

**MODEL BİR YEŞİL FLÖRESAN PROTEİN İÇİN APTAMER  
ÜRETİMİNİN  
VE OPTİK BİYOSENSÖRLERDE UYGULANMASININ  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF APTAMER PRODUCTION FOR A  
MODEL GREEN FLUORESCENT PROTEIN  
AND ITS APPLICATION TO OPTIC BIOSENSORS**

**DİLBER ECE SEZGİN**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

**2013**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Başkan** : .....  
Prof. Dr. Kezban Ulubayram

**Üye (Danışman)** : .....  
Prof. Dr. Mehmet Mutlu

**Üye** : .....  
Prof. Dr. Tülin Kutsal

**Üye** : .....  
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

**Üye** : .....  
Yrd. Doç. Dr. Dilek Çökeliler

## ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ...../...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Sevin Düz  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

# MODEL BİR YEŞİL FLÖRESAN PROTEİN İÇİN APTAMER ÜRETİMİNİN VE OPTİK BİYOSENSÖRLERDE UYGULANMASININ ARAŞTIRILMASI

Dilber Ece Sezgin

## ÖZ

Sunulan tez çalışmasının amacı, biyosensör sistemlerinin analitik performanslarının geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda bir ölçüm standardı oluşturabilmek amacıyla model bir sistem olarak kullanılabilecek olan hedef molekül-aptamer kompleksinin tanımlanması ve belirlenen model aptamer sisteminin uygulanabilirliğinin araştırılmasıdır. Çalışma sürecinde uygulamada oldukça kolay ve hassas olan floresan tabanlı optik tanıma sistemi ve floresan protein olarak da literatürde bugüne kadar en çok çalışılmış ve özellikleri en iyi tanımlanmış Yeşil Floresan Protein (GFP) kullanılmıştır.

Hedef moleküle (GFP) karşı seçilecek aptamer moleküllerinin SELEX prosedürü ile belirlenebilmesi amacıyla geliştirilen başlangıç RNA kütüphaneleri, literatürde daha önceden gerçekleştirilen çalışmalarda hedef molekül (GFP) molekülüne karşın geliştirilmiş ve birincil dizisi belirlenmiş aptamerler baz olarak alınarak tasarlanmıştır. Başlangıç RNA kütüphaneleri olarak: (1) bölgesel olarak rassal ve (2) tamamen rassal olmak üzere iki temel oligonükleotid dizisi oluşturulmuştur.

SELEX prosedürü her iki başlangıç kütüphanesinde paralel olarak gerçekleştirilmiştir. In vitro seçim prosedürünün tüm basamakları için gerekli optimizasyonlar gerçekleştirildikten sonra SELEX döngüleri gerçekleştirilmiştir. Seleksiyon basamağında ticari bir biyotinyasyon kiti kullanılmıştır. Sekiz SELEX döngüsü sonunda hedef moleküle (GFP) bağlanan dizilerin belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seçilen aptamer molekülleri ile hedef molekül (GFP) arasındaki etkileşimin gösterilmesi amacıyla, aptamer molekülleri avidin - biyotin ve poli-(A) – poli-(T) etkileşimleri kullanılarak altın yüzeye immobilize edilmiştir. Son olarak, modifiye edilmiş altın yüzeylerin hedef molekül (GFP) ile inkübasyonu sonucunda, seçilmiş aptamer molekülleri ile hedef molekül (GFP) arasındaki etkileşimi bir floresan mikroskop sisteminin yardımıyla gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasının sonucunda, seçilen aptamer molekülleri ile hedef floresan protein (GFP) arasındaki etkileşimin biyosensör uygulamalarında model aptamer sistemi olarak kullanılabilirliği başarıyla gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer, SELEX, Yeşil Floresan Protein (GFP), Biyosensör.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi.

# **INVESTIGATION OF APTAMER PRODUCTION FOR A MODEL GREEN FLUORESCENT PROTEIN AND ITS APPLICATION TO OPTIC BIOSENSORS**

**Dilber Ece Sezgin**

## **ABSTRACT**

The purpose of this research is identification of the target molecule-aptamer complex model that can be used as a model system to establish a measurement standard for increasing the efficiency of the analytic performance of the biosensor systems and Investigation the applicability of aptamer molecules. A fluorescence-based optical detection system was used as measurement device and the Green Fluorescent Protein (GFP) was used as fluorescent protein.

Initial RNA libraries, that had been developed to discover aptamer molecules against the target molecule (GFP) by performing SELEX procedure, were designed based on the previously selected aptamer molecules against the target molecule (GFP) with known primary sequence. Two distinct RNA libraries were synthesized as initial RNA libraries: (1) regional random oligonucleotide template and (2) fully random oligonucleotide template.

SELEX procedure was carried out in parallel with both of the RNA libraries. SELEX cycles were carried out after all the optimizations of in vitro selection procedure have been successfully applied. A commercial biotinylation kit was used at the selection steps of the SELEX procedure. At the end of the eight SELEX cycle, the selected target molecule (GFP) aptamer sequences were identified by DNA sequence analysis. Aptamer molecules were immobilized on the gold surface by using avidin - biotin, and poly-(A) - poly-(T) interactions to demonstrate the interactions between selected aptamer molecules and target molecule (GFP). Finally, the modified gold surfaces were incubated with target molecule (GFP). Thus, interactions between selected aptamer molecules and target molecule (GFP) have been observed with a fluorescent microscope system.

Observations of interactions between selected aptamer molecules and target fluorescent protein (GFP) with a fluorescent microscope system successfully demonstrate that selected aptamer molecules and target fluorescent protein (GFP) can be used as a model system at biosensor research.

**Keywords:** Aptamer, SELEX, Green Fluorescent Protein (GFP), Biosensor.

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe University, Engineering Faculty.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında, ilgi, destek ve bilgilerini esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu' ya,

Çalışmam boyunca daima yanımda olan, değerli bilgilerini, yardımlarını ve anlayışlarını esirgemeyen, Ozan Selvi ve Serkan Orcan'a,

Sadece bu çalışma süresince değil hayatımın her anında büyük bir sevgi ve sabırla beni cesaretlendiren ve destek olan canım anneme,

Çalışmam boyunca gösterdiği ilgi ve destek için sevgili kardeşime,

Her an yanımda olduğunu bildiğim melek babama,

En içten teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Aptamer .....	4
2.2. SELEX Yöntemi .....	9
2.2.1. Hedef Molekül Seçimi .....	12
2.2.2. Başlangıç Kütüphanesi .....	13
2.2.3. Seleksiyon .....	16
2.2.4. Amplifikasyon ve Karakterizasyon .....	17
2.3. Aptamer Moleküllerinin Kararlılığı .....	18
2.3.1. Nükleotid Bazlarında ve Fosfodiester Omurgada Gerçekleştirilen Kimyasal Modifikasyonlar .....	19
2.3.2. Ayna Görüntülü “Spiegelmer” Aptamer Molekülleri .....	21
2.4. Aptamer Moleküllerinin Temel Uygulama Alanları .....	23
2.4.1. Aptamer Moleküllerinin Analitik Uygulamaları .....	24
2.4.1.1. Kromatografi .....	24
2.4.1.2. Kapiler Elektroforez .....	24
2.4.1.3. Biyosensör Sistemleri .....	25
2.4.2. Aptamer Moleküllerinin In Vivo Uygulamaları .....	29
2.5. Model Aptamer Sistemi .....	30
2.6. Floresan Proteinler .....	30
2.6.1. Yeşil Floresan Protein (GFP) .....	30
2.6.1.1. Yeşil Floresan Proteinin Yapısal Özellikleri .....	31
2.6.1.2. Yeşil Floresan Proteinin Fotofiziksel Özellikleri .....	33
2.6.1.3. Yeşil Floresan Proteinin Stabilitesi .....	34
2.6.1.4. Yeşil Floresan Proteinin Genel Uygulama Alanları .....	34
3. MATERYAL ve METOT .....	38
3.1. Materyal .....	40



3.1.1. Teknik Ekipman.....	40
3.1.2. Kimyasal Malzemeler .....	41
3.1.3. Oligonükleotidler.....	41
3.1.4. Proteinler.....	41
3.1.5. Ticari Kitler .....	42
3.1.6. Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler .....	43
3.2. Metot.....	44
3.2.1. RNA Kütüphanesi Tasarımı.....	44
3.2.2. SELEX Deneyleri.....	46
3.2.2.1. Çift Zincirli Promotor Bölge Oluşturulması .....	46
3.2.2.2. In vitro Transkripsiyon.....	47
3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Polymerase Chain Reaction”, PCR) .....	48
3.2.2.4. Seleksiyon .....	52
3.2.2.5. Ters-Transkripsiyon (Reverse Transcription).....	54
3.2.2.6. Nükleik Asit Moleküllerinin Analizi.....	57
3.2.2.7. Nükleik Asit Moleküllerinin Saflaştırılması .....	61
3.2.2.8. DNA Dizi Analizi.....	67
3.2.3. Yüzey İmmobilizasyon Deneyleri.....	69
3.2.3.1. Altın Yüzeylerin Hazırlanması.....	69
3.2.3.2. Avidin İmmobilizasyonu .....	69
3.2.3.3. Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FTIR).....	69
3.2.3.4. Aptamer İmmobilizasyonu .....	70
3.2.3.5. Hedef Molekül (GFP) ile İnkübasyon .....	72
3.2.3.6. Floresan Mikroskop .....	72
4. DENEYSEL SONUÇLAR .....	73
4.1. RNA Kütüphanesinin Oluşturulması .....	73
4.2. SELEX .....	82
4.2.1. RNA Kütüphanesinin Hedef Molekül ile İnkübasyonu .....	82
4.2.2. Hedef Moleküle Bağlanan RNA Moleküllerinin Seleksiyonu.....	82
4.2.3. RNA Kütüphanesinin Zenginleştirilmesi .....	84
4.2.4. SELEX Döngülerinin Tekrarlanması.....	90
4.2.5. Son SELEX Döngüsü .....	90
4.3. SELEX Sonucu Seçilen Aptamer Moleküllerinin DNA Dizi Analizi .....	93
4.4. Yüzey İmmobilizasyon Çalışmaları .....	95

4.4.1. Avidin Moleküllerinin Altın Yüzeğe İmmobilizasyonu .....	99
4.4.2. FTIR ile Yüzey Karakterizasyonu .....	99
4.4.3. Aptamer Moleküllerinin Yüzeğe İmmobilizasyonu .....	99
4.4.4. Aptamer ile Hedef Molekül Arasındaki Etkileşimin Gösterilmesi .....	101
5. TARTIŞMA .....	104
6. KAYNAKLAR .....	111
ÖZGEÇMİŞ .....	124

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bazı RNA ve DNA aptamerlerinin ikincil yapı motifleri .....	5
Şekil 2.2. Bir aminoglikozid antibiyotiği olan tobramisin ile RNA aptameri arasındaki moleküler tanıma .....	6
Şekil 2.3. Hedef moleküle özgü aptamerlerin SELEX ile in vitro seçimi. ....	11
Şekil 2.4. Çeşitli hedef moleküllere karşı seçilen aptamer moleküllerinin dağılımı	12
Şekil 2.5. Arjininin (A), DNA (B) ve RNA (C) aptamerleri tarafından tanınması ....	13
Şekil 2.6. Sabit ve rastgele dizileri içeren başlangıç DNA kütüphanesi .....	14
Şekil 2.7. SELEX prosedüründe uygulanan seleksiyon basamaklarının şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.8. 2' hidroksil grubunun oligonükleotidin fosfodiester omurgasına yaptığı nükleolitik atak.....	19
Şekil 2.9. Aptamer yapılarında yaygın olarak gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar. ....	21
Şekil 2.10. Spiegelmer teknolojisinin şematik gösterimi .....	23
Şekil 2.11. Yeşil floresan protein'in (GFP) tersiyer yapısı.....	32
Şekil 2.12. Yeşil floresan proteinin (GFP) yapısında bulunan kromofor .....	33
Şekil 2.13. <i>Aequorea victoria</i> Yeşil Floresan Proteini(wtGFP) amino asit sekansı	35
Şekil 2.14. Yeşil floresan protein kromoforunun geçirdiği protonasyon durumları	36
Şekil 2.15. Yeşil floresan protein (GFP) kullanılarak gerçekleştirilen protein füzyon çalışmalarının temel prensibi.....	37
Şekil 3.1. PCR cihazı.....	51
Şekil 3.2. Spektrofotometrik ölçümler için kullanılan NanoDrop 2000 cihazı. ....	57
Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforez sistemi .....	58
Şekil 3.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA markerları.....	59
Şekil 3.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan RNA markerı.....	60
Şekil 3.6. Jel görüntüleme ünitesi.....	61
Şekil 3.7. Çeker ocak .....	63
Şekil 3.8. Mfold programı ile sekonder yapılarının kestirimi yapılan aptamer molekülleri .....	71

Şekil 4.1. Fill-in reaksiyonunun şematik gösterimi. ....	74
Şekil 4.2. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi. ....	75
Şekil 4.3. PCR optimizasyonu sonucu amplifikasyon. ....	76
Şekil 4.4. Farklı sürelerde gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon ürünleri. ....	78
Şekil 4.5. In vitro transkripsiyon reaksiyonunun şematik gösterimi.....	79
Şekil 4.65. Hibridizasyon koşulları değiştirilerek gerçekleştirilmiş in vitro transkripsiyon ürünleri .....	80
Şekil 4.7. Başlangıç RNA kütüphanesi .....	81
Şekil 4.8. GFP moleküllerinin avidin agaroz kolona bağlanmasının şematik gösterimi.....	82
Şekil 4.9. Ters transkripsiyon reaksiyonunun şematik gösterimi .....	85
Şekil 4.10. Ters transkripsiyon reaksiyonundan sonra gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonunun şematik gösterimi.....	86
Şekil 4.11. Ters-transkripsiyon PCR ürünleri.....	87
Şekil 4.12. Kalıp olarak RT-PCR ürünlerinin kullanıldığı in vitro transkripsiyon optimizasyonu. ....	89
Şekil 4.13. Son SELEX döngüsü in vitro transkripsiyon ürünleri.....	91
Şekil 4.14. Son SELEX döngüsünde gerçekleştirilen ters-transkripsiyon PCR ürünleri. ....	93
Şekil 4.18. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen yüzey immobilizasyon çalışmalarının şematik gösterimi .....	95
Şekil 4.15. RNA kütüphanesi_2'den ilk SELEX döngüsü sonunda elde edilen aptamer molekülleri dizisi kromatogramı. ....	96
Şekil 4.16. RNA kütüphanesi_1'den SELEX sonucu elde edilen aptamer molekülleri dizisi. ....	97
Şekil 4.17. RNA kütüphanesi_1'den SELEX sonucu elde edilen aptamer molekülleri dizisi kromatogramı. ....	98
Şekil 4.19. Avidin immobilize edilen altın yüzeyin FTIR fark spektrumu. ....	100
Şekil 4.20. Son SELEX döngüsünde elde edilen aptamer moleküllerine primer uzaması reaksiyonuyla poli-(A) dizilerinin eklenmesinin şematik gösterimi.....	102
Şekil 4.21. Altın yüzey üzerine immobilize edilmiş seçilen aptamer molekülleri ile hedef molekül GFP etkileşiminin floresan mikroskop görüntüleri. ....	103

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aptamer ile antikor molekülleri arasındaki farklılıklar.....	8
Çizelge 3.1. Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman .....	40
Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler .....	41
Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan enzim ve reaktifler.....	42
Çizelge 3.4. Çalışma kapsamında kullanılan ticari kitler.....	42
Çizelge 3.5. 5X TBE tamponunun hazırlanması.....	43
Çizelge 3.6. Çalışma kapsamında kullanılan oligonükleotid dizileri ve özellikleri .	46
Çizelge 3.7. Çift zincirli promotor bölge oluşturulurken kullanılan reaksiyon bileşenleri .....	47
Çizelge 3.8. Çift zincirli promotor bölge oluşturulurken kullanılan reaksiyon koşulları.....	47
Çizelge 3.9. In vitro transkripsiyon reaksiyon bileşenleri .....	48
Çizelge 3.10. DNaz uygulaması reaksiyon bileşenleri.....	48
Çizelge 3.11. DNaz uygulaması reaksiyon koşulları.....	48
Çizelge 3.12. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen HotStart TD PCR reaksiyon birleşenleri.....	51
Çizelge 3.13. HotStart TD PCR reaksiyon koşulları .....	51
Çizelge 3.14. Ters transkripsiyon basamağında kullanılan reaksiyon bileşenleri ..	55
Çizelge 3.15. Ters transkripsiyon basamağında gerçekleştirilen reaksiyon koşulları .....	55
Çizelge 3.16. RNaz H uygulaması reaksiyon bileşenleri .....	56
Çizelge 3.17. RT-PCR öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonu bileşenleri .....	56
Çizelge 3.18. RT-PCR öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyon koşulları .....	56
Çizelge 3.19. İmmobilizasyon öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonu bileşenleri .....	72
Çizelge 3.20. İmmobilizasyon öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyon koşulları.....	72

Çizelge 4.1. PCR optimizasyon deneylerinde kullanılan parametreler .....	75
Çizelge 4.2. Transkripsiyon süresi optimizasyonu için kullanılan parametreler. ...	77
Çizelge 4.3. Transkripsiyon optimizasyonu için değiştirilen parametreler .....	80
Çizelge 4.4. In vitro transkripsiyon için gerekli kalıp PCR ürünü miktarı optimizasyonu .....	88

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
AMD	: Age Related Macular Degeneration/ Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
Arg	: Arjinin
C	: Sitozin
CD4	: Yardımcı T Hücresi
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CE	: Kapiler Elektroforez
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Çift Zincirli Deoksiribonükleik Asit
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay/ Elektroforetik Hareketlilik Kayma Analizi
ESPT	: Excited State Proton Transfer/ Uyarılmış Durum Elektron Transferi
FC	: Flow Sitometri
FDA	: Food and Drug Administration
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy/ Fourier Transform İnfrared Spektroskopi
G	: Guanin
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GFP	: Green Fluorescent Protein/ Yeşil Floresan Protein
Glu	: Glutamin
Gly	: Glisin
GO	: Grafen Oksit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus/ İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography/ Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
IgE	: İmmünglobülin E
LIF	: Laser Induced Fluoresence/ Lazer İndüklü Floresan

LNA	: Locked Nucleic Acid
MCT	: Mercury Cadmium Telluride
MRI	: Magnetic Resonance Imaging/ Manyetik Rezonans Görüntüleme
PBS	: Phosphate Buffered Saline/ Fosfat Tampon Çözeltisi
PCR	: Polymerase Chain Reaction/ Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor/ Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
p-HBI	: 4-(p-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone
poli-(A)	: Adenin bazlarından oluşan DNA oligonükleotid
poli-(T)	: Timin bazlarından oluşan DNA oligonükleotid
QCM	: Quartz Crystal Microbalance/ Kuvars Kristal Mikrobaleans
QD	: Quantum Dot
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Reverse Transcription PCR/ Ters Transkripsiyon PCR
SAW	: Surface Acoustic Wave/ Yüzey Akustik Dalga
SELEX	: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
Ser	: Serin
SPR	: Surface Plasmon Resonance/ Yüzey Plazmon Rezonans
ssDNA	: Tek Zincirli Deoksiribonükleik Asit
T	: Timin
Tyr	: Tirozin
U	: Urasil
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor/ Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
wtGFP	: <i>Aequorea victoria</i> GFP



## 1. GİRİŞ

Günümüzde sensör ve tanı amaçlı hızlı, güçlü ve ucuz metodlara olan gereksinim gittikçe artmaktadır (Mascini, 2009). Moleküler tanıma, sensör prensibinin temelini oluşturduğu için yeni moleküler tanıma problemlerinin geliştirilmesi üzerindeki ilgi giderek yoğunlaşmaktadır (McKeague et al., 2010). Antikorlar moleküler tanıma için uzun süredir standart olarak kabul edilirken ve antikorların tanıma problemleri olarak kullanımı 1950'lere kadar dayanırken, daha yeni olan aptamer teknolojisi pek çok avantaj sunmaktadır (Jayasena, 1999).

1990 yılının içerisinde üç farklı laboratuvarın benzer zamanlarda, yüksek afinite ile spesifik bağlanma gösterebilen nükleik asit dizilerinin izolasyonu için in-vitro seçim ve amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi üzerine yaptıkları araştırmaların sonuçlarını yayımlamaları (Robertson and Joyce, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990), günümüzde aptamer teknolojisi olarak adlandırılan çalışmaların başlangıcını oluşturmaktadır. Latince "uymak" anlamına gelen aptus kelimesinden türetilmiş olan aptamer kavramı (Jayasena, 1999), geleneksel nükleik asitlerin aksine hedef moleküllerine karşı eşsiz bağlanma karakteristikleri gösteren tek zincirli nükleik asitlerdir (RNA, DNA, değiştirilmiş RNA veya DNA) (Cho et al., 2009). Küçük organik moleküller, peptidler, proteinler ve virüs veya hücre gibi supramoleküler kompleksleri de içeren çok çeşitli hedef moleküllere karşı yüksek seçicilikte ve çok özgül sayısız aptamer molekülü tanımlanmıştır. Aptamerlerin bağlanma afiniteleri yüksek ölçüde hedefe bağımlıdır ve çeşitli protein hedefleri için pikomolar ölçüden nanomolar ölçüye kadar çeşitlilik göstermektedir (Tombelli et al., 2005; Ahn et al., 2009).

Aptamerler in vitro olarak SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) adı verilen bir yöntem ile elde edilmektedir. SELEX yöntemi, rastgele dizilerden oluşmuş oligonükleotid moleküllerinden (DNA veya RNA kütüphaneleri) hedef molekülüne yüksek ilgi ve özgüllük ile bağlanan eşsiz RNA/DNA moleküllerinin tanımlanmasını sağlamıştır (Tombelli et al., 2005; Stoltenburg et al., 2007). Tipik olarak SELEX yöntemi ile belirlenen hedef moleküle karşı aptamer seçilmesi dört temel basamağı tekrar etmektedir (Xu et al., 2009; Yang et al., 2007; You et al., 2011). İlk basamakta yaklaşık olarak  $10^{14} - 10^{16}$  rastgele oligonükleotid dizisi içeren nükleik asit havuzu/kütüphanesi oluşturulmaktadır.

Burada her oligonükleotidin baz dizisi, hedef moleküle en yüksek ilgi ile bağlanacak dizinin bulunabilmesi amacıyla birbirinden farklı olmaktadır. Bir sonraki basamakta oligonükleotid kütüphanesi belirli bir süre hedef molekül ile inkübe edilmektedir. Aptamer-hedef molekül kompleksleri oluşmakta; zayıf bağlanan veya bağlanmayan oligonükleotidler ayrılmaktadır. Amplifikasyon basamağında seçilen diziler DNA için PCR ile, RNA için RT-PCR ile amplifiye edilmektedir. Böylece bir sonraki SELEX döngüsü için yeni bir kütüphane oluşturulmaktadır. Bu basamaklar bir SELEX döngüsünü ifade etmektedir. Yaklaşık 8 - 15 SELEX döngüsünden sonra kütüphanede hedefine yüksek ilgi ile bağlanabilen sadece bir kaç aptamer molekülü kalmaktadır. Böylece son olarak seçilen aptamer molekülünün izolasyon basamağı gerçekleştirilebilmektedir.

Çalışmanın ilk basamağında optik biyosensör uygulamalarında model bir sistem olarak kullanılacak hedef molekül-aptamer kompleksi belirlenmiştir. Aptamer tabanlı biyosensör sistemlerinde kullanılan çok farklı tanıma stratejileri ve yaygın olarak kullanılan birkaç tane model aptamer sistemi bulunmaktadır. Biyosensör sistemlerinin analitik performanslarının geliştirilmesi amacıyla, model biyotanıyıcı moleküllerle gerçekleştirilen çalışmalarda, hassaslık, özgüllük, analiz zamanı ve maliyet göz önünde bulundurulması gereken parametreler olarak öne çıkmaktadır. Bu doğrultuda, uygulamada oldukça kolay ve hassas olan floresan tabanlı optik tanıma sistemlerinde uygulanabilmesi amacıyla hedef molekül olarak bir floresan protein seçilmesine karar verilmiştir. Floresan protein olarak, literatürde bugüne kadar en çok çalışılmış ve özellikleri en iyi tanımlanmış Yeşil Floresan Protein (GFP) kullanılmıştır.

Daha sonra, GFP'ye karşı geliştirilecek aptamer moleküllerinin SELEX prosedürü ile seçilmesi için başlangıç RNA kütüphanesi tasarlanmıştır. Başlangıç RNA kütüphanesi tasarlanırken, daha önce GFP'ye karşı seçilmiş bir aptamer dizisinin işlevselliğinin artırılabilmesi amacıyla bölgesel olarak randomize edilmiş bir başlangıç kütüphanesi ve tamamen rastgele ikinci bir RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. SELEX prosedürünün her iki başlangıç kütüphanesiyle paralel olarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Çalışma süresince SELEX döngülerinin tekrar edilebilirliği açısından gerekli parametreler optimize edilmiştir. Bu aşamada oligonükleotid dizilerinin

sentezlenmesi ve tekrar kullanımları için gerekli dönüşümleri geçirebilmesi amacıyla tasarlanan oligonükleotid dizileri ve komplementer primer dizilerinin optimal çalışma koşulları tespit edilmiştir. Diğer yandan in vitro seçim prosedürünün oldukça önemli seleksiyon basamağı için ise proteinleri biyotinlemek amacıyla kullanılan ticari bir kitin kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimizasyonlar yapıldıktan ve gerekli parametreler belirlendikten sonra, SELEX prosedürü gerçekleştirilmiş ve döngüler tekrar edilmiştir. Daha sonra SELEX sonucunda elde edilen zenginleştirilmiş aptamer moleküllerinin primer dizilerinin belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Hedef molekül ile aptamer molekülleri arasındaki etkileşimin gösterilmesi amacıyla, seçilen aptamer moleküllerinin altın yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada öncelikle avidin molekülleri altın yüzeye tiyol etkileşimi ile bağlanmıştır. Daha sonra biyotinlenmiş poli-(T) dizisi yüzeye immobilize edilmiştir. Ucuna poli-(A) dizileri eklenmiş seçilmiş aptamer molekülleri poli-(A)-poli-(T) etkileşimi ile yüzeye immobilize edilmiştir. Son olarak, modifiye edilmiş altın yüzeylerin hedef molekül (GFP) ile inkübasyonu sonucunda, aptamer ile hedef molekülün bağlanması floresan mikroskop ile test edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

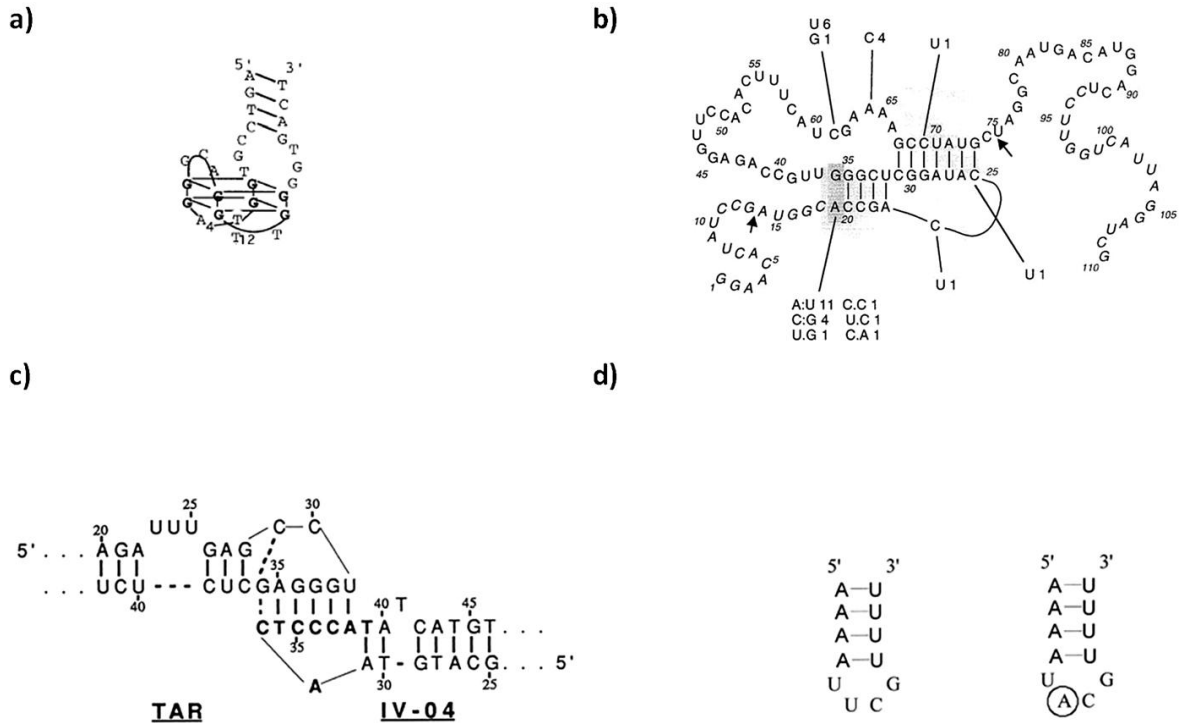
### 2.1. Aptamer

1980'li yıllarda doğal olarak oluşan fonksiyonel nükleik asitler çok iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Guanozin veya türevlerinden birinin zorunlu ve özgül olarak splicing reaksiyonu için kofaktöre bağlandığı self-splicing grup I intronların keşfi ile RNA'nın küçük moleküllere bağlanabildiği gösterilmiştir (Kruger et al., 1982; Bass and Cech, 1984). Bunun yanında, adenovirüslerin interferon ile indüklenen protein kinaz R aktivitesini inhibe eden kısa virüs-asosiye bir RNA kodladığı (O'Malley et al., 1986) ve HIV'nin viral Tat proteinine bağlanan transactivation response (TAR) RNA'ları denilen küçük RNA oligomerlerini kodladığı (Cullen and Greene, 1989; Marciniak et al., 1990) gösterilmiştir. Tüm bunlara paralel olarak yapay fonksiyonel nükleik asitlere olan ilgi artmıştır.

1990 yılında, birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalar sonucunda (Robertson and Joyce, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990) nükleik asit olmayan hedef moleküllere yüksek ilgi ve özgüllük ile bağlanabilen tek zincirli özgül nükleik asit dizilerinin keşfine yol açan bir in vitro seçim ve amplifikasyon tekniği tanımlanmıştır. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) adı verilen bu yöntem sonucunda elde edilen oligonükleotid ligandlar, Latince "uymak" anlamına gelen "aptus" kelimesinden türetilmiş (Jayasena, 1999) ve aptamer olarak adlandırılmıştır (Ellington and Szostak, 1990). Aptamer moleküllerinin in vitro seçimleri için seçilen metodolojiler sofistike bir şekilde çoğalmaktadır. Bunun yanında, başlangıçtaki seleksiyon deneylerinde kullanılan temel prensip ve metodlar hala çok kullanışlı olup yaygın olarak uygulanmaktadır.

2004 yılında, gen ekspresyonunun düzenleyici elementleri ve doğal aptamerler olan riboswitch adı verilen moleküllerin tanımlanmasıyla (Mandal and Breaker, 2004; Tucker and Breaker, 2005) aptamer alanındaki araştırmalar daha da ivme kazanmıştır. Bunun yanında tanımlanmasından bu yana aptamerler, tanıma, pürifikasyon, teşhis ve tedavi gibi çeşitli fonksiyonları yerine getirebilmek amacıyla pek çok uygulama alanı bulmuştur (Fang and Tan, 2010; Famulok, 2007).

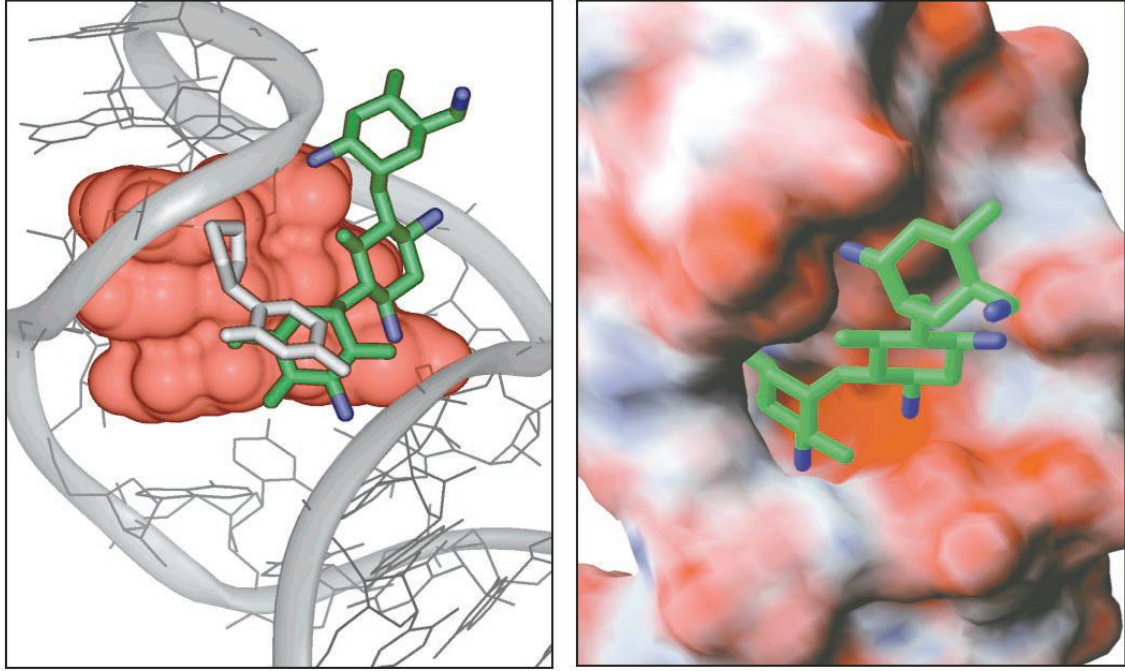
Nükleik asit aptamerleri kararlı, üç boyutlu, dizi-bağımlı yapıları olan küçük, tek zincirli DNA veya RNA oligonükleotidlerdir. Bu özellik aptamerlerin,  $Zn^{+2}$  (Ciesiolka et al., 1995) gibi küçük iyon ve organik boyalar (Wilson and Szostak, 1998), doğal disakkaritler (Yang et al.) ve amino-glikozid antibiyotikleri (Famulok and Hüttenhofer, 1996) gibi küçük organik bileşiklerden, CD4 glikoproteini (Kraus et al., 1998) veya canlı hücreler (Phillips et al., 2008) gibi daha kompleks büyük moleküllere kadar geniş bir aralıktaki moleküler hedeflerine etkin bağlanabilen moleküller olmasını sağlamaktadır. Nükleik asit aptamerlerinin işlevselliği primer diziyeye, nükleik asit molekülünün uzunluğuna ve çevresel koşullara göre değişen üç boyutlu yapılarına bağlıdır. Aptamerler genellikle 25 ila 90 baz uzunluğunda olup, tipik yapısal motifleri loop, pürin içeriği bakımından zengin çıkıntı, hairpin yapısı, dörtlü loop, pseudoknot, kissing kompleks veya G-quadruplex yapılarından oluşmaktadır. Bu yapılardan bazıları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Bazı RNA ve DNA aptamerlerinin ikincil yapı motifleri: a) G-quadruplex yapısında katlanan trombin aptameri; b) pseudoknot olarak katlanan biyotin aptameri; c) aptamer ile TAR-RNA arasında gerçekleşen DNA-RNA kissing kompleks; d) stem-loop olarak katlanan aptamer dizileri (Mascini et al., 2012).

Hedef molekül varlığında çoğu aptamer adaptif konformasyonel değişiklikler geçirmekte ve üç boyutlu yapısal katlanmaları hedefi için spesifik bir bağlanma bölgesi oluşturmaktadır (Şekil 2.2.). Aptamer ve hedef molekülü arasındaki

etkileşimler; yapısal komplementasyon, aptamerlerin aromatik bileşikleri ve nükleobazları arasındaki yığın etkileşimleri, yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarının kombinasyonu olarak gerçekleşmektedir (Hermann and Patel, 2000).



Şekil 2.2. Bir aminoglikozid antibiyotiği olan tobramisin ile RNA aptameri arasındaki moleküler tanıma. Tobramisin ligandı RNA aptameri tarafından enkapsüle edilmekte ve RNA aptameri, antibiyotiğin katyonik amonyum grupları ile kavitedeki elektronegatif gruplar arasında yapısal uyumun sağlanarak ligandın bağlanması için negatif yüklü derin bir çukur oluşturmaktadır (Hermann and Patel, 2000).

Nükleik asit aptamerlerinin hedeflerine yüksek özgüllükte bağlanmaları ile, hedef moleküllerin çok küçük yapısal farklılıkları ayırt edilebilmektedir. Örneğin, teofilin ve onun analogları olan kafein ve teobromin benzer kimyasal özelliklere sahiptir. Kafein ile teofilin birbirlerinden tek bir metil grubuyla ayrılırken, metil grubunu farklı bir pozisyonda taşıyan teobromin, teofilinin izomeridir. Tüm analoglara karşı yüksek seviyede moleküler ayırım gösteren anti-teofilin RNA aptameri ile teofilin arasındaki bağlanma affinitesinin kafeine göre 10,000 fold daha fazla olduğu gösterilmiştir (Jenison et al., 1994). Benzer olarak, L-arjinin için seçilen RNA aptamerlerinin hedefine D-arjinin enantiyomerine göre 12,000 fold daha yüksek ilgi ile bağlandığı gösterilmiştir (Geiger et al., 1996).

Küçük moleküllere ve proteinlere karşı geliştirilen aptamerlerin afiniteleri geniş bir dağılım göstermektedir. Düzlemsellik veya pozitif yüklü grupların varlığı, hidrojen bağı verici ve alıcılarının olması gibi özellikler küçük moleküllerin iyi tanınmasını ve mikromolar ölçeğinde afiniteyi sağlar. Proteinler için geliştirilen aptamerler, hidrojen bağı alıcı ve vericilerince zengin yapılar içeren daha kompleks alanların varlığı nedeniyle daha yüksek afinite göstermektedirler. Örneğin; trombin (25nM) (Bock et al., 1992), nükleokapsit proteini (2nM) (Allen et al., 1996) ve PDGF (0,1nM) (Green et al., 1996) gibi çeşitli proteinlere karşı geliştirilen aptamerler için afinite nanomolar ve subnanomolar ölçekler arasında değişim göstermiştir.

Günümüzde sensör ve tanı amaçlı hızlı, güçlü ve ucuz metodlara olan gereksinim gittikçe artmaktadır (Mascini, 2009). Moleküler tanıma, sensör prensibinin temelini oluşturduğu için yeni moleküler tanıma problemlerinin geliştirilmesi üzerindeki ilgi giderek yoğunlaşmaktadır (McKeague et al., 2010). Antikorlar moleküler tanıma için uzun süredir standart olarak kabul edilirken ve antikorların tanıma problemleri olarak kullanımı 1950'lere kadar dayanırken, daha yeni olan aptamer teknolojisi pek çok avantaj sunmaktadır (Jayasena, 1999).

Monoklonal antikorların tanımlanması ve üretimi çok sayıda klonun taranmasına dayanan çok zahmetli ve pahalı bir süreçtir. Buna ek olarak, antikorların klinik alandaki ticari başarısı memeli hücre kültüründe geniş ölçekli üretime ihtiyaç duyulmasına sebep olmuştur (Birch and Racher, 2006). Üstelik, immünoassaylerde antikorların aktivitesinin her yeni seride doğrulanması gerekmektedir. Çünkü, aynı antikorun performansı seriye bağlı olarak farklılaşma eğilimi göstermektedir. Aptamerler ise SELEX ile bir kere seçildikten sonra, kimyasal reaksiyonlar ile istenilen miktarda, yüksek doğrulukta yeniden üretilmektedir. Bu kimyasal prosesler antikor üretiminden çok daha ucuzdur. Antikorların sentezlenmesi için birkaç ay süre (Poliklonal antikorlar için 2-3 ay, monoklonal antikorlar için 4-6 ay) gerekirken, aptamer seçimi için SELEX prosesinde genellikle 8 hafta ila birkaç gün gerekmektedir. Yani aptamer SELEX biyotanyıcı element seçiminde oldukça zaman kazandırmaktadır (Xu et al., 2009). Aptamerler, stabiliteyi ve nükleaz dayanıklılıklarını artırmak amacıyla çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile kolaylıkla modifiye edilebilmektedirler (Ferreira and Missailidis, 2007; Jayasena, 1999). Ayrıca aptamerler, afinitelerini etkilemeyeceği için florofor ve quencherler gibi sinyal parçaları ile etiketlenerek biyosensör üretimi

kolaylaştırılabilmektedir (Mairal et al., 2008; Beaucage and Iyer, 1993). SELEX prosesinin in-vitro ortam içerisinde gerçekleştirilebilmesi, monoklonal antikor yönteminin yetersiz kaldığı non-immünojenik ve toksik ajanlara karşı aptamer moleküllerinin geliştirmesine de imkân vermektedir (Nimjee et al., 2005; Tombelli, et al., 2005). Antikorlar önemli ölçüde immünojenik iken, nükleik asitler insan immün sistemi tarafından yabancı olarak algılanmadığı için aptamerlerin düşük immünite ve düşük toksisiteye sahip olması, terapi amaçlı kullanımda tekrarlayan dozajları mümkün kılmaktadır (Ireson and Kelland, 2006).

Çizelge 2.1. Aptamer ile antikor molekülleri arasındaki farklılıklar (Nimjee et al., 2005).

Aptamer	Antikor
Seçimleri in vitro ortamda gerçekleştirilen kimyasal bir seçim prosesi ile gerçekleştirilir.	Seçimleri için biyolojik bir sisteme gereksinim vardır.
Herhangi bir hedef moleküle karşı geliştirilebilir.	Toksik veya non-immünojenik moleküllere karşı geliştirilemez.
Üniform aktivite gösterirler.	Aktiviteyi her seride farklılık gösterir.
Hedef moleküle bağlanma afiniteleri düşüktür.	Hedef moleküle bağlanma afiniteleri düşüktür.
Seçim süreci daha kısadır.	Seçimi pahalı ve zaman isteyen bir süreçtir.
Hedef bölgeyi araştırmacı belirler.	Hedef bölgeyi immün sistem belirler.
İleri fonksiyonlar için kolaylıkla kimyasal olarak modifiye edilebilir.	Kimyasal modifikasyonları sınırlıdır.
Sıcaklığı maruz kaldıktan sonra orjinal konformasyonuna döner.	Sıcaklığa hassas olup geri dönüşümsüz olarak denatüre olur.
İmmünojenik değildir.	Önemli ölçüde immünojeniktir.
Sınırsız raf ömrüne sahiptir.	Sınırlı raf ömrüne sahiptir.

Aptamerlerin fosfodiester bağlarının dayanıklılığı sayesinde yüksek ölçüde kimyasal ve termal stabiliteye sahip olmaları en önemli avantajlarından biri olarak göze çarpmaktadır. Protein yapıdaki antikorlar yüksek sıcaklıklarda kolayca denatüre olup tersiyer yapılarını kaybederken aptamerler termal olarak daha stabildir ve tekrarlayan denatürasyon/renatürasyon döngülerinde yapıları geri dönüşümlüdür. pH, sıcaklık, iyonik güç, veya denatürantların kullanımı gibi



değişen çevre koşullarında antikorlar geri dönüşümsüz olarak denatüre olurken, aptamerlerin sadece katlanmış yapıları bozulmaktadır (Mascini, 2009). Kuartz kristal mikrobalsans (QCM) sistemine immobilize edilmiş IgE monoklonal antikorların ve aptamerlerin incelendiği bir çalışmada; aptamer molekülleri rejenerasyon süreci sonucunda IgE proteinine karşı afinitelerinde bir kayıp olmaksızın kullanılabilirken, monoklonal antikorların yeniden kullanıma uygun olmadığı gözlenmiştir (Liss et al., 2002). Böylece, aptamer tabanlı sensör yüzeyleri denatürasyona dayanıklı olduğu için tekrar kullanılabilmekte ve antikor tabanlı yüzeylere göre çok daha uzun raf ömrüne sahip oldukları belirtilmektedir (Tombelli et al., 2005; Lee et al., 2008).

In vitro aptamer seçim prosesi, hedef molekülün belirli bir bölgesine bağlanabilen ve farklı bağlanma koşullarında özgül bağlanma özellikleri gösteren aptamerlerin üretimi için manipüle edilebilmektedir (Nimjee et al., 2005).

Aptamerlerin moleküler tanıma elementleri olarak kullanımının avantajları sebebiyle, çeşitli analitik yapıları sensörler ve diğer uygulamalar için aptamerler ile birleştiren, bu uygulamalar için aptamerlerin olağanüstü potansiyelini yansıtan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Balamurugan et al., 2008).

## **2.2. SELEX Yöntemi**

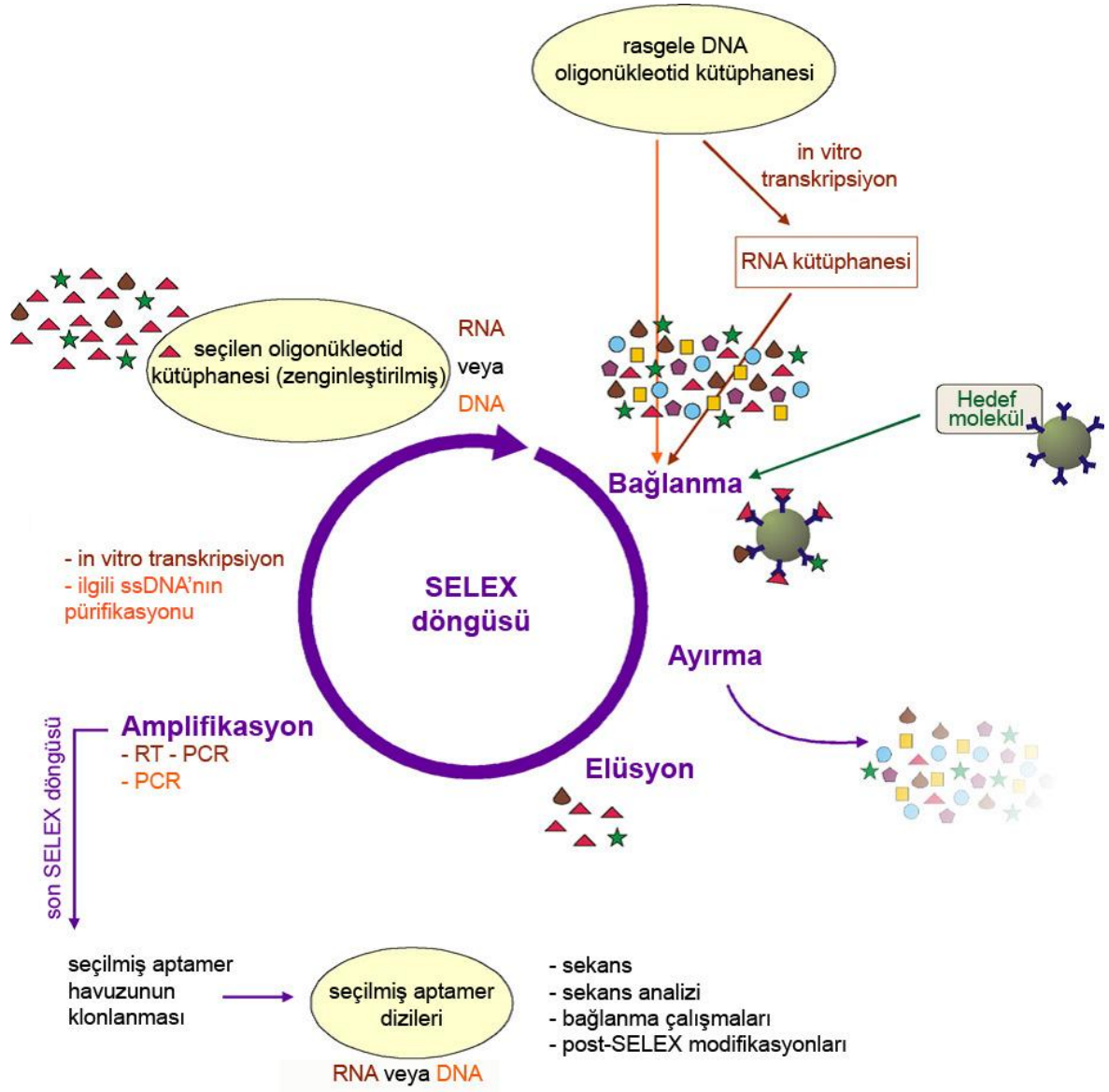
Tipik olarak SELEX prosedürü, belirlenen bir moleküler hedefe karşı aptamer seçimi için; i) nükleik asit havuzunun oluşturulması, ii) seleksiyon, iii) amplifikasyon, iv) izolasyon olmak üzere dört temel basamağın tekrar edilmesinden oluşmaktadır. Tipik bir SELEX prosedürünün başlangıç noktası yaklaşık  $10^{13}$ -  $10^{15}$  farklı dizi motifinden oluşan rasgele DNA kütüphanesinin kimyasal olarak sentezlenmesidir (James,2000). DNA aptamerlerinin seçimi için yönlendirilecek SELEX prosedüründe kütüphane herhangi bir ön uygulama gerektirmeksizin kullanılabilirken, RNA SELEX prosedürüne başlamadan önce bu DNA moleküllerinin RNA kütüphanesine çevrilmesi gerekmektedir. Bir sonraki basamak DNA veya RNA kütüphanesinin direk olarak hedef molekül ile inkübasyonudur. Daha sonra birbirine bağlanan hedef molekül-aptamer kompleksleri, bağlanmayan veya zayıf olarak bağlanan oligonükleotidlerden ayrılır. Bu basamak seçilecek aptamerlerin bağlanma özelliklerini önemli ölçüde etkileyecek, aptamer seçim prosesinin en önemli basamaklarından biridir.

Amplifikasyon basamağında hedef moleküle bağlanan oligonükleotidler ayrılır ve DNA SELEX için PCR ile RNA SELEX için ters transkripsiyon(RT)-PCR ile amplifiye edilir. Bu işlem sonucunda oluşan çift zincirli DNA molekülleri tek zincirli DNA moleküllerine ayrılarak veya in vitro transkripsiyon ile RNA molekülleri sentezlenerek yeni oligonükleotid kütüphanesine dönüştürülür. Seçilmiş oligonükleotidlerden oluşan bu yeni ve zenginleştirilmiş havuz, bir sonraki SELEX döngüsünün bağlanma basamağı için kullanılır. Başlangıçta rastgele oluşturulmuş oligonükleotid havuzu tekrarlayan seçim ve amplifikasyon döngülerinin sonucunda hedef moleküle çok yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanabilen rölatif olarak az sayıda dizi motifine indirgenir (Luzi et al., 2003; Levy-Nissenbaum et al., 2008; Dua et al., 2011). Döngü sayısının önemini hedef molekülün özellikleri ve konsantrasyonu, başlangıçtaki rasgele DNA oligonükleotid kütüphanesinin tasarımı, seleksiyon koşulları, hedef molekülün oligonükleotidlere oranı, ayırım metodunun etkinliği gibi pek çok parametre belirlemektedir. Seçilecek oligonükleotidlerin özgüllüğüne bağlı olarak SELEX prosedürünün döngülerine ek basamaklar tanımlanabilmektedir (Djordjevic, 2007; McKeague and Derosa, 2012).

SELEX prosedürünün ilk tanımlanmasından bu yana, orjinal seçim prosedürünün temel basamaklarının modifiye edilmesine dayanan, herbiri spesifik bir görüşe dayanan 25'ten fazla varyantı tanımlanmıştır (Aquino-Jarquin and Toscano-Garibay, 2011).

Katı-destek matriksine veya hedef moleküle yapısal olarak benzerlik gösteren moleküllere afinite gösteren dizileri elimine edebilmek için negatif veya tersine seçim basamaklarının prosedüre eklenmesi tanımlanan ilk SELEX modifikasyonlarıdır (Ellington and Szostak, 1992; Jenison et al., 1994; Geiger et al., 1996).

Oligonükleotidlerin hedef moleküllerine gösterdikleri afinite, seleksiyon koşullarına uygulanan seçim baskısıyla etkilenebilmekte ve tipik olarak SELEX prosesi sırasında progresif olarak artırılabilir. Bu baskı, daha sonraki SELEX döngülerinde hedef molekül konsantrasyonunun azaltılmasıyla veya tampon yapısı, hacim, süre gibi bağlanma ve ayrılma koşullarının değiştirilmesiyle sağlanabilmektedir (Marshall and Ellington, 2000).



Şekil 2.3. Hedef moleküle özgü aptamerlerin SELEX ile in vitro seçimi (Stoltenburg et al., 2007).

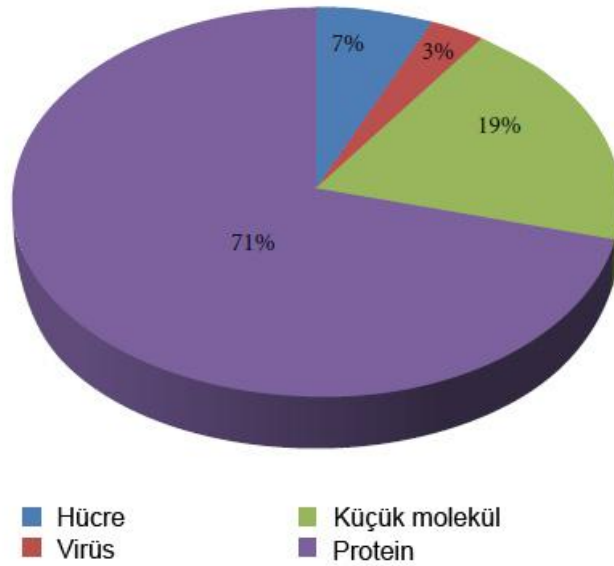
Hedefe özgü oligonükleotidlerin artışının tespit edilmesi, SELEX prosesinin bittiğini işaret etmektedir. Son SELEX döngüsü amplifikasyon basamağından sonra durdurulur ve seçilen havuzdan özgül aptamer klonlarını alabilmek üzere PCR ürünleri çoğaltılır. Bu özgül aptamerler daha sonra dizileri belirlenir ve dizi analizi yapılır. Temsili aptamer klonları seçilir ve afinite ve spesifitelerini de içeren detaylı bağlanma özelliklerini karakterize etmek amacıyla bağlanma çalışmaları yapılır. Aptamer dizisindeki minimal bağlanma bölgelerini en aza indirmek amacıyla mutasyon ve indirgeme deneyleri yapılabilmektedir. Son olarak, seçilen aptamerlerin çoğu analitik tespit çalışmalarında veya hedef molekül saflaştırma çalışmalarında kullanılabilmesi için stabiliteyi artırabilmek üzere post-SELEX

modifikasyonlarına maruz bırakılmaktadır (Stoltenburg et al., 2007; Dua et al., 2011). SELEX prosedürünün şematik olarak gösterimi Şekil 2.3.'de verilmiştir.

Hedefe özgü aptamerlerin seçilmesi için kullanılan SELEX prosedürü, yukarıda bahsedilen dört temel basamağın tekrarından oluşan evrensel bir prosedür olmasına rağmen, herhangi bir hedef molekül için standardize edilebilmiş hiçbir aptamer seçim prosedürü bulunmamaktadır. SELEX dizaynı ve spesifik seçim koşulları hedef molekül, oligonükleotid kütüphanesi veya seçilecek aptamer moleküllerinin istenilen özellikleri ve uygulaması gibi pek çok farklı parametreye bağlıdır.

### 2.2.1. Hedef Molekül Seçimi

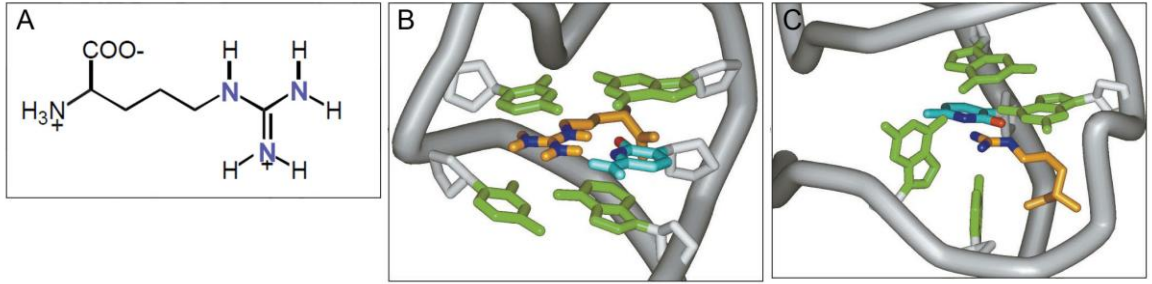
SELEX deneylerinde kullanılmış çok çeşitli hedef moleküllerin varlığı aslında herhangi bir hedef moleküle karşı aptamer seçiminin mümkün olduğunu göstermektedir. Şekil 2.4.'de çeşitli hedef moleküllerin dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Çeşitli hedef moleküllere karşı seçilen aptamer moleküllerinin dağılımı (McKeague and DeRosa, 2012).

Bunun yanında aptamerlerin yüksek afinite ve özgüllükte başarıyla seçilebilmesi için potansiyel bir hedef molekülün sahip olması gereken bazı genel ön koşullar mevcuttur. Belirlenen hedef molekülün yeterli miktarda ve yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Bu seleksiyonun özgüllüğünü artırmakta ve spesifik olarak

bağlanmayan oligonükleotidlerin çoğalmasını önlemektedir. Primer amino grupları gibi pozitif yüklü gruplar, hidrojen bağı alıcı/vericileri ve aromatik grupların varlığı gibi hedef molekülün bazı özellikleri aptamer seçimini kolaylaştırmaktadır (Wilson and Szostak, 1999; Rimmele, 2003). Yüksek ölçüde hidrofobik karakter taşıyan ve negatif yüklü moleküller için aptamer seçimi oldukça zordur. Bu gereklilikler aptamer ile hedef molekül arasında gerçekleşen moleküller arası etkileşimlerin temel prensiplerine dayanmaktadır. Aptamerler hedef moleküllerine yapısal uyum, aromatik gruplar ve aptamer nükleobazları arasındaki yığın etkileşimleri, yüklü gruplar veya hidrojen bağları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin kombinasyonu sonucu bağlanmaktadır (Patel, 1997; Patel et al., 1997; Hermann and Patel, 2000). Hedef molekül varlığında ve bağlanma kompleksinin oluşumu sırasında aptamerler adaptif konformasyonel değişiklikler geçirmektedirler. Üç boyutlu yapıya katlanmalar aptamerlerin küçük hedef molekülleri özgül bir bağlanma cebi oluşturarak tamamen enkapsüle etmelerine olanak sağlamaktadır. Proteinler gibi daha büyük moleküler ağırlığa sahip hedef moleküllerde ise molekül yüzeyindeki farklı altyapılar aptamer bağlanmasında rol oynamaktadırlar. Örneğin, lizin ve arjinin gibi bazik aminoasitlerin yan zincirleri genellikle moleküller arası hidrojen bağlarından sorumludur (Şekil 2.5.) (Hermann and Patel, 2000).



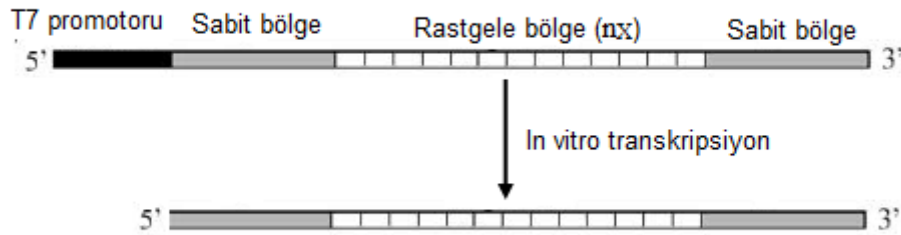
Şekil 2.5. Arjininin (A), DNA (B) ve RNA (C) aptamerleri tarafından tanınması (Hermann and Patel, 2000).

### 2.2.2. Başlangıç Kütüphanesi

SELEX prosesinin başlangıç noktası kimyasal olarak sentezlenmiş rastgele DNA oligonükleotid kütüphanesidir. Bu kütüphane, merkezinde 20-80 nükleotitten oluşan rastgele bir bölge ile bu bölgenin yanlarında PCR için primer bağlanma bölgeleri olarak işlev görecektir. 18-21 nükleotitten oluşan spesifik dizilerin bulunduğu çok sayıda ssDNA ( $\sim 10^{15}$  molekül) fragmentinden oluşmaktadır. DNA

aptamerlerinin seçimi için bu kütüphane DNA SELEX prosesinin ilk döngüsünde direk olarak kullanılabilir. Spesifik dizilerden elde edilen 5' ve 3' uçlarında bulunan ileri ve geri primerler her SELEX döngüsünde seçilen oligonükleotidlerin amplifikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bazı araştırmacılar aptamer seleksiyon prosesini başlatmadan önce, hasara uğramış ve PCR ile çoğaltılamayacak DNA sentez ürünlerini elimine edebilmek amacıyla rastgele DNA kütüphanesini büyük ölçekte amplifiye etmeyi tercih etmektedirler (Marshall and Ellington, 2000). Ayrıca, kimyasal olarak sentezlenmiş DNA moleküllerinin polimeraz ile amplifikasyonunun farklı etkinlikte olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle ilk seleksiyon döngüsünden sonra hedefe bağlanan aptamer dizilerinin bazıları kaybedilebilir. Başlangıç PCR basamağı aynı zamanda amplifikasyon kalıbı olarak işlev gören orjinal oligonükleotidlerin pek çok kopyasının oluşmasını sağlamaktadır.

RNA aptamerlerinin seleksiyonu için ise RNA SELEX prosesinin ilk döngüsüne başlamadan önce, rastgele DNA oligonükleotid kütüphanesinin RNA kütüphanesine dönüştürülmesi gerekmektedir. PCR ile ssDNA kütüphanesini dsDNA kütüphanesine çevirebilmek için 5' ucunda T7 promotor dizisini içeren özel bir sense primer ve bir antisense primer gerekmektedir. Daha sonra dsDNA'nın T7 RNA polimeraz ile in vitro transkripsiyonu yapılarak RNA SELEX'e başlamak için kullanılacak rastgele RNA kütüphanesi oluşturulmaktadır (Şekil 2.6.). Bu SELEX prosesi sırasında her döngü sonunda seçilen RNA molekülleri ile ters transkripsiyon yapılmakta ve yukarıda tanımlanan primer yardımıyla RT-PCR ile amplifiye edilmektedir. Bir sonraki SELEX döngüsü için gereken kütüphane tekrar in vitro transkripsiyon yapılarak oluşturulmaktadır.



Şekil 2.6. Sabit ve rastgele dizileri içeren başlangıç DNA kütüphanesi

Rastgele bölgenin uzunluğu, randomizasyonun türü, DNA veya RNA'da yapılacak kimyasal modifikasyonlar oligonükleotid kütüphanesinin tasarımında dikkat edilmesi gereken önemli noktalar. In vitro seleksiyon deneyleri için genellikle 20-80 nükleotid uzunluğunda rastgele bölgesi olan oligonükleotid kütüphaneleri tercih edilmektedir. Seçilen aptamerlerin büyük bir çoğunluğu SELEX prosesinden sonra minimal fonksiyonel diziyeye indirgenmektedir. Örneğin; insan trombinine karşı seçilen 96 oligonükleotid uzunluğunda 60 oligonükleotid rastgele bölge içeren DNA aptamerleri SELEX prosesinden sonra 15 oligonükleotid uzunluğunda fonksiyonel konsensus dizilere indirgenmiştir (Bock et al., 1992). Bu da başarılı aptamer seçimi için kısa rastgele bölgeler içeren kütüphanelerin yeterli olduğunu göstermektedir. Kısa rastgele bölge içeren kütüphanelerin kimyasal sentezi daha kolay ve ucuz olup, çoğu uygulama için daha çok tercih edilmektedir. Fakat, daha uzun rastgele bölgeye sahip kütüphaneler yapısal olarak daha fazla kompleksiteye sahiptir. Bu, özellikle ne ile ilişkili olduğu veya hangi nükleik asit ile bağlanacağı bilinmeyen hedef moleküllerin seleksiyonu için önem taşımaktadır. Böylece, SELEX süresince oligonükleotidler ve hedef moleküller arasındaki etkileşim daha geniş bir alan üzerinde gerçekleşebilmektedir (Klussmann, 2006). Bu sebeple daha uzun rastgele bölge içeren bir kütüphane özgül ve yüksek afiniteli aptamerlerin tanımlanması için daha fazla olanak sağlamaktadır (Marshall and Ellington, 2000).

SELEX deneylerinin büyük çoğunluğunda tamamen rastgele bölge içeren oligonükleotid kütüphaneleri kullanılmaktadır. Bunun yanında literatürde, afiniteyi artırabilmek veya uygulamaya yönelik fayda sağlayabilmek için bölgesel olarak randomize edilmiş aptamerlerle yapılan çalışmalar da mevcuttur (Davis and Szostak, 2002; Nutiu and Li, 2005).

Doğal nükleik asitlerin dışında, kimyasal olarak modifiye edilmiş oligonükleotid kütüphaneleri; kütüphane karmaşıklığını artırmak, hedef molekül ile etkileşime girecek fonksiyonel grupların eklenmesi ile yeni özellikler kazandırmak, oligonükleotid konformasyonlarının stabilitesini artırmak veya nükleazlara karşı dayanıklılığı artırmak amacıyla SELEX deneylerinde kullanılmıştır (Jayasena, 1999; Klussmann, 2006; Kopylov and Spiridonova, 2000; Kusser, 2000). Aptamer seleksiyonu için fonksiyonel olarak modifiye edilmiş çok sayıda kütüphane

bulunmaktadır ancak SELEX prosesinde kullanılacak enzimlerle uyumlu olmasına dikkat edilmesi gerekmektedir.

### **2.2.3. Seleksiyon**

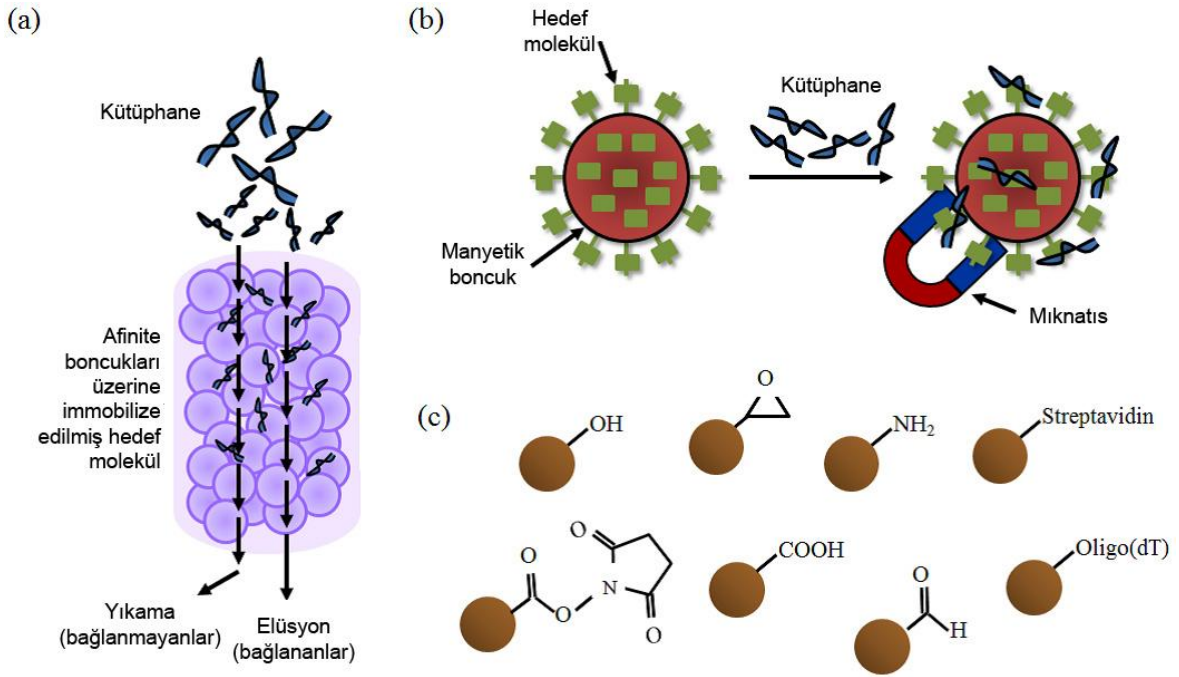
SELEX prosedürünün seleksiyon basamağı; i) hedef molekül ile oligonükleotid kütüphanesinin bağlanmasını, ii) bağlanmayan oligonükleotidlerin ortamdaki uzaklaştırılmasını, iii) bağlanan oligonükleotidlerin geri kazanılmasını içermektedir. Seleksiyon basamağı, yüksek çeşitlilikteki oligonükleotid kütüphanesi içerisinde hedef moleküle en yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanan dizilerin seçimini sağlayacak şekilde tasarlanmalıdır. Bunun için, oligonükleotid kütüphanesi hedef molekül ile direkt olarak belirli bir süre inkübe edilmektedir. Daha sonra gerçekleştirilecek olan, hedef moleküle bağlanan ve bağlanmayan oligonükleotidlerin birbirinden ayrılması, SELEX prosedürünün en önemli basamaklarından biridir. Bu kritik seperasyon basamağı için literatürde tanımlanmış pek çok farklı yöntem bulunmaktadır. Şekil 2.7.'de başlıca seleksiyon yöntemleri gösterilmiştir.

Hedef molekülün belirli bir matris üzerine immobilizasyonu ile gerçekleştirilen ayırım oldukça etkili olmaktadır. Bu durumda, oligonükleotid kütüphanesi immobilize edilmiş hedef molekül ile inkübe edilmektedir. Sepharose® veya agaroz gibi kolon materyallerinin kullanıldığı afinite kromatografisi konvansiyonel olarak kullanılmaktadır (Liu and Stormo, 2005; Tombelli et al., 2005). Ancak, bu yöntemle kolona yüklenecek hedef molekül miktarının fazla olması gerekmektedir. Hedef molekül immobilizasyonu için manyetik boncukların kullanımı öne çıkan ve az miktarda hedef moleküle gereksinim duyan diğer bir yöntemdir (Stoltenburg et al., 2005; Kikuchi et al., 2003; Murphy et al., 2003).

Oldukça yaygın olarak kullanılan diğer bir seperasyon yöntemi ise hedef molekül immobilizasyonu olmaksızın nitroselüloz filtre ile ultrafiltrasyondur (Bianchini et al., 2001; Tuerk and Gold, 1990). Ancak bu şekilde, hedef moleküle bağlanan oligonükleotidlerin kaybedilmesi veya membran materyaline bağlanan spesifik olmayan oligonükleotidlerin çoğaltılması gibi olasılıklar söz konusudur. Son yıllarda, seperasyon basamağı, kapiler elektroforez (CE) (Mendonsa and Bowser, 2004), Flow Sitometri (FC) (Yang et al., 2003), Elektroforetik Hareketlilik Kayma Analizi (EMSA) (Tsai and Reed, 1998), Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) (Misono



and Kumar, 2005) veya santrifüj (Homann and Göringer, 1999) tabanlı pek çok SELEX prosedürü gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.7. SELEX prosedüründe uygulanan seleksiyon basamaklarının şematik gösterimi a) Afinite kolonu, b) Manyetik boncuklar, c) Avidin veya oligo(dT) gibi fonksiyonel gruplar eklenmiş boncuklar (Song et al., 2012).

#### 2.2.4. Amplifikasyon ve Karakterizasyon

Başlangıç oligonükleotid kütüphanesinin oldukça karmaşık olması nedeniyle seleksiyon basamağından sonra sadece birkaç fonksiyonel oligonükleotid kalması beklenmektedir. Bu sebeple daha sonra bu nadir moleküller çoğaltılmaktadır. Amplifikasyon basamağında, seçilen aptamer kütüphanesinin çoğaltılması amacının yanı sıra, özel primerler kullanılarak algılama, immobilizasyon, uzatma gibi amaçlar için aptamer dizilerini modifiye etmek mümkündür.

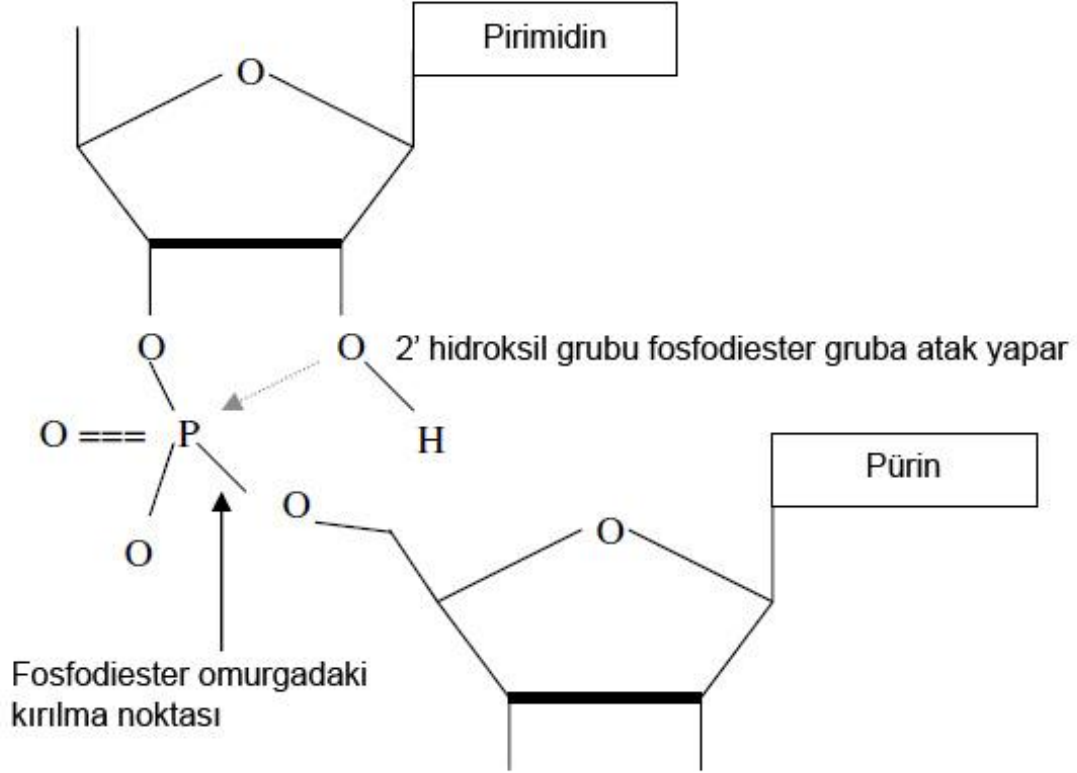
Bu basamakta, RNA ve DNA aptamerlerinin oluşumu için gerçekleştirilen SELEX prosesleri birbirinden önemli ölçüde ayrılmaktadır. RNA oligonükleotidleri ile öncelikle ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) gerçekleştirilir. cDNA oluştuktan hemen sonra PCR ile amplifiye edilir. Primerlerden biri 5' ucunda RNA polimeraz aktivitesi için T7 promotor bölgesini içermelidir. Buna karşılık, tek zincirli DNA (ssDNA) aptamerleri sadece PCR ile amplifiye edilmektedir.

Amplifikasyon basamağından sonra bir SELEX döngüsü bitmiş olmaktadır. Bu aşamada, elde edilen diziler bir sonraki döngü için kütüphaneyi oluşturmak üzere amplifiye edilmektedir. Bu şekilde, belirlenen sayıda SELEX döngüsü ard arda tekrar edilmektedir. Bu döngüler sonunda, orjinal kütüphanenin karmaşıklığı giderek azaltılarak, hedef moleküle bağlanan aday moleküller zenginleştirilmiş olmaktadır. Zenginleştirilen kütüphanenin afinitesi daha fazla artırılamadığı zaman (6-20 döngü sonunda), dizilerin tanımlanması gerekmektedir. Sonuçta elde edilen aptamer dizileri, hedef moleküle ve seçim prosesinin zorluğuna bağlı olarak, 1-1,000,000 farklı diziden oluşabilmektedir (Conrad et al., 1995). Daha sonra, seçilen diziler DNA dizi analizi ile analiz edilmektedir. DNA dizi analizi sonuçlarının yorumlanması amacıyla bazı yazılımlar kullanılmaktadır. Analiz sonuçları seçilen kütüphanenin karmaşıklığının ve homolog dizilerin tanımlanmasını sağlamaktadır. Aptamer dizilerinin sekonder yapılarının analizi de hedef moleküle bağlanmayla ilgili bilgi vermektedir. Bu analiz genellikle internet üzerinden erişilebilen MFold (Zuker, 2003) programı ile yapılmaktadır. Alternatif diziler arasından hedef molekül bağlanma afinitesi ve özgüllüğü en yüksek olan dizi, ileri karakterizasyon çalışmaları (motif taraması, ikincil ve üçüncül yapılarının araştırılması v.b.) sonucunda belirlenmektedir. Karakterizasyon çalışmaları sonucu seçilen aptamer molekülü kimyasal sentez yöntemleri kullanılarak çoğaltılabilmektedir (Bunka and Stockey, 2006).

### **2.3. Aptamer Moleküllerinin Kararlılığı**

Aptamerleri oluşturan nükleotidlerin doğası, üç boyutlu yapıların dağılımını belirlemede ve degradasyona karşı gösterdiği stabilitede önem taşımaktadır. Doğal bazlardan oluşan tek zincirli oligonükleotidlerin enzimatik veya kimyasal yıkıma gösterdiği yatkınlık aptamerlerin kullanımı açısından pratikte önemli bir handikap oluşturmaktadır. Özellikle nötral pH'tan daha yüksek değerlerde ve neredeyse bütün biyolojik örneklerde bulunan özellikle RNaz gibi endonükleazların varlığında ribozun 2' hidroksil grubu oldukça reaktiftir. 2' hidroksil grubu fosfodiester omurgaya atakta bulunarak kırılan bağın 5' ucunda 2', 3' siklik fosfat ve 3' ucunda serbest bir hidroksilin oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 2.8.). Birçok geçiş metal iyonunun ve ribonükleazların birçoğunun 2', 3' siklik fosfat oluşumuna sebep olması, aptamer moleküllerinin ömürlerini çözültü içerisinde yaklaşık olarak 10 dakikadan kısa bir zaman dilimi ile kısıtlamaktadır (Kusser, 2000; James,

2001). Bu yıkımdan korunmak için; i) nükleotid bazlarının modifikasyonu, ii) fosfodiester omurgasının modifikasyonu, iii) spiegelmerler olarak bilinen enantiyomerik aptamerlerin kullanımı gibi bazı yaklaşımlar geliştirilmiştir (Sampson, 2003).



Şekil 2.8. 2' hidroksil grubunun oligonükleotidin fosfodiester omurgasına yaptığı nükleolitik atak (Sampson, 2003).

### 2.3.1. Nükleotid Bazlarında ve Fosfodiester Omurgada Gerçekleştirilen Kimyasal Modifikasyonlar

Her ne kadar aptamer-ligand etkileşimleri hidrojen bağları sayesinde sağlanmaktaysa da RNA kütüphaneleri DNA kütüphanelerine karşı, RNA-RNA polimeraz enzimlerinin RNA-DNA polimeraz enzimlerine göre daha fazla eşleşme hatası yapmasından kaynaklanan, bir çeşitlilik üstünlüğüne sahiptir (Gopinath, 2007; Klussmann, 2006). Ancak RNA kütüphaneleri ile elde edilen RNA aptamerleri yapılarında bulunan 2' hidroksi grubu (-OH) sebebiyle nükleaz ataklarına daha çok maruz kalma eğilimi göstermektedirler (Klussmann, 2006; Stoltenburg et al., 2007).

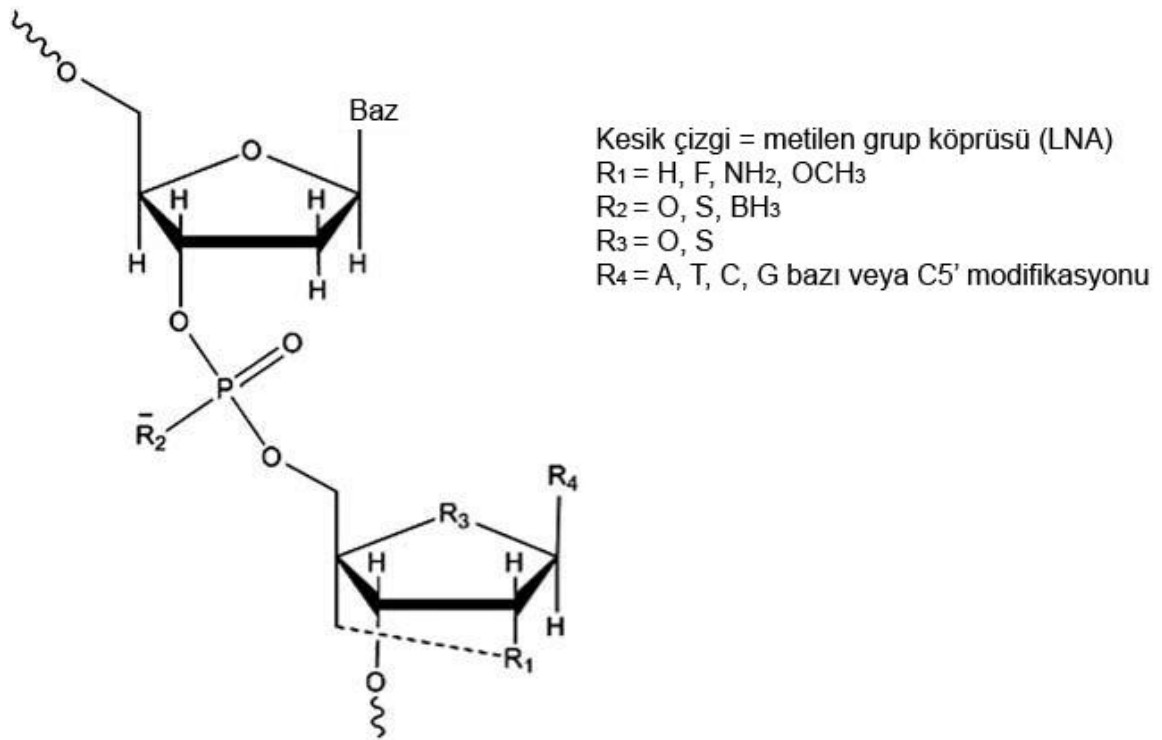
Tipik olarak RNA kütüphanelerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar riboz şekerinin 2'-pozisyonunda gerçekleştirilmektedir. Pirimidin nükleotidlerinin 2'-OH riboz grubu, RNA molekülünü nükleaz degradasyonundan korumak amacıyla 2'-NH<sub>2</sub> veya 2'-F grubuyla yer değiştirilmektedir. Ayrıca, aptamer seleksiyonu için 2'-O-metil grubu içeren nükleotidler ile oluşturulmuş RNA kütüphaneleri tanımlanmıştır (Burmeister et al., 2005). Nükleik asit moleküllerine tanımlanacak yeni fonksiyonel özellikler genellikle pirimidin nükleobazlarının C-5 pozisyonunun veya pürin nükleobazlarının C-8 pozisyonunun modifikasyonu ile oluşturulmaktadır (Kopylov and Spiridonova, 2000). Pirimidinlerin 5'-pozisyonunda I, Br, Cl, NH<sub>3</sub> ve N<sub>3</sub> modifikasyonları tanımlanmıştır (Kopylov and Spiridonova, 2000).

Nükleik asitlerin fosfat omurgasında gerçekleştirilen modifikasyonlar da aptamerlerin in vitro seleksiyonuna uygulanmıştır. En yaygın modifikasyon fosfodiester bağındaki bağlanmayan oksijen ile sülfürün yer değiştirilmesidir (Andreola et al., 2000). Bunun sonucunda bir phosphorothioate bağı oluşmakta ve bu şekilde oluşan oligonükleotidlerin nükleaz yıkımlarına karşı dayanıklılığı artırılmış olmaktadır. Phosphorothioate SELEX ile başarılı aptamer seleksiyonları literatürde gösterilmiştir (Jhaveri et al., 1998; King et al., 2002).

Seleksiyon gerçekleştirildikten sonra seçilen aptamer moleküllerinin stabilitesinin artırılması veya hedef molekül ile bağlanma parametrelerinin optimize edilmesi amacıyla post-SELEX modifikasyonları da gerçekleştirilmektedir. İleri uygulamalar için tanıma veya immobilizasyon için fonksiyonel gruplar ile modifikasyonlar gerçekleştirilebilmektedir.

Aptamerlerin biyostabiliteilerinin artırılması amacıyla başlangıç kütüphanesinde gerçekleştirilen yukarıda belirtilen kimyasal modifikasyonlara benzer modifikasyonlar yapılmaktadır. Örneğin, riboz halkasının 2'-OH grubunun 2'-F, 2'-NH<sub>2</sub> veya 2'-O-metil gruplarıyla yer değiştirmesi RNA molekülünü nükleaz degradasyonundan korumaktadır (Green et al., 1995; Rhodes et al., 2000; Ruckman et al., 1998). Streptavidin-biyotin, ters timidin ile 3'-uç şapkalama veya amin, fosfat, polietilenglikol, kolesterol, yağ asitleri, proteinler gibi çeşitli 5'-şapkaları oligonükleotidleri ekzonükleazlardan korumaktadır (Dougan et al., 2000; Klusmann, 2006; Marro et al., 2005).

Locked nükleik asitler (LNA'lar) (Petersen and Wengel, 2003) aptamer stabilizasyonu açısından oldukça ümit vermektedir. LNA nükleotidlerinde, post-SELEX modifikasyonu olarak, 2'-oksijen ve 4'-karbon bir metilen ile kovalent olarak köprü yaparak şeker bisiklik yapılıdır. Böylece LNA'ların helikal termostabilitesi önemli ölçüde artmakta ve RNA veya DNA ile hibritleştiğinde oldukça özgül bağlanma göstermekte ve bunun yanında nükleaz degradasyonuna dayanıklı hale gelmektedir (Darfeuille et al., 2004; Klussmann, 2006; Schmidt et al., 2004). Şekil 2.9.'da aptamer moleküllerinde yaygın olarak gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar özetlenmiştir.



Şekil 2.9. Aptamer yapılarında yaygın olarak gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar (You et al., 2011).

### 2.3.2. Ayna Görüntülü “Spiegelmer” Aptamer Molekülleri

Almancada ayna anlamına gelen “spiegel” kelimesinden türetilen (Klussmann et al., 1996) spiegelmerler, aptamerlere nükleaz direnci kazandırmak amacıyla geliştirilmiş ayna görüntülü sentetik oligonükleotid yapılarıdır.

Doğal (D-) konformasyona sahip 5 karbonlu şekerler yerine kullanılan, doğal olmayan enantiyomerik formda L-riboz ve L-2'-deoksiriboz moleküllerinden oluşturulan spiegelmerler, aptamerler gibi hedef moleküllerine yüksek seçicilik ve

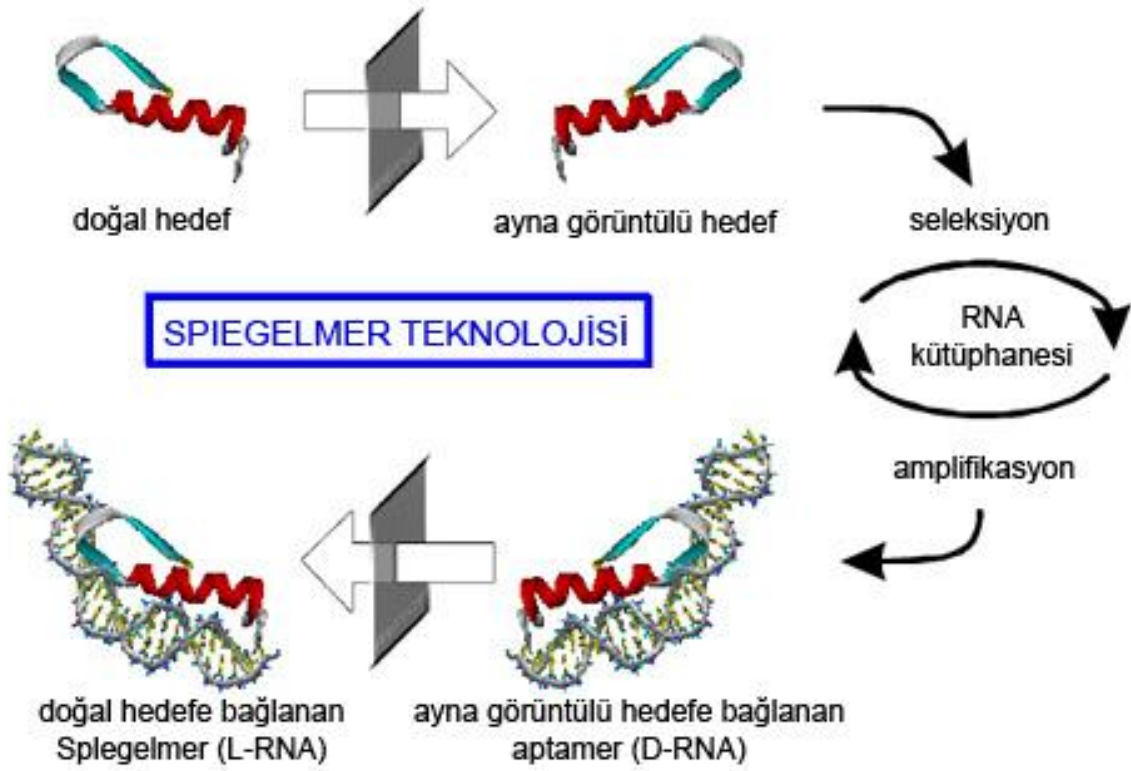
afinite ile bağlanırken, L konformasyonundaki moleküler yapısı nedeniyle nükleaz enzimleri tarafından parçalara ayrılmamaktadırlar (Klussmann et al., 1996; Nolte et al., 1996). Çünkü nükleazlar aptamerlerin in vivo stabilitelerini sadece nükleik asitlerin doğal olarak oluşan D-izomerlerini tanıyarak engelleyebilmektedir (Eulberg and Klussmann, 2003; Klussmann et al., 1996; Nolte et al. 1996). Kiral formdaki L-nükleik asitler ise biyolojik olarak oldukça stabil olup in vivo ortamda çok daha uzun ömre sahiptir.

Polimerazlar sadece doğal olarak oluşan izomerlere karşı enantiyo-spesifik olduğundan, SELEX prosedürü L-nükleik asitler ile gerçekleştirilememektedir. Bu engelin aşılabilmesi için “ayna görüntülü” SELEX prosedürü geliştirilmiştir. Bu metodla hedef molekülün ayna görüntüsüne karşı D-RNA molekülleri ile seleksiyon gerçekleştirilmiştir (Klussmann et al. 1996). Protein hedefler için bu doğal olarak oluşan L-amino asitleri yerine D-amino asitleri ile peptid moleküllerinin sentezlenmesi ile gerçekleştirilir. D-RNA/D-amino asit kompleksi L-RNA/L-amino asit kompleksinin enantiyomeridir ve bağlanma afinitesi de dahil olmak üzere birbirleriyle aynı kimyasal özelliklere sahiptir. Böylece, D-peptidine bağlanan D-aptameri bir kez tanımlandıktan sonra doğal olarak oluşan L-peptidine aynı yüksek afiniteyle bağlanacak L-aptamerinin sentezlenmesi oldukça kolaydır. Bu L-aptamerleri spiegelmerler olarak tanımlanmıştır.

Spiegelmerler üzerine yapılan çalışmalar, bu moleküllerin doğal (D-) konformasyonuna sahip DNA/RNA molekülleri ile hibritleşemediklerini ve hedef moleküllere aptamer analogları ile aynı seçicilikte ve afinite de bağlandıklarını göstermiştir (Leva et al., 2002). Spiegelmerlerin yukarıda ayrıntılı bir şekilde açıklanan bu üstün özellikleri, birçok farklı moleküle karşı (arjinin, adenosin, vazopresin v.b.) spiegelmer moleküllerinin geliştirilmesine sebep olmuştur (Williams et al., 1997; Nolte et al., 1996; Klussmann et al., 1996). Spiegelmer teknolojisinin şematik olarak gösterimi Şekil 2.10.'da verilmiştir.

Spiegelmerlerin plazmada 60 saatten fazla ömrü olduğu gösterilmesi (Eulberg and Klussmann, 2003) ve kimyasal yapılarının D-konformasyonuna sahip nükleik asitler ile çok yakın olması, minimal immünolojik ve non-toksik özellik göstermeleri nedeniyle (Sooter and Ellington, 2002) bu moleküllerin ilaç adayları olarak konvansiyonel aptamerlere göre öne çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca tüm bu

özellikler spiegelmer moleküllerini *in-vitro* ve *in-vivo* diagnostik ve *in-vivo* görüntüleme ajanları olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Ancak bu yaklaşımın sadece komplementer enantiyomer molekülü sentezlenebilecek hedef moleküller için geçerli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (Bowser, 2005).



Şekil 2.10. Spiegelmer teknolojisinin şematik gösterimi

#### 2.4. Aptamer Moleküllerinin Temel Uygulama Alanları

Aptamer molekülleri, yüksek afinite ve seçicilik özellikleri nedeniyle, terapötik, moleküler tanı ve biyoanalitik uygulama alanlarında yüksek kullanım potansiyeline sahiptir. Hızla gelişmekte olan aptamer teknolojisinin yakın gelecekte, biyoanalitik uygulama alanlarında, günümüzde yaygın olarak kullanılan faj gösterim (phage display) ve monoklonal antikor tekniklerinin yerini alması beklenmektedir. Aptamer moleküllerinin uygulama alanlarından temel olanları, aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

## **2.4.1. Aptamer Moleküllerinin Analitik Uygulamaları**

### **2.4.1.1. Kromatografi**

Kromatografik metotların temeli, mobil fazda hareket halinde olan analitin durağan fazda olan kolon ile etkileşime girip diferansiyel olarak alıkonulması prensibine dayanmaktadır (Tombelli et al., 2005; Mairal et al., 2008). Aptamerlerin spesifik hedeflerine karşı oldukça yüksek afiniteye sahip olması, afinite kromatografisinde durağan faz olarak kullanımını da beraberinde getirmiştir. Aptamerlerin kolaylıkla modifiye edilebilir ve immobilize edilebilir olmalarının yanında yüksek stabiliteye sahip olmaları ve yeniden üretilebilir olmaları kromatografik tekniklerde kullanılabilmesi açısından avantaj sağlamaktadır (Ravelet and Peyrin, 2009; Peyrin, 2009). Küçük moleküllerin, izoformların ve proteinlerin pürifikasyon ve seperasyonu için açık tübüler kapiller, dolgulu kolon ve monolitik kolon formlarında çok çeşitli aptamer-tabanlı kromatografik teknik tanımlanmıştır (Zhao et al., 2008). Örneğin, anti-17 $\beta$ -estradiol (E2) aptameri katı fazdaki boncukların üzerine immobilize edilmiş ve bu seçici afinite boncukları katkılı su örneklerinden E2 molekülünün seçiminde kullanılmış olup; tekrarlı HPLC analizleri yüksek geri kazanım ve yenilenmenin olduğunu göstermiştir (Huy et al., 2011). Basit hedef moleküllerin seperasyonunun yanında, basit kare kapillerlere aptamer moleküllerinin immobilize edilmesiyle, akış süspansiyonundan kanser hücrelerinin %90 etkinlikle seçici yakalanması gibi daha kompleks hedef moleküller ile kromatografik seperasyon yöntemleri de gösterilmiştir (Martin et al., 2011).

### **2.4.1.2. Kapiler Elektroferez**

Kapiler elektroferez, elektroferez tekniğinin kapiler kolonlara uyarlanmış halidir. Elektrik alan içerisinde, iyonize edilmiş bileşenlerin hareket ettirilmesi yoluyla bu bileşenlerin (moleküller yapı, yük, büyüklük v.b. etkenlere bağlı olarak) elektroforetik mobilitelerindeki ve hareket hızlarındaki farklılıkları sebebiyle birbirinden ayrıştırılması prensibine dayanmaktadır (Huang et al., 2004).

Kapiler elektroferez düşük örnek ve reaktif tüketimi, kısa analiz zamanı, yüksek seperasyon performansı, otomasyon kolaylığı ve fizyolojik koşullar altında moleküler etkileşimlerin algılanabilmesinden dolayı afinite çalışmalarında oldukça ilgi çekmektedir. Kapiler elektroferez deneylerinin çoğu tespit hassaslığı ve



seçiciliği sebebiyle lazer-indüklü floresan (LIF) tespitine dayanmaktadır (Iliuk et al., 2011).

Aptamerlerin seperasyon ve tespitteki avantajları nedeniyle kapiler elektroforez tabanlı kantitatif analizlerde afinite probu olarak kullanılmaları ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Kotia et al., 2000). Elektroforez, serbest aptamerler ile aptamer-hedef molekül kompleksinin ayırımında etkili olarak kullanılmaktadır. Bu ayırımında, aptamer hedef molekül etkileşiminde oluşan boyut değişimleri veya yapısal geçişlerin neden olduğu elektroforetik özelliklerde meydana gelen değişiklikler rol oynamaktadır. Bunun yanında, aptamerler kapiler elektroforezde kullanılan LIF tespiti için kolaylıkla floresan olarak etiketlenebilmektedir. Antikor tabanlı afinite elektroforezi uygulamalarının geliştirilmesi için prob olarak aptamerlerin kullanıldığı pek çok afinite çalışması yapılmıştır. Aptamerlerin, afinite kapiler elektroforez konfigürasyonlarında afinite probu olarak kullanılmalarının getirdiği en önemli avantaj; aptamer moleküllerinin nükleik asit yapılarından kaynaklanan kararlı yük-kütle oranları nedeniyle sahip oldukları kestirilebilen elektroforetik mobiliteleri ve buna bağlı olarak oluşan homojen elektroforetik paternlerinden kaynaklanmaktadır (Tombelli et al., 2005).

#### **2.4.1.3. Biyosensör Sistemleri**

Tipik olarak bir biyosensör; enzim, antikor veya reseptör gibi bir biyolojik tanıma elementi ve elektrokimyasal, optik, termal gibi sistemleri temel alan bir çevirici olmak üzere iki temel elementten oluşmaktadır. Bir analiz işleminde birden çok basamak gerektiren spektrofotometre veya kütle spektrometresine benzer diğer analitik metodların aksine, biyosensörler uygulaması kolay, doğrudan okuma yapabilen analitik cihazlardır (Iliuk et al., 2011). Biyolojik tanıma büyük ölçüde reseptör molekülün hedef moleküle olan seçicilik ve özgüllüğüne dayanmaktadır. Bu özellikleri taşıyan aptamerler moleküler tanıma elementleri olarak kullanılabilir (Nguyen et al., 2009). Biyotanıma elementi olarak aptamerleri kullanan biyosensör sistemleri için “aptasensör” tanımı da kullanılmaktadır. Aptamerler, sentetik olarak üretildikleri için potansiyel kullanım alanları neredeyse sınırsızdır. Küçük moleküllerin, proteinlerin ve hücrelerin tespiti için kullanılabilir. Aptasensörler özellikle antikorların ve benzeri protein yapısındaki tanıyıcı elemanların, toksinleri küçük molekül yapılarından dolayı tespit

etmedeki kısıtlamaları ortadan kaldırmaktadır. Aptamer moleküllerinin biyosensörlere biyokomponent olarak uygulanması antikora dayanan klasik afinite ölçüm metodlarına göre, immobilize olmuş aptamer fonksiyonunun kolaylıkla rejenere olması, moleküllerin in vitro ortamda homojen olarak hazırlanabilmesi ve kolay işaretlenebilirliği sayesinde farklı tespit metodlarında kullanılabilmesi gibi pek çok avantaj sunmaktadır (Jayasena, 1999; O'Sullivan, 2002; Luzi et al., 2003; You et al., 2003).

Bütün bu üstünlüklerine rağmen aptamerlerin üç boyutlu yapılarının sensör sistemleri ile entegre edildiğinde korunmasındaki zorluklar ve tanıma işleminin uygun bir sinyale çevrilmesindeki zorluklar aptamerlerin biyosensör uygulamalarında kullanımlarını kısıtlamaktadır (Song et al., 2008). Diğer yandan, aptamerlerin biyosensör alanında uygulaması yüksek afinite ve değiştirilebilir özellikler açısından avantaj sağlamaktaysa da, hassaslıkları büyük oranda çevirici sistem tarafından belirlenmektedir. Aptasensör uygulamaları için kullanılmakta olan birkaç çevirici sistem ileri uygulamalar için umut vericidir (Cho et al., 2009; Zhou et al., 2010).

#### **2.4.1.3.1. Elektrokimyasal Tanıma**

Aptasensörlerde elektrokimyasal tanıma yüksek hassaslık, hızlı cevap, dayanıklılık, düşük maliyet ve minyatürize edilebilme potansiyeli gibi avantajlara sahip olması sebebiyle giderek ilgi çekmektedir. DNA aptamerleri stabilitesi daha düşük olan ve kolaylıkla biyodegradasyona uğrayabilen RNA aptamerlerine (Ferafontova et al., 2008) kıyasla biyosensör uygulamalarında daha çok kullanılmıştır. Bunun yanında pek çok grup tarafından L-nükleotidleri içeren enantiyomerik aptamerlerin kullanımı veya kimyasal modifikasyonlar ile bu problem aşılmaya çalışılmıştır (Vaught et al., 2004; Mascini et al., 2007).

Aptamer tabanlı elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde, tasarım ve tanıyıcı elementin immobilizasyonu biyosensör performansını etkileyen iki önemli faktördür (Yin, 2012). Yüzey immobilizasyonu nükleik asit probunun spesifik absorpsiyonuna olanak verirken arka plandaki gürültüyü azaltmaktadır. Fiziksel absorpsiyon ve kimyasal absorpsiyon stratejilerinin arasında altın-tiyol bağının oluşumu rölaf olarak çok daha kolaydır ve immobilizasyon için en yaygın kullanılan yöntemdir.  $-COOH$  ve  $-NH_2$  grupları arasında oluşan karbodiimid bağı

da nükleik asit probunun immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Feng et al., 2011). Bunun yanında biyotinlenmiş aptamer molekülleri streptavidin ile modifiye edilmiş elektrodalara biyotin-avidin etkileşimi ile bağlanmaktadır (Kim et al., 2010). Elektrokimyasal problemler aptamer ile hedef molekül arasındaki hibritleşmeyi okunabilir sinyallere çevirerek belirtmektedir. Bu sebeple aptamer dizaynı hedef molekülün tanınmasını ve sinyal moleküllerin bağlanmasını kolaylaştırmalıdır<sup>14</sup>.

Bu alandaki çalışmalar genellikle yaygın olarak çalışılan aptamer molekülleri ile yapılmış olup elektrod olarak altın filmler, altın nanopartiküller, silikat ve silikon oksit yüzeyler, karbon nanotüpler kullanılmıştır (Xu et al., 2009; Iliuk et al., 2011). Sandviç yapılar, konformasyonel değişim, hedef molekül yer değiştirmesi gibi farklı tanıma stratejileri kullanan pek çok elektrokimyasal aptasensör tanımlanmıştır (Xu et al., 2009).

#### **2.4.1.3.2. Kütle Hassas Tanıma**

Kütle hassas tanımda işaretleme için ek bir uygulamaya gerek duymaksızın sensör yüzeyindeki kütle değişimleri kaydedilmektedir. Daha da önemlisi, bu tanıma metodu gerçek-zamanlı tanıma amacıyla kullanılabilir. Buna rağmen kütle değişimi tabanlı tanımanın birtakım zorlukları vardır; bu sebeple, protein veya hücre gibi büyük hedef moleküller için uygulanabilir olmasına karşın küçük moleküller için uygun değildir (Iliuk et al., 2011). Bu tanıma prensibiyle geliştirilen kuvars kristal mikrobalans (QCM), yüzey akustik dalga (SAW) sensörleri yaygın olarak çalışılmaktadır (Song et al., 2008). Literatürde, kuvars kristal yüzeyler üzerine plazma polimerizasyon yöntemi ile tanıyıcı moleküllerin immobilize edildiği (Mutlu et al., 1999; Mutlu et al., 2008) çeşitli antikör (Akdoğan et al., 2006), GDO (Karamollaoğlu et al., 2009) ve aptamer (Selvi, 2009) sensörleri tanımlanmıştır.

#### **2.4.1.3.3. Optik Tanıma**

Aptamerler biyo-tanıyıcı element olarak hem etiketlenmiş hem de etiketlenmemiş olarak optik biyosensörlerde kullanılmaktadır (Tombelli et al., 2005). Hedef moleküller kolorimetre, kemilüminesan veya daha gelişmiş olarak floresana dayalı farklı optik teknikler ile tespit edilebilmektedir (Sassolas et al., 2011).

Kemilüminesan tanıma, ışık sinyali yaratan floresan gibi herhangi bir harici bir ışık kaynağına ihtiyaç duymayan ve basit bir sistem olarak pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple kemilüminesan tabanlı aptasensörler popüler bir seçenek haline gelmiştir (Iliuk et al., 2011).

Floresan tanıma moleküler etkileşimleri belirlemek için en hassas metodlardan biridir. Aptamer molekülleri floresan etiketlerle modifiye edilebildikleri için, pek çok yaklaşım floresan işaretli aptamerlerin nasıl geliştirileceği ve aptamer molekülü ile hedef molekül birbirine bağlandığında oluşacak floresan sinyal değişiminin nasıl belirleneceği üzerine odaklanmaktadır. Floresan tanımda, bir “quencher” ve bir florofor ile aptamerlerin etiketlenmesi en basit yöntemdir. Buna ek olarak, kuantum dotlar (QD), altın nanopartiküller, karbon nanotüpler, grafen oksit (GO) gibi nanomateryaller geleneksel olarak kullanılan “quencher” yerine floresan baskılayıcı etkileri için araştırılmaktadır (Chhabra et al., 2009; Habenicht and Prezhdo, 2008; Liu et al., 2011; Olek and Büsqen, 2006).

Floresan-tabanlı sensörler floroforların uyarılmayla birlikte emisyonu prensibine dayandığı için florometre veya floresan mikroskop gibi analitik bir ekipmana ihtiyaç duymaktadır. Buna karşın tanıma basamağı herhangi özel bir ekipmanla gerçekleştirilmezse sensör sistemi daha pratik olabilir. Kolorimetrik tanıma, çok hassas olmasa da çıplak gözle analit tespitine olanak sağlayan pratik bir teknik olarak göze çarpmaktadır (Iliuk et al., 2011).

Yüzey plazmon rezonans (SPR) ise hiçbir etiketleme metoduna gereksinim duymadan tanıma işlemini gerçekleştiren, ince bir metal ile kaplı prizma ile solüsyon ara yüzünde gerçekleşen optik bir tekniktir. SPR, yüzeyde oluşan kırılma indeksinin değişimini tanımlamak için kullanılmaktadır. Işık, rezonans açısı olarak adlandırılan özel bir açıyla prizmaya geldiğinde yansıyan ışığın yoğunluğu en düşüktür. Bu açı, metal yüzey üzerinde biyomoleküllerin varlığında çok hassas olarak değişmektedir. Yansımadaki değişimler yüzeye bağlı biyomoleküllerin kütlesiyle orantılı bir sinyal vermektedir. Bir molekül tespit etmek için aptamer molekülleri yüzeye immobilize edilir ve molekül ile aptamer birbirine bağlandığında kütle ve kırılma indeksi artar. Etiketsiz bir yöntem olduğu için, aptamerlerin kullanıldığı biyosensör çalışmalarında, özellikle protein tespitinde sıklıkla

kullanılmaktadır (Gooding, 2006; Green et al., 2000; Homola, 2006; Karlsson, 2004; Phillips and Cheng, 2007).

#### **2.4.2. Aptamer Moleküllerinin In Vivo Uygulamaları**

Aptamerler, teorik olarak istenilen herhangi bir hedef molekölü yüksek seçicilik ve afiniteyle tanıyacak şekilde geliştirilebilmektedir. Bunun yanında antikor veya diğer protein molekülleriyle karşılaştırıldığında aptamerler zorlu biyolojik koşullarda oldukça stabildir. Bu üstün özellikler aptamerlerin terapi, hedeflenmiş terapi ve biyogörüntüleme gibi alanlarda kullanımına olanak vermektedir(Dua et al., 2011).

Kanser veya viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili hedef moleküllere özgü aptamerlerin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Geliştirilen aptamer moleküllerinin öncelikli olarak teşhis veya tedavi amaçlı uygulanabilirliğine önem verilmektedir. 2004 yılında, AMD (Age-related Macular Degeneration) için geliştirilen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) aptameri, FDA (Food and Drug Administration) onayı almış ve "Macugen" ismiyle ticari olarak piyasaya sürülmüştür (Eyeteck Study Group, 2002; Eyeteck Study Group, 2003). Bu önemli gelişmeden sonra bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır. Şu an akut miyeloid lösemi, karotid arter hastalığı, koagülasyon hastalıkları için geliştirilmekte olan ve klinik deneme aşamasında bulunan çeşitli aptamer tabanlı ilaçlar mevcuttur (Keefe et al., 2010).

Hücre yüzey reseptörlerine karşı geliştirilen aptamerler, hücrