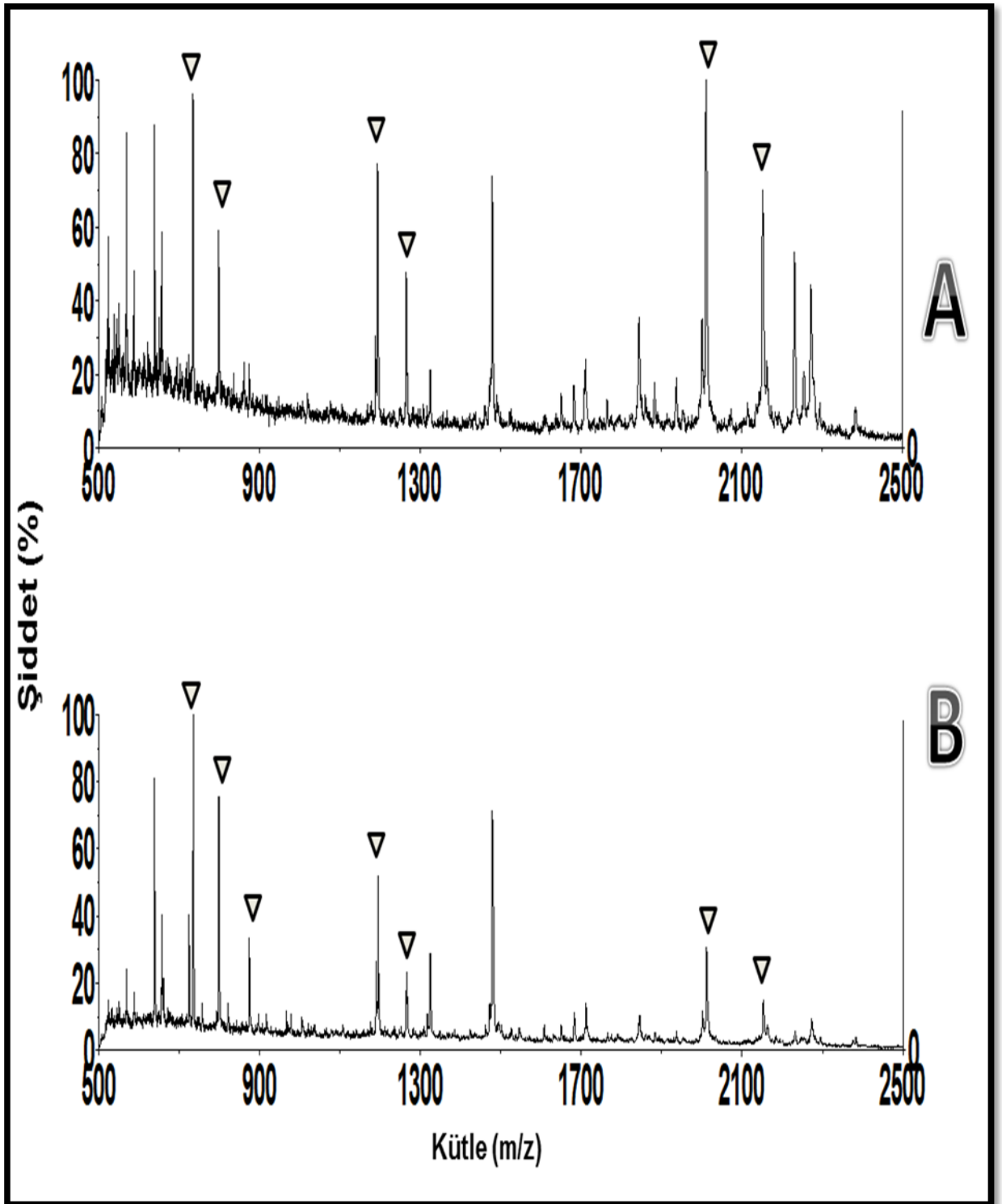
5' ucunda, tiyol fonksiyonel grubu bulunan trombin aptameri ([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG), amin fonksiyonel gruplu PS-DVB mikrokürelere Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısı aracılığıyla bağlanmıştır. Elde edilen aptamer bağlı yüzeyin, trombin çözeltisiyle inkübe edilmesinin ardından, aptamere bağlanan trombin proteini tripsin enzimi ile parçalanmıştır. Aynı işlemler, 5' ucunda amin fonksiyonel grubu bulunan trombin aptamerinin ([AmC6T]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) BS³ çapraz bağlayıcısıyla PS-DVB yüzeye bağlanmasının ardından tekrarlanmıştır. Kütle spektrometrik analizler sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.7.' de verilmiştir.

3' ucunda tiyol ve amin fonksiyonel gruplarına sahip TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6] ve TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T] dizilimlerdeki aptamerler de aynı analitik yöntem kullanılarak hedef proteinle etkileştirilip, triptik parçalama uygulandıktan sonra MALDI-TOF-MS analizi gerçekleştirilerek Şekil 4.8.' deki spektrumlar elde edilmiştir.

DNA aptamerleri G-kuadrupleks yapıya sahip olabilirler ve bu yapı aptamerin hedef moleküle bağlanmasını sağlamaktadır. Özellikle G-kuadrupleks yapısındaki trombin aptameri trombin proteinine bağlanır ve oldukça kararlı bir aptamer-protein kompleksi oluşturur. Elde edilen analiz sonuçlarına göre, aynı deney koşulları altında amin modifiye trombin aptameri kullanıldığında trombin proteinine ait peptit sinyallerinin, tiyol modifiye aptamer kullanılması durumunda elde edilen sinyallere kıyasla daha yoğun olduğu görülmektedir. Hedef proteinin aptamere tutunmasının, amin modifiye aptamerler için amin modifiye yüzey ve homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcı olan BS³ kullanıldığında az da olsa daha etkili olduğu gözlenmiştir.



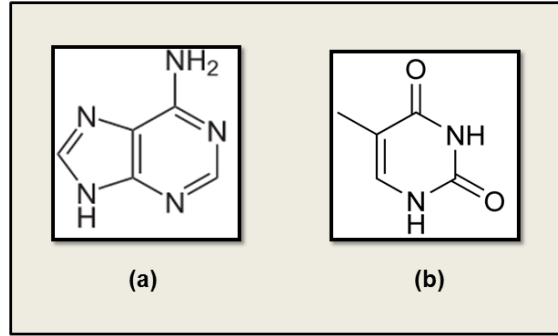
Şekil 4.7. (A) 5' ucundan **tiyol** modifiye trombin aptameri ([ThiC6]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 5'ucundan **amin** modifiye trombin aptameri ([AmC6T]TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG) kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.8. (A) 3' ucundan **tiyol** modifiye trombin aptameri (TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[ThiC6]) kullanılarak gerçekleştirilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS analizi ve (B) 3'ucundan **amin** modifiye trombin aptameri (TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG[AmC6T]) kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.5. Trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etki etmesine göre trombin - aptamer etkileşimlerinin değerlendirilmesi

Trombin DNA aptameri dizilimine eklenen baz birimi olarak Şekil 4.9.' da yapıları gösterilen adenin ve timin baz birimleri seçilmiştir. Eklenen farklı türdeki baz birimlerinin aptamer-hedef molekölü etkileşimine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 4.9. (a) Adenin nükleotidi baz biriminin kimyasal yapısı ve (b) Timin nükleotidi baz biriminin kimyasal yapısı.

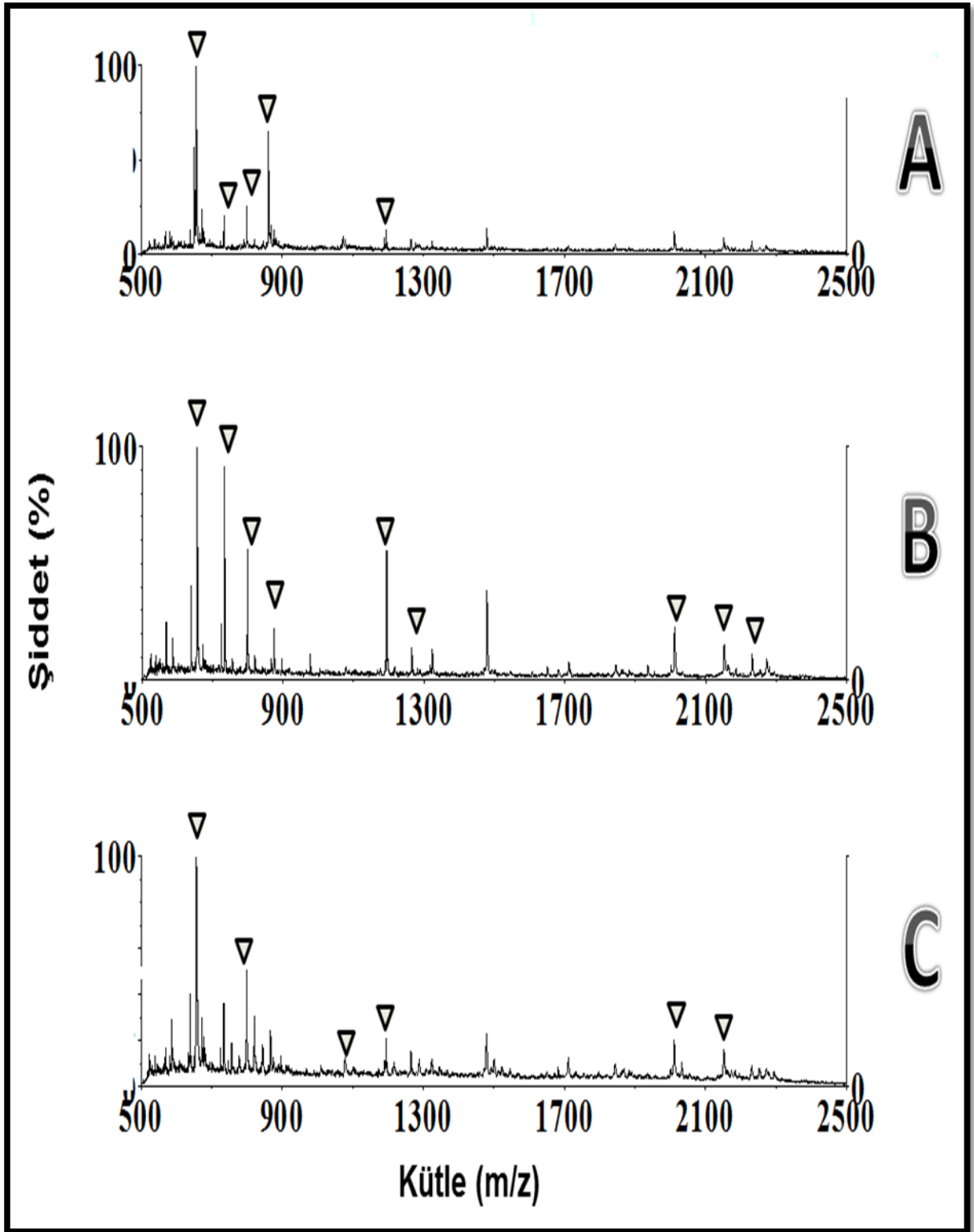
4.5.1. Tiyol modifikasyonunda trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etkileri

Trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etki etmesine göre trombin - aptamer etkileşimlerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan deneylerde; 3,6 ve 12 timin baz birimi içeren, trombin aptamerleri 5' ve 3' uçlarında bulunan tiyol (-SH) fonksiyonel grubu üzerinden uygun çapraz bağlayıcıyla PS-DVB mikrokürelere üzerine tutturulmuş ve 3,5 pmol/μL insan trombini çözeltisi ile muamele edilmiştir. Trombin moleküllerinin yüzeye adsorbsiyonundan sonra, tripsin enzimi ile parçalama gerçekleştirilmiş, kütle spektrometrik analiz sonuçları yorumlanmıştır.

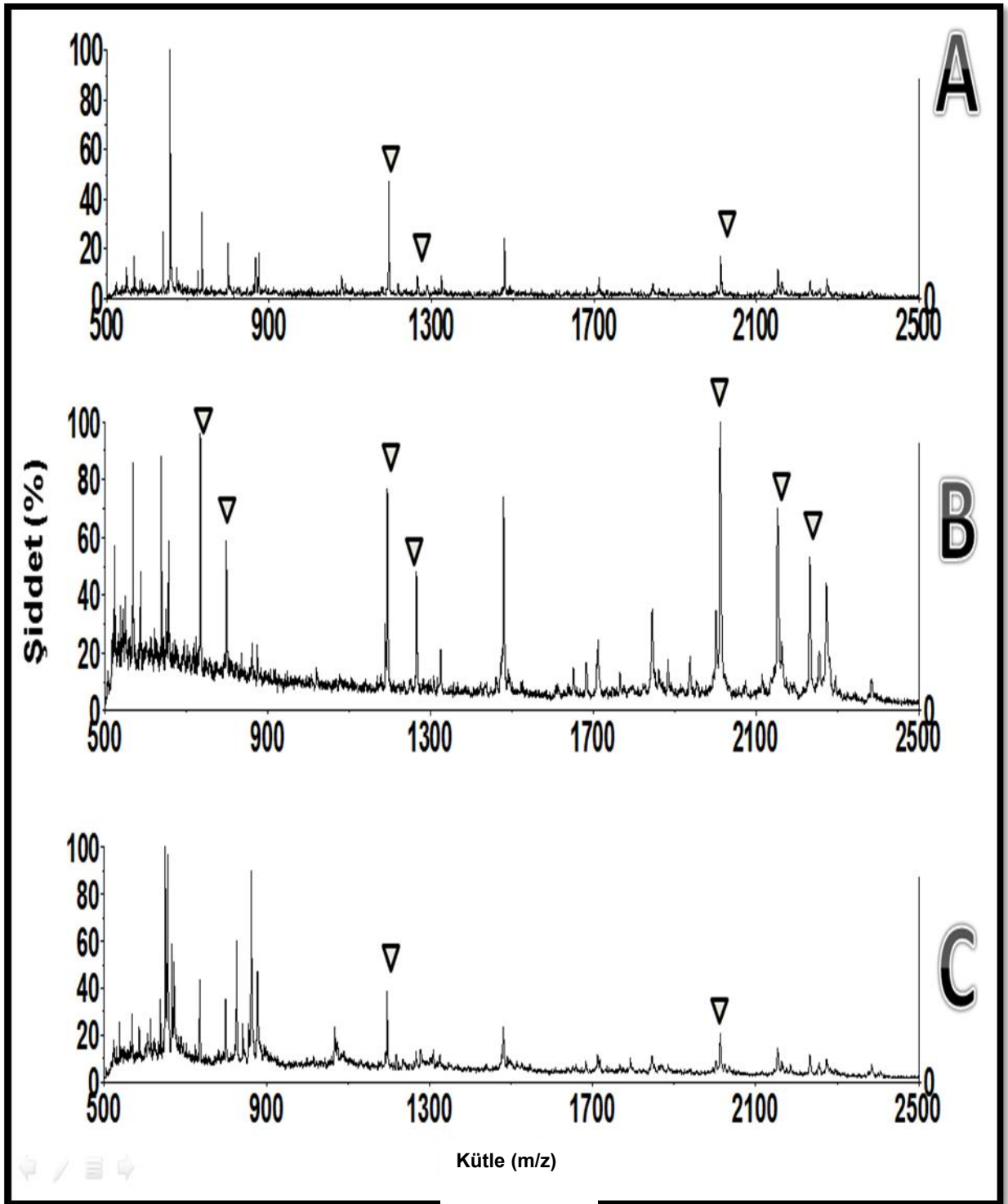
Şekil 4.10. ve Şekil 4.11' da görülen spektrumlardan anlaşılacağı üzere; 5' ucunda 6 timin baz birimi içeren 'TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG' dizilimine sahip trombin aptameri kullanıldığında, 5' ucunda 3 ve 12 baz birimi içeren aptamerlere kıyasla sayıca daha fazla trombine ait peptit fragment sinyalleri elde edilmektedir. Aynı sonuca, 3' ucundan yüzeye bağlanıp hedef moleköl trombin ile etkileşime geçen aptamer için de varılmaktadır. Trombin aptamerine 3 ve 12 adet timin baz birimi eklendiğinde, aptamer-protein etkileşiminin daha düşük olduğu gözlenmektedir. Aptamer-hedef moleköl etkileşimlerinde aptamerin geometrik yapısı çok büyük

öneme sahiptir. 3 adet timin baz birimi eklendiğinde aptamer hala uygun bir şekilde yüzeyden uzağa yerleşemediği ve yüzeyin sterik etkisinden dolayı proteinin uygun şekilde aptamere yaklaşmasının ve etkileşiminin zorlaştığı görülmektedir. 12 adet timin baz birimi olması durumunda ise, aptamer bağlanmış kolun uzun olması ve konformasyon değişimleri ile uzun bağlantı kısmının yüzeye ilave etkileşimlere girebilmesi, dolayısıyla proteinin yine yaklaşması için uygun ortam oluşturmamasından dolayı protein zenginleştirmede etkin görev alamaması görülmektedir. Bu nedenle sonuç olarak 6 timin uzatması ile elde edilen bağlantı elemanının en uygun şartı sağladığı tespit edilmiştir.

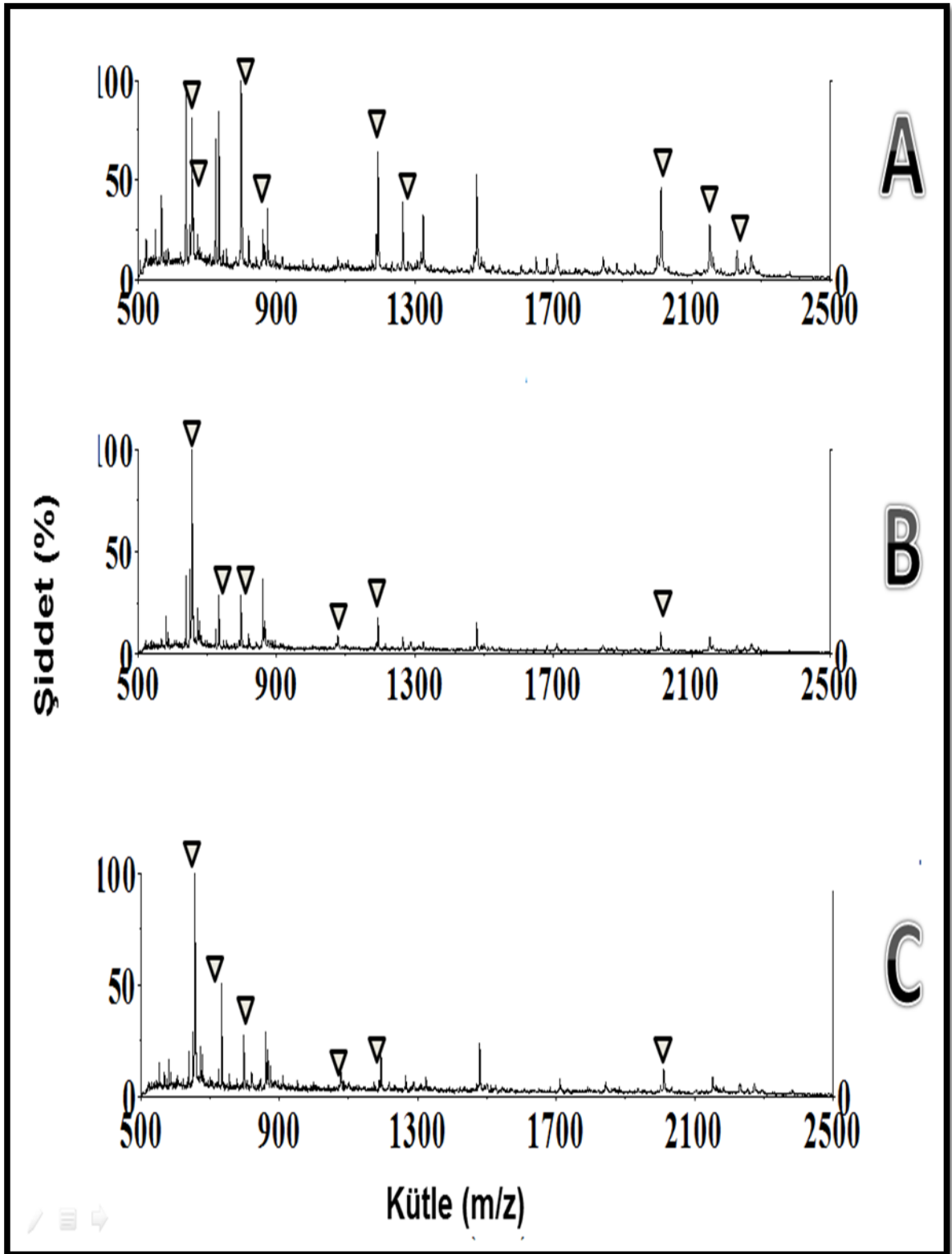
Aptamerlerin 5' ve 3' uçlarındaki tiyol modifikasyonu sabit tutulup dizilimde uç gruplarda yer alan timin baz birimleri yerine 3, 6 ve 12 adet adenin baz birimi yapıya eklendiğinde, aynı analitik yöntemler kullanılarak yapılan analizler sonucu elde edilmiş spektrumlar Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.' de gösterilmektedir. 3 adenin baz birimi içeren 'AAAGGTTGGTGTGGTTGG' dizilimine sahip trombin aptameri kullanıldığında, uç gruplarında 6 ve 12 baz birimi içeren aptamerlere kıyasla sayıca daha fazla trombine ait peptid fragment sinyalinin elde edildiği görülmektedir. Adenin baz biriminin yapısına bağlı olarak, 3 adenin eklenme durumunda en uygun protein zenginleştirme ortamı oluşturulmuştur. Timin yerine adenin baz birimi ile uçlardan uzatma yapıldığında, 6 yerine 3 baz birimi eklenmesi durumunda en etkin hal elde edilmiştir. 6 ve 12 adenin baz birimi eklendiğinde ise konformasyonel değişimler uzun zincir için kolay olabilmekte ve aptamer uzantı elemanı yüzeye daha kolay etkileşime girerek proteinin aptamere yaklaşmasını engelleyebilmektedir.



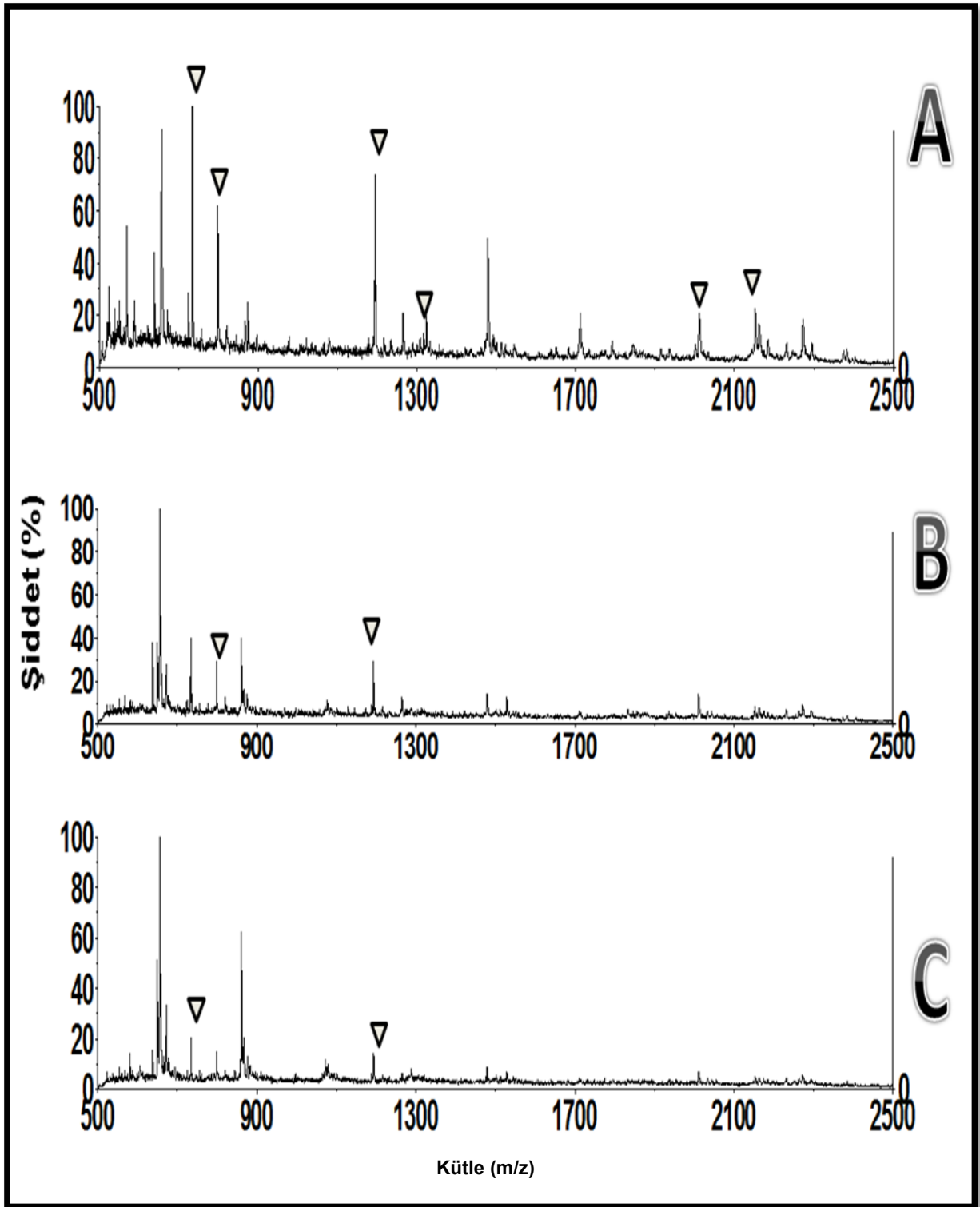
Şekil 4.10. 5' Ucundan tiyol modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.11. 3' Ucundan tiyol modifiye (A)TTTGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombi aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.12. 5' Ucundan tiyol modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda alınan pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

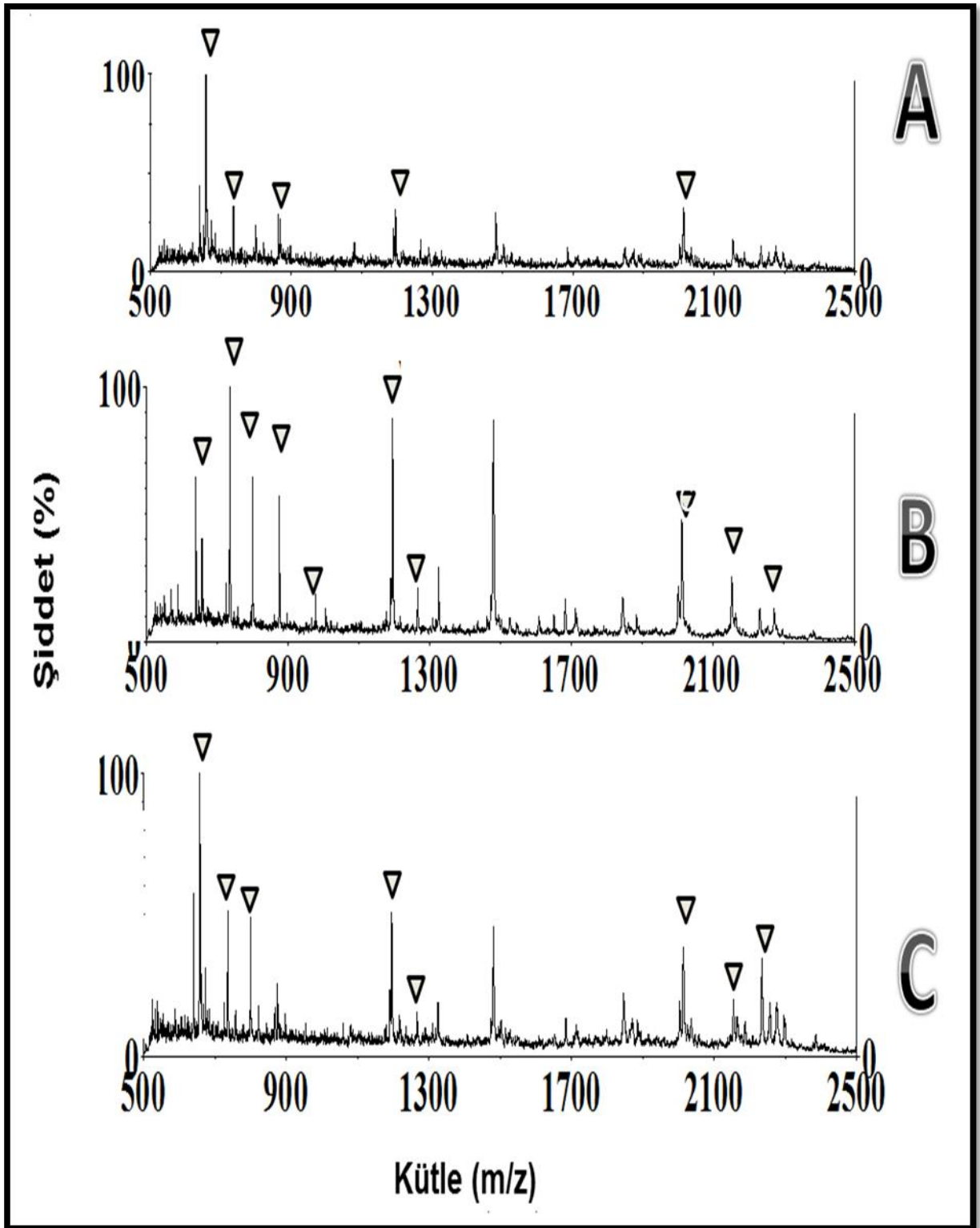


Şekil 4.13. 3' Ucundan tiyol modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

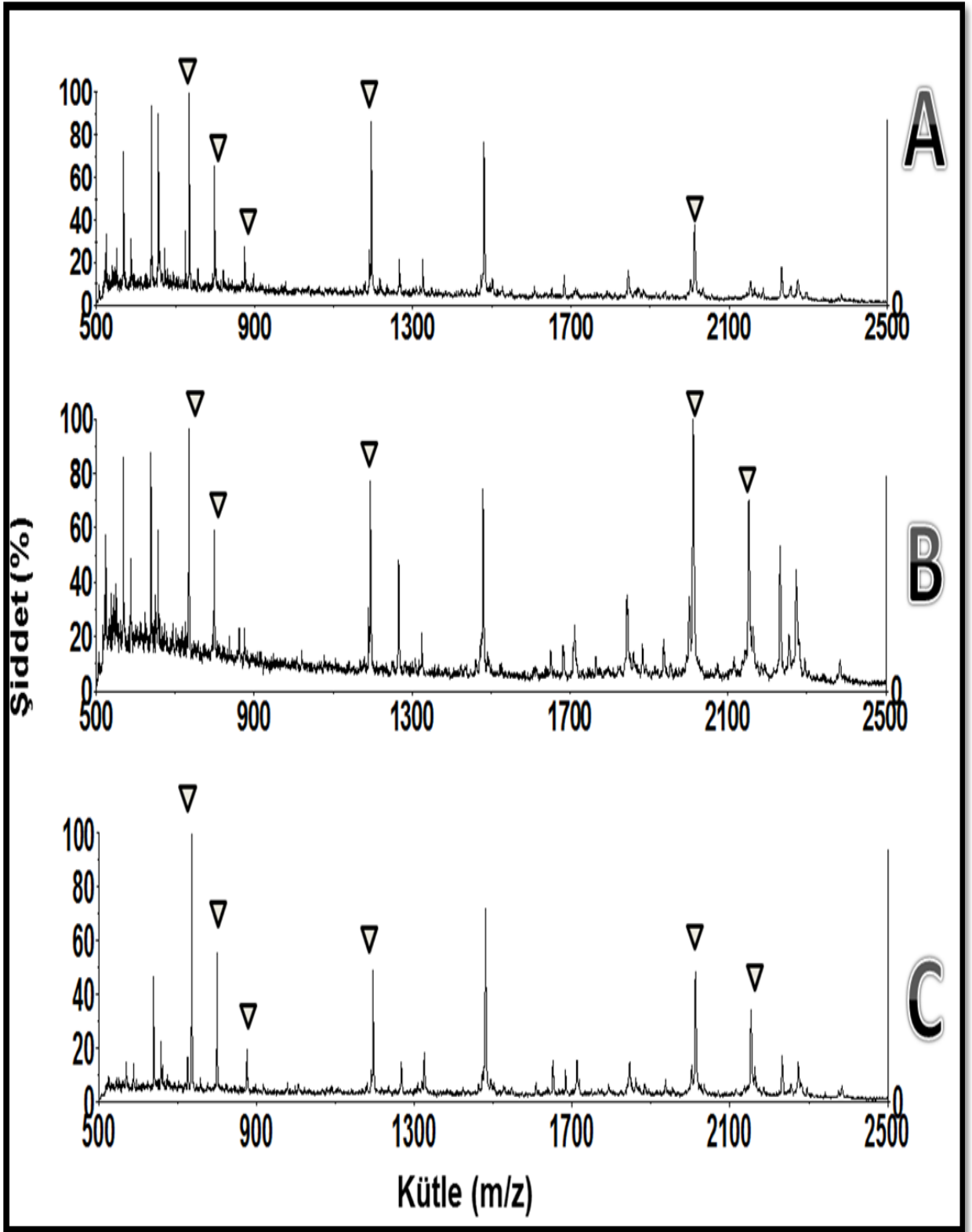
4.5.2. Amin modifikasyonunda trombin aptameri dizilimine eklenen baz birimi sayısı ve çeşidinin aptamerin yüzeye bağlanma durumuna etkileri

Geliştirilmiş olan aynı deneysel yöntem, 3' ve 5' uçlarında 3, 6, 12 timin veya adenin baz birimi içeren ve amin ($-NH_2$) fonksiyonel grupları üzerinden yüzeye bağlanmış aptamerler kullanılarak tekrarlanmıştır. En uygun protein etkileşimleri; 5' ucu için dizilimine eklenen 6 timin baz birimi ve 12 adenin baz birimi olarak (Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.), 3' ucu için ise 12 adenin baz birimi olarak gözlenmiştir (Şekil 4.16.). 3' ucu için farklı timin sayılarına sahip trombin aptamerlerinde trombin-aptamer etkileşimleri birbirine çok benzer bulunmuştur (Şekil 4.17).

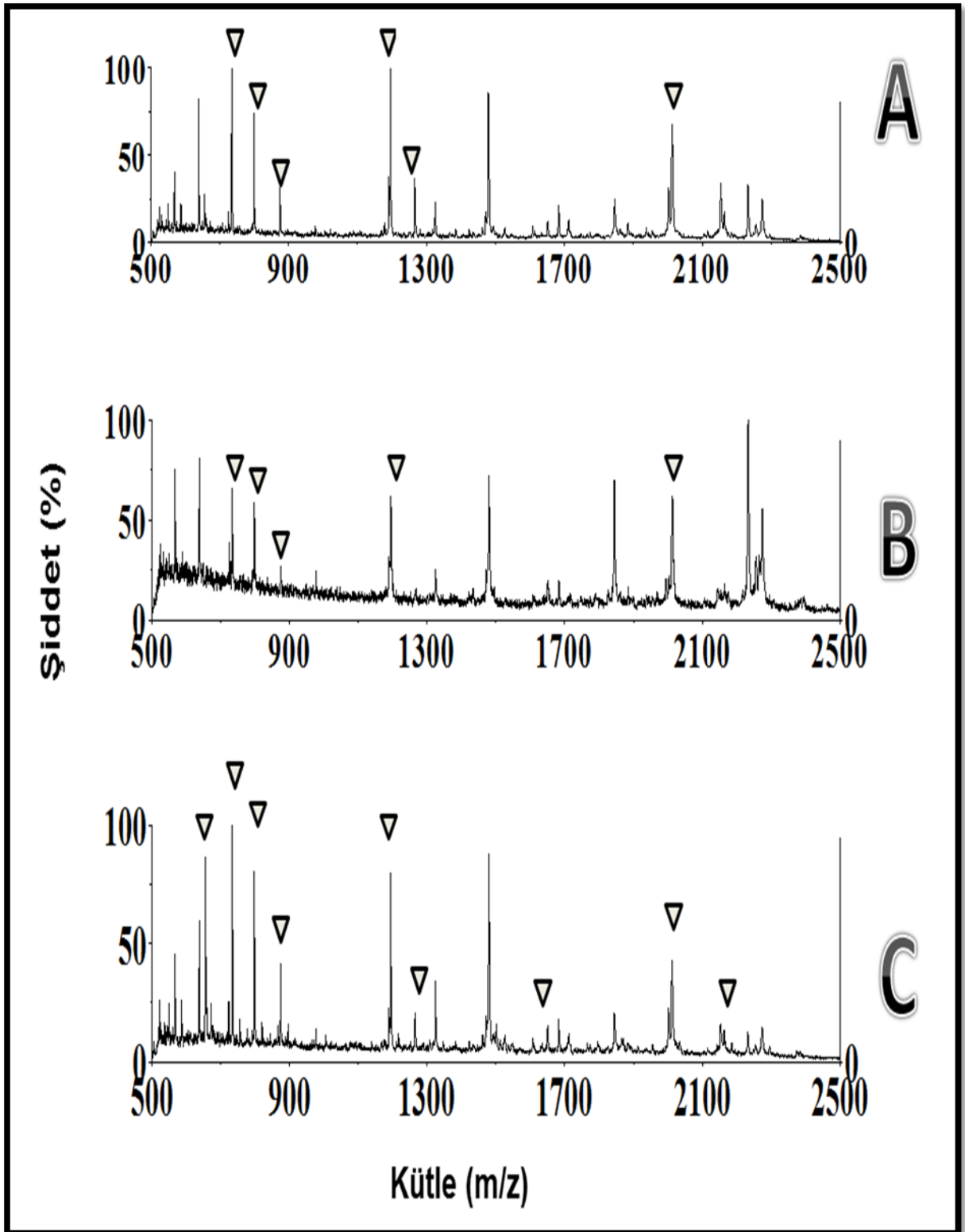
Ancak bu deneysel sonuçlardan görüldüğü üzere uç modifikasyon $-SH$ dan $-NH_2$ ye dönüştüğünde bağlantı elemanındaki baz birimi sayılarının sonuçlara da etkisi (uygun protein zenginleştirilmesi için) oldukça fazla değişiklik göstermektedir. Uç grubun $-NH_2$ grubu olması durumunda aptamer uzantılarında bulunan baz birimlerinin yüzeye etkileşimleri azalmakta ve daha uzun baz birimli bağlantı elemanları sterik etkinin de azalmasından dolayı protein zenginleştirilmesinde daha aktif duruma gelmekte olduğunu göstermektedir. Ancak baz birimi sayısı çok etkili olmamakla birlikte yüksek sayıda bağlantı elemanı içeren durumda yukarıda da belirtildiği gibi sterik etkinin az olması nedeniyle az da olsa bir iyileşme oluşmaktadır.



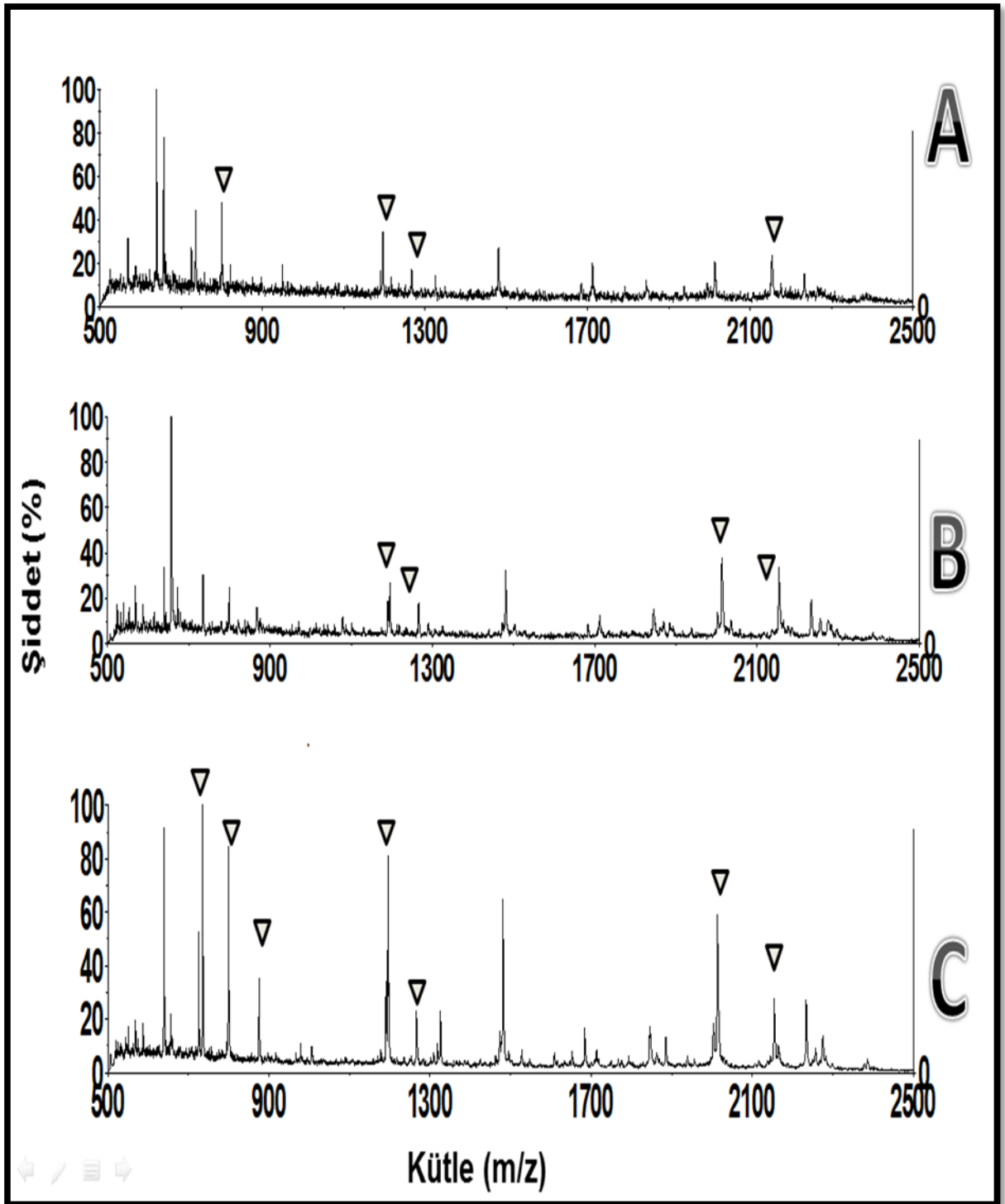
Şekil 4.14. 5' Ucundan amin modifiye (A)TTTGGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.15. 3' Ucundan amin modifiye (A)TTTGTTGGTGTGGTTGG, (B)TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları



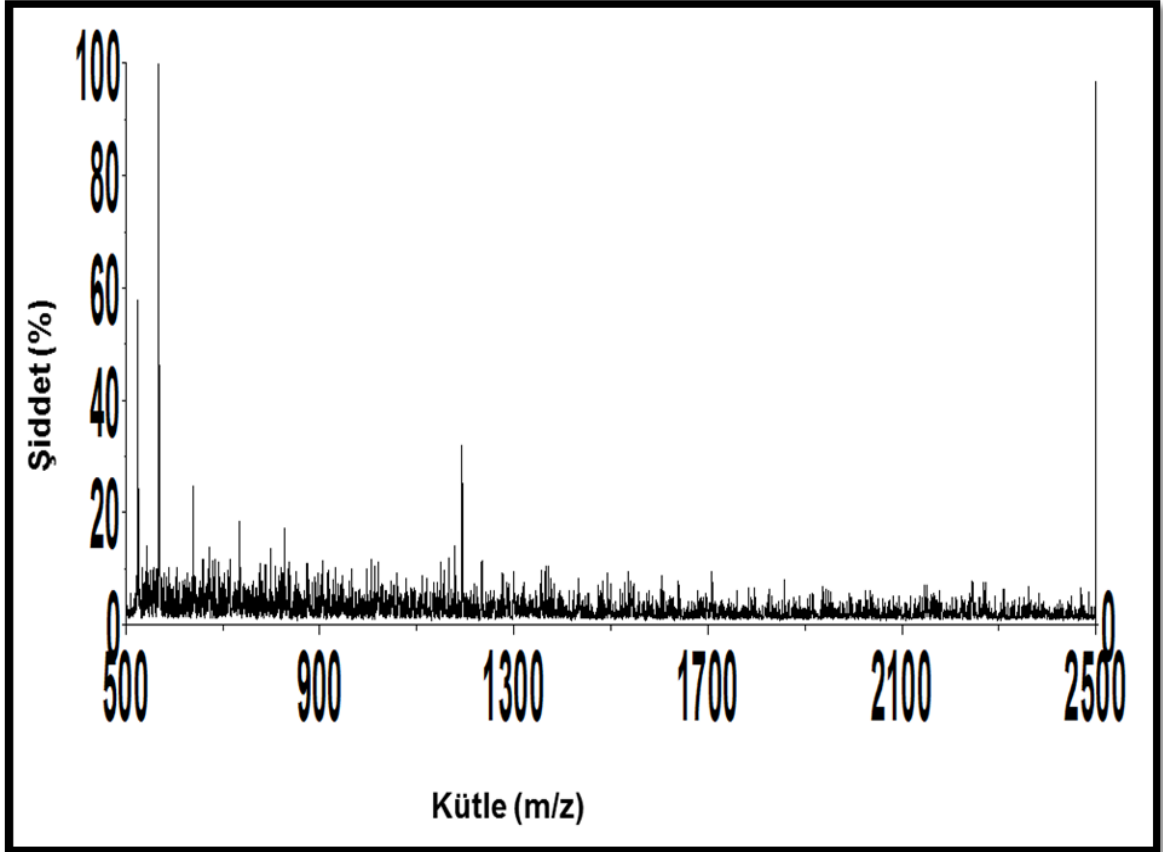
Şekil 4.16. 5' Ucundan amin modifiye (A) AAAGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.17. 3' Ucundan amin modifiye (A) AAAGGTTGGTGTGGTTGG, (B)AAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG ve (C)AAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG baz birimi dizilimlerine sahip trombin aptamerleri kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonucunda elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.6. Aptamer bağlanmamış yüzeyin trombin proteini ile muamele edilmesinin incelenmesi

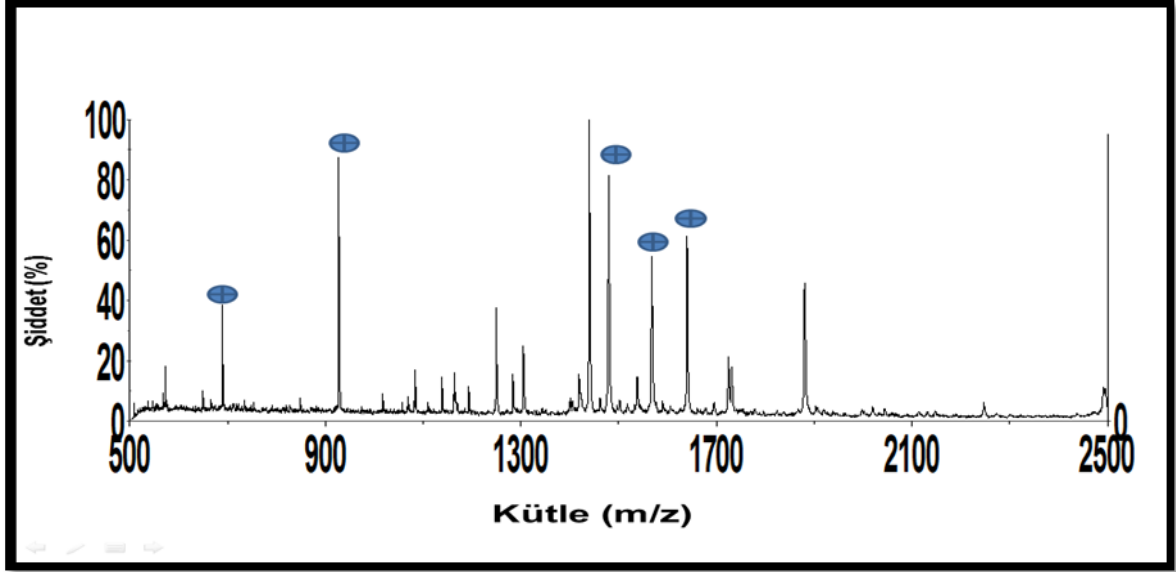
Amin fonksiyonel grulu PS-DVB mikrokürelere aptamer bağlanmadan trombin proteini muamelesi ve polimerik yüzeyde yapılan tripsinle parçalama işlemi sonrasında MALDI-TOF-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Alınan spektrumlarda, safsızlıktan kaynaklı türlere rastlanırken trombin proteininin peptit fragment kütlelerine ait sinyaller gözlenmemektedir (Şekil 4.18.). Yapılan bu çalışma kontrol deneyi niteliğinde olup, trombini özgün olarak tanıyan trombin aptamerinin bulunmadığı ve aptamer kullanarak gerçekleştirilen zenginleştirme işlemi uygulanmayan bir ortamda trombine rastlanmadığı gözlenmiştir.



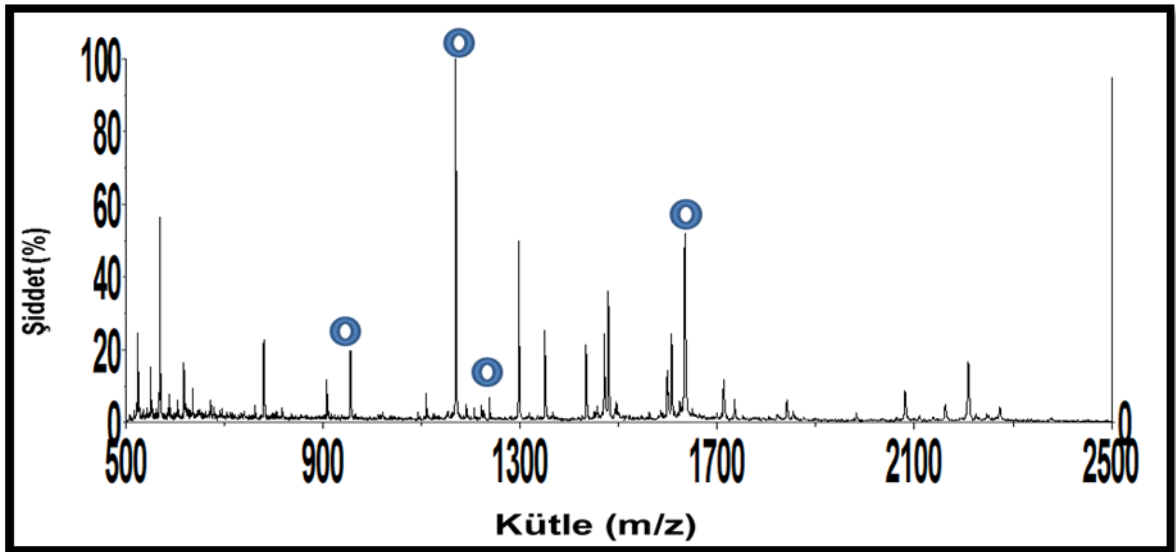
Şekil 4.18. Aptamer bağlanmamış amin fonksiyonel grulu yüzey ile muamele edilen trombin proteininin enzimatik parçalama sonrasında elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.7. Trombin aptameri bağlanmış yüzey ile karışım halindeki protein çözeltisinin etkileşiminin incelenmesi.

Aynı enzimatik parçalama koşulları altında 7 pmol/μL BSA ve 7 pmol/μL Sitokrom c proteinleri çözeltileri triptik parçalamaya uğratarak, peptit fragment kütleleri belirlenmiştir (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.) BSA'ya ait peptit fragmentleri ⊕ ve Sitokrom c'ye ait peptit fragmentleri ⊙ simgesi ile ifade edilmiştir.



Şekil 4.19. 7 pmol/μL BSA için 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalanma sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.

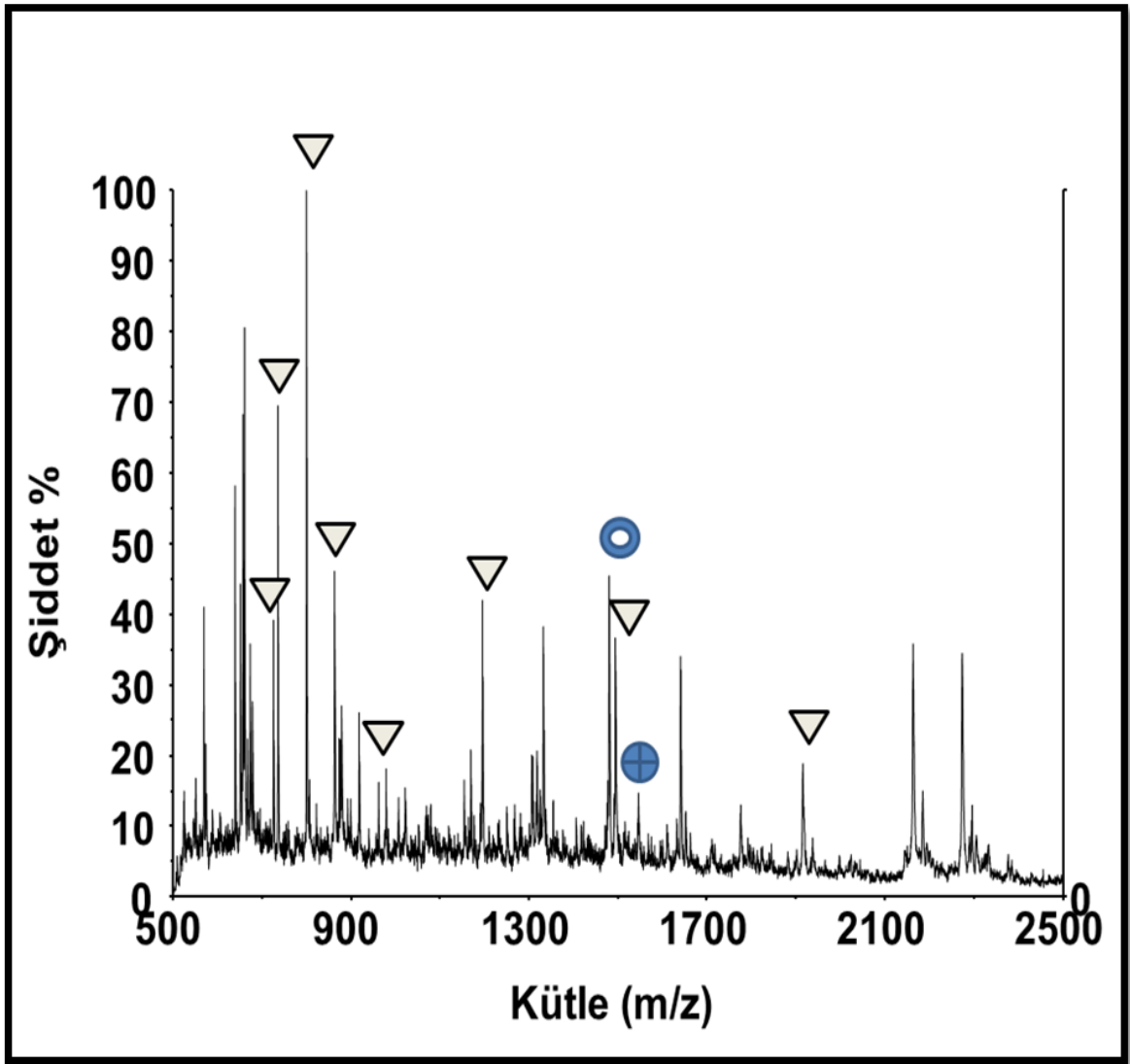


Şekil 4.20. 7 pmol/μL Sitokrom c için 0,1 mg/mL tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik parçalanma sonucunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.

BSA proteinine ait peptit fragment kütleleri; 689.31, 927.74, 1479.75, 1567.74 ve Sitokrom c proteinine ait peptit fragment kütleleri; 955.50, 1168.62, 1237.64, 1633.81 Da olarak bilinmektedir.

Trombin aptamerinin trombin proteini ile özgün bir etkileşime girdiğini göstermek amacıyla eşit derişimlerdeki 7 pmol/ μ L insan trombini, BSA ve Sitokrom c proteinlerinin karışımı, trombin aptameri bağı polimerik yüzey ile muamele edilmiştir. Trombin aptameri bağı yüzey triptik parçalamaya uğratılarak, aptamer ile etkileşime giren türler incelenmiştir.

Trombin aptameri bağı yüzeyle etkileşen hedef proteini trombinin peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyallerinin şiddetlerinin, ayırcılığının ve seçiciliğinin yüksek olduğu Şekil 4.21' de görülmektedir. Ortamda bulunan Sitokrom c proteinin en şiddetli sinyal veren peptit fragment kütlesi olan 1640 Da ve BSA'ya ait olduğu düşünölen 1478 Da piklerinin haricindeki sinyal şiddeti yüksek olan pikler hedef protein trombine aittir. Bu sonuçlar, trombin proteininin özgün olarak onun aptamerinin bağı olduğu yüzeyde zenginleştirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.21. Eşit derişimlerde trombin, BSA ve Sitokrom-c protein karışımının aptamer bağılı yüzey ile etkileşimi sonrasındaki triptik parçalamaya ait kütle spektrumu.

5. SONUÇLAR

- ✓ 3,5 pmol/ μ L derişime sahip trombin proteininin amin fonksiyonel gruplu polimerik yüzeye bağlanan aptamer ile etkileşiminin öncesinde ve sonrasında yapılan kütle spektrometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler incelendiğinde, hedef molekülü olan trombin derişiminin yüzey ile etkileşim sonrasında oldukça fazla miktarda azaldığı ve spektrumda izlenemediği görülmektedir.
- ✓ Proteinlerin bütün halinde MALDI-TOF-MS ile izlenmelerinin zor olması ve tayin edilebilme sınırlarının düşük olması sebebiyle analizlerde enzimatik parçalama uygulayarak peptit fragmentleri üzerinden yorumlandı.
- ✓ 0,07 pmol/ μ L gibi düşük derişime sahip trombin proteinine uygun yöntemle zenginleştirme yapılmıştır. Zenginleştirme öncesi trombine ait peptit fragment ürünlerine rastlanamıyorken, uygun yöntemle aptamer bağlı yüzeyde etkileşime tabi tutulduktan sonra yapılan enzimatik parçalamalar, trombine ait peptit fragment sayısında artışı, şiddet ve ayırıcılığı yüksek iyon sinyallerinin oluşmasını sağlayarak trombin tayinini mümkün kılmıştır.
- ✓ Triptik parçalamada, enzimin gereğinden fazla kullanılması durumunda enzimin otokataliz ürünlerinin trombine ait peptit fragment sinyallerini baskıladığı görüldüğünden tripsin derişimi 0,1 mg/mL olarak belirlenerek optimum koşullar sağlanmıştır.
- ✓ Trombin proteininin enzimatik parçalanması için disülfid bağları kırıldıktan sonra 2,5 saatlik enzimatik parçalama süresinin yeterli olduğu görülmüştür. Literatürde, enzimatik parçalama süresi 4 saat olarak belirtilirken [78], tez kapsamında çalışılan yöntem ile daha kısa sürede triptik parçalama gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Trombin aptameri uygun çapraz bağlayıcılarla yüzeye bağlanırken okunan pH değerleri ve ortam sıcaklığı optimum koşullarda ayarlanmıştır. Daha etkili bağlanmanın gerçekleştirilebilmesi için oda sıcaklığında 1,0 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak pH değeri 7,2 olarak ayarlanmıştır.
- ✓ Trombin aptameri-hedef molekül etkileşimlerine etki edebilecek her türlü parametre detaylı bir şekilde incelenmiştir. 3' ve 5' uçlarında amin ve tiyol olmak üzere iki farklı fonksiyonel grup bulunduran, uç gruplarında adenin ve

timin baz birimleri içeren 24 farklı aptamerin aynı şartlar altında hedef molekülüyle etkileşimi gözlemlenerek karşılaştırmalar yapılmıştır.

- ✓ Literatürde tiyol modifikasyonuna sahip trombin aptamerinin 5' ve 3' uçlarının trombine olan ilgisinin aynı olduğu belirtilmektedir [37]. Tez kapsamında gerçekleştirilen analizler incelenen literatür bilgisini desteklemesinin yanı sıra, aynı durumun amin modifikasyonuna sahip trombin aptamerleri için de geçerli olduğunu göstermektedir.
- ✓ Aynı baz dizilimine sahip trombin aptamerleri için amin modifikasyonu kullanıldığında trombin proteinine ait peptit sinyallerinin, tiyol modifiye aptamer kullanılması durumunda elde edilen sinyallere kıyasla daha yoğun olduğu saptanmıştır. Hedef proteinin aptamere tutunmasının, amin modifiye aptamerler için amin modifiye yüzey ve homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcı olan BS³ kullanıldığında az da olsa daha etkili olduğu görülmektedir.
- ✓ Tiyol uç modifikasyonuna sahip aptamerlerin 3' ve 5' uç gruplarından farklı sayıda timin baz birimi eklenerek bağlanmalar ve etkileşimler gerçekleştirilmiştir. Aptamerin geometrik yapısı aptamer-hedef molekül etkileşimlerinde çok etkili olduğundan, etkileşimi zorlaştıran veya kolaylaştıran etkileşimler kütle spektrometrik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Hem 3' hem de 5' ucundan tiyol modifikasyonu için en iyi etkileşimin 6 adet timin baz birimi eklendiğinde gerçekleştiği görülmüştür. 3 adet timin baz birimi eklendiğinde aptamer hala uygun bir şekilde yüzeyden uzağa yerleşememiş, yüzeyin sterik etkisinden dolayı proteinin uygun şekilde aptamere yaklaşmasının ve etkileşime girmesinin zorlaştığı görülmüştür. Eklenen 12 adet timin baz birimi olduğunda, aptamer bağlanmış kolun uzun olması ve konformasyon değişimleri ile uzun bağlantı kısmının yüzeyle ilave etkileşimlere girebilmesi, dolayısıyla proteinin yine yaklaşması için uygun ortam oluşturulmamasından dolayı protein zenginleştirmede etkin görev alamadığı görülmektedir.
- ✓ Tiyol uç modifikasyonuna sahip aptamerlerin 3' ve 5' uç gruplarından farklı sayıda adenin baz birimi eklenerek bağlanmalar ve etkileşimler gerçekleştirildiğinde, 3 adenin baz birimi içeren trombin aptameri kullanıldığında, uç gruplarında 6 ve 12 adenin baz birimi içeren aptamerlere kıyasla sayıca daha fazla trombine ait peptit fragment sinyali

elde edilmiştir. Adenin baz biriminin yapısına bağlı olarak, 3 adenin eklenme durumunda en uygun protein zenginleştirme ortamı oluşturulmuştur. 6 ve 12 adenin baz birimi eklendiğinde ise konformasyonel değişimler uzun zincir için kolay olabilmekte ve aptamer uzantı elemanı yüzeyle daha kolay etkileşime girerek proteinin aptamere yaklaşmasını engelleyebilmektedir.

- ✓ Amin uç modifikasyonuna sahip aptamerlerin 5' uç gruplarından farklı sayıda farklı baz birimi eklenerek bağlanmalar ve etkileşimler gerçekleştirildiğinde, birbirine kıyasla daha etkin olan etkileşimin 5' ucuna 6 timin veya 12 adenin eklenmesi durumunda görüldüğü saptanmıştır.
- ✓ Amin uç modifikasyonuna sahip aptamerlerin 3' uç gruplarından farklı sayıda adenin veya timin baz birimi eklenerek bağlanmalar ve etkileşimler gerçekleştirildiğinde ise, 12 adet adenin baz birimi eklenmesi en etkin sonucu vermiştir. Farklı timin sayılarına sahip trombin aptamerlerinde trombin-aptamer etkileşimlerinin birbirine çok benzer olduğu görülmüştür.
- ✓ Uç modifikasyonu NH_2 seçilip gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarında, aptamer uzantılarında bulunan baz birimlerinin yüzeyle etkileşimleri azalmakta ve daha uzun baz birimli bağlantı elemanlarının oluşturabildiği sterik etkinin de azalmasından dolayı az da olsa etkili sonuçlar alındığı görülmüştür.
- ✓ Trombin proteinini zenginleştirme çalışmaları göz önünde bulundurularak, trombini özgün olarak tanıyan trombin aptamerinin olmadığı kontrol deneyi niteliği taşıyan bir ortam hazırlanarak deneyler tekrarlanmıştır. Aptamer bağlanmamış yüzey trombin proteiniyle etkileşime tabi tutulduğunda, trombin özgün olarak bağlanma gerçekleştiremediğinden yüzeyde yapılan triptik parçalama sonrasında trombin peptid fragmentlerine rastlanmamıştır.
- ✓ Trombin aptamerinin trombin proteini ile özgün bir etkileşime girdiğini göstermek amacıyla eşit derişimlerdeki insan trombini, BSA ve Sitokrom c proteinlerinin karışımı, trombin aptameri bağlı olan polimerik yüzey ile muamele edildikten sonra yüzeyde enzimatik parçalamaya uğratarak aptamerle etkileşen protein türü belirlenmiştir. Enzimatik parçalamanın kütle spektrometrik analiz sonuçları iyon şiddeti ve pik sayısı en fazla olan türün aptamere özgün olarak bağlanan trombine ait olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular engineering*, 24, 381-403, **2007**.
- [2] Song, K., Lee, S., Ban, C., Aptamers and Their Biological Applications, *Sensors*, 12, 612-631, **2012**.
- [3] Sosic, A., Meneghello, A., Cretaio, E., Gatto, B., Human Thrombin Detection Through A Sandwich Aptamer Microarray: Interaction Analysis in Solution and Solid Phase, *Sensors*, 11, 9426-9441, **2011**.
- [4] Carothers, J.M., Oestreich, S.C., Szostak J.W., Aptamers selected for higher-affinity binding are not more specific for the target ligand., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 24, 7929–37, Jun. **2006**.
- [5] Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N., E., Thrombin: Physiology and Disease, *Springer*, Greece, **2009**.
- [6] McKeague, M., DeRosa, M., Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development, *Journal of Nucleic Acids*, 748913, 20, **2012**.
- [7] Chen, F., Gülbakan, B., Zenobi, R., Direct access to aptamer–protein complexes via MALDI-MS, *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 10, 4071, **2013**.
- [8] Shigdar, S., Macdonald, J., O'Connor, M., Wang, T., Xiang, D., Al Shamaileh, H., Qiao, L., Wei, M., Zhou S.F., Zhu, Y., Kong, L., Bhattacharya, S., Li, C., Duan, W., Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalization., *Sensors (Basel)*, vol. 13, no. 10, 13624–37, **2013**.
- [9] Wang, T., Function and dynamics of aptamers : A case study on the malachite green aptamer, Doktora Tezi, Iowa State University, Iowa, **2008**.
- [10] Ellington, A.D., Szostak J.W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346:818, 22, **1990**.
- [11] Tang, Z.W., Shangguan, D., Wang, K.M., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H.W., Li, Y., Tan, W.H., Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells, *Anal. Chem.*, 79, 4900-4907, **2007**.
- [12] Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C., Koch, T.H., Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers, *J. Biotechnol.*, 81, 167–178, **2000**.
- [13] Henry, A.A., Romesberg F.E., The evolution of DNA polymerases with novel activities. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 7-370, **2005**.
- [14] Kusser, W., Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving, *Biotechnol*, 74, 27-38, **2000**.

- [15] Nutiu, R., Li Y., Aptamers with fluorescence-signaling properties: *Methods*, 37, 16-25. **2005**.
- [16] Hoshika, S., Minakawa, N., Matsuda A., Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: application to post-modification of RNA aptamer toward NF-kappaB. *Nucleic Acids Res*, 32, 25-3815, **2004**.
- [17] Kato, Y., Minakawa, N., Komatsu, Y., Kamiya, H., Ogawa, N., Harashima, H., Matsuda, A., New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX. *Nucleic Acids Res*, 33, 51-2941, **2005**.
- [18] Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., Corvaia, N., The next generation of antibody drug conjugates comes of age, *Nat. Rev. Immunol*, 10, 345- 352, **2010**.
- [19] Ireson, C.R., Kelland, L.R., Discovery and development of anticancer aptamers, *Mol. Cancer Ther.*, 5, 2957–2962, **2006**.
- [20] Bunka, D.H., Stockley, P.G., Aptamers come of age—At last, *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 588–596, **2006**.
- [21] Gebhardt, K., Shokraei, A., Babaie, E., Lindqvist, B.H., RNA aptamers to S-adenosylhomocysteine: kinetic properties, divalentcation dependency, and comparison with anti-S-adenosylhomocysteine antibody, *Biochemistry*, 39, 7255-7265, **2000**.
- [22] James, W., Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery, *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 1, no. 5, 6-540, **2001**.
- [23] Min, K., Jo, H. Song, K.M., Cho, M., Chun, Y.S., Jon, S., Kim, W.J., Ban, C., Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers, *Biomaterial*, 32, 2124–2132, **2011**.
- [24] Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A., Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 9, 537–550, **2010**.
- [25] Lee, K.Y., Kang, H., Ryu, S.H., Lee, D.S., Lee, J.H., Kim, S., Bioimaging of nucleolin aptamer-containing 5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine more capable of specific binding to targets in cancer cells, *J. Biomed. Biotechnol*, **2010**.
- [26] Romig, T.S., Bell, C., Drolet, D.W., Aptamer affinity chromatography: Combinatorial chemistry applied to protein purification, *J. Chromatogr.*, 731, 275–284, **1999**.
- [27] Zhao, Q., Li, X.F., Shao, Y., Le, X.C., Aptamer-based affinity chromatographic assays for thrombin. *Anal. Chem.*, 80, 7586–7593, **2008**.
- [28] Iliuk, A.B., Hu, L., Tao, W. A., Aptamer in bioanalytical applications, *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 12, 52-4440, **2011**.

- [29] Hermann, T., Westhof, E., Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds, *J. Med. Chem.*, 42, 1250-1261, **1999**.
- [30] Cowan, J.A., Ohyama, T., Wang, D., Natarajan, K., Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions, *Nucleic Acids Res.* 28, 2935-2942, **2000**.
- [31] Tuerk, C., Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol. Biol.*, 67, 219-30, **1997**.
- [32] Hermann, T., Patel, D.J., Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Biochemistry Science*, 287, 820-825, **2000**.
- [33] Cho, E.J., Lee, J.W., Ellington, A.D., Applications of Aptamers as Sensors, *3 Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2, 241-64., **2009**.
- [34] Wang, K.Y., McCurdy, S., Shea, R.G., Swaminathan, S., Bolton, P.H., a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibit a new structural motif for DNA, *Biochemistry*, 32, 1899-1904, **1993**.
- [35] Holub., D.F., Immobilization Of The Anti-Thrombin DNA Aptamer : Attachment , Optimal Packing Density And Kinetics, Department of Chemistry and the Faculty of the Graduate School of the University of Kansas, *Doctor of Philosophy Thesis*, USA, **2005**.
- [36] Balamurugan, S., Obubufo, A., Soper, S., Spivak, D., Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, 1009-21, **2008**.
- [37] Park, B.J., Sa, Y.S., Kim, Y.H., Kim, Y., Spectroscopic and Electrochemical Detection of Thrombin / 5' -SH or 3' -SH Aptamer Immobilized on (porous) Gold Substrates, *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 33, 100-104, **2012**.
- [38] Karlsson, R., Falt, A., Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors, *J. Immunol. Methods*, 200, 121-133. **1997**.
- [39] Zhu, H., Suter, J.D., White, I.M., Fan, X., Aptamer Based Microsphere Biosensor for Thrombin Detection, *Sensors*, 6, 785-795, **2006**.
- [40] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev.*, 105, 1103-1169, **2005**.
- [41] Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E., An aptamer-based quartz crystal protein biosensor, *Anal. Chem.*, 74, 4488-4495, **2002**.
- [42] Huang, C.C., Huang, Y.F., Cao, Z.H., Tan, W., Chang, H.T., Aptamer-Modified Gold Nanoparticles for Colorimetric Determination of Platelet-Derived Growth Factors and Their Receptors , *Anal. Chem.*, 77, 5735-5741, **2000**.

- [43] Rasmussen, S.R.; Larsen, M.R.; Rasmussen, S.E., Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end., *Anal. Biochem.*, 198, 138-42, **1991**.
- [44] Dick, L.W., McGown, L.B., Aptamer-enhanced laser desorption/ionization for affinity mass spectrometry., *Anal. Chem.*, vol. 76, 3037–41, **2004**.
- [45] Lee, M., Walt, D.R., A fiber optic microarray biosensors using aptamer as receptors, *Anal. Biochem.*, 282, 142–146, **2000**.
- [46] Güler, Ü., Trombin ve Lizozimin Özgün Aptamer Kullanılarak Zenginleştirilmeleri ve Kütle Spektrometresi ile Tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, **2012**.
- [47] Ishikawa, E., Enzyme-labeling of antibodies, *J. Immunoassay*, 4, 209-327, **1983**.
- [48] Andersen, B.D., Wise, B.L., Textbook of clinical chemistry, *Philadelphia: WB Saunders Company*, 197-208, **1986**.
- [49] Denover, E., Vangrieken, R., Adams, F., Natusch, D.F.S., Laser microprobe mass spectrometry, 1. Basic principle sand performance characteristics, *Analytical Chemistry*, 54, **1982**.
- [50] Fabris, D., Mass spectrometric approaches for the investigation of dynamic processes in condensed phase, *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 30-54, **2005**.
- [51] Karas, M., Hillenkamp, F.H., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical Chemistry*, 60, 2229-2301, **1988**.
- [52] Hillenkamp, F., Karas, M., Ingeldoh, A., Stahl, B., Matrix assisted UV-laser desorption ionization: a new approach to mass spectrometry of large molecules in Biological Mass Spectrometry, *Elsevier*, **1990**.
- [53] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53-68, **1987**.
- [54] Gross, H.J., Mass Spectrometry: A Textbook, First Edition, *Springer, Heidelberg*, **2004**.
- [55] Manz, A., Pamme, N., Andlössifidis, D., Bioanalytical Chemistry, *World Scientific Publishing Company*, 188, **2003**.
- [56] Lehrer M. In Kaplan L.A., Mass spectrometry, *St. Louis: Mosby Company*, 167-84, **1996**.
- [57] Skoog, D.A., Holler J.F., Nieman, T.A., In principles of instrumental analysis, Molecular mass spectrometry, *Philadelphia: Saunders College Publishing*, 498-534, **1998**.
- [58] Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Eds, **2007**.

- [59] Kiser R.W., Sullivan R.E., *Mass spectrometry, Analytical Chemistry*, 40, 273, **1968**.
- [60] Dougherty R.C., Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry, *Biomed Mass Spectrom*, 8: 283-92, **1981**.
- [61] Dass, C., *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, John Wiley and Sons , Memphis, **2007**.
- [62] Wollnik, H., Time-of-flight mass analyzers, *Mass Spectrometry Reviews*, 12, 89-114, **1993**.
- [63] Tanaka, K., Ido Y., Akita, S., Proceedings of the second Japan-China Joint Symposium on Mass spectrometry; Matsuda, H. and Liang, X.T. Eds., *Bando Press*, 185-188, **1987**.
- [64] Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Analytical Chemistry*, 57, 675– 679, **1985**.
- [65] Cotter, R.J., Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research, Chap. 2, in ACS Professional Reference Books, *American Chemical Society*, 19-45, **1997**.
- [66] Muddiman, D.C., Bakhtiar, R., Hofstadler, S.A., Smith, R.D., Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Instrumentation And applications”, *Journal Of Chemical Education*, 74 (11), 1288, **1997**.
- [67] Dole M., *Journal of Chemical Physics*, 49, 2240 **1968** and *Journal of Chemical Physics*, 50, 4977 **1970**.
- [68] Fenn J.B., *Journal of Physical Chemistry*, **1984**.
- [69] Fenn J.B., *Agewandte Chemie - International Edition*, 42, 3871, **2003**.
- [70] Simpson, R. J., *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*; Ch. 8., Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2003**.
- [71] Keller, K.M., Breeden, M.M., Zhang, J., Ellington, A. D., Brodbelt, J.S., “Electrospray ionization of nucleic acid aptamer/small molecule complexes for screening aptamer selectivity.,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 40, 1327–37, **2005**.
- [72] Ruigrok, V. J. B., Levisson, M., Hekelaar, J., Smidt, H., Dijkstra B. W., van der Oost, Characterization of Aptamer-Protein Complexes by X-ray Crystallography and Alternative Approaches J., *Int. J. Mol. Sci.*, , 13, 10537–10552, **2012**.
- [73] Latham, M.P., Zimmermann G.R., Pardi, A., NMR Chemical Exchange as a Probe for Ligand-Binding Kinetics in a Theophylline-Binding RNA Aptamer, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5052–5053, **2009**.
- [74] Bich C., Zenobi, R., Mass spectrometry of large complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 632–639, **2009**.

- [75] Rostom A.A., Fucini P., Benjamin D.R., Juenemann R., Nierhaus K.H., Hartl F.U., Dobson C.M., Robinson C.V., Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5185–5190, **2000**.
- [76] Lin, S., Cotter, R.J., Woods, A.S., Detection of Non-Covalent Interaction of Single and Double Stranded DNA with Peptides by MALDI-TOF, *Proteins*, 12–21, **1998**.
- [77] Aşkun, H., Gülbakan, B., Çelikbıçak, Ö., Uzun, C., Güven, O., Salih, B., Preconcentration and matrix elimination for the determination of Pb(II), Cd(II), Ni(II), and Co(II) by 8-hydroxyquinoline anchored poly(styrene-divinylbenzene) microbeads, *Journal of Applied Polymer Science*, 4, 2714–2722. **2008**.
- [78] Ahn, J., Lee, S. W., Kang H. S., Jo, M., Lee, D., Laurell, T., Kim, S., Aptamer Microarray Mediated Capture and Mass Spectrometry Identification of Biomarker in Serum Samples, *Journal of Proteom Research*, 9, 5568-5573, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Funda Yıldırım

Doğum Yeri: İSTANBUL

Medeni Hali: Bekar

E-posta: fyildi06@hacettepe.edu.tr / fndyildirim@gmail.com

Adresi: Hasanpaşa Mah. Arzu Sok. No:3 Daire:3 Kadıköy İstanbul

Eğitim

Lise: Bayrampaşa Anadolu Lisesi (4,96/5,00)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (3,43/4,00)

Yüksek Lisans: Erasmus Değişim Programı-Bremen Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Almanya

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara (4,00/4,00)

Doktora: -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-İyi, Almanca-Başlangıç

İş Deneyimi

Sandoz Grup Sağlık Ürünleri İlaçları San. ve Tic. A.Ş.

Üretim Vardiya Uzmanı (Mart 2014 - ...)

Deneyim Alanları

Kütle Spektrometrik cihazlar, proteomiks, biyomoleküller, GMP uygulamaları, ilaç kimyası.

Tezden Üretilmiş Projeler

Kütle Spektrometrik Proteomiks Analizleri için Yüksek Seçiciliğe Sahip Aptamer ile Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Geliştirilmesi ve Optimizasyonu / Tübitak 112T784 nolu proje

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Ü. Güler, F. Yıldırım, Ö. Çelikbıçak, B. Salih, AN APTAMER MEDIATED ENRICHMENT METHOD FOR MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF THROMBIN, 6th BLACK SEA BASIN CONFERENCE ON ANALYTICAL CHEMISTRY (6BBCAC), 2013, Trabzon, Türkiye.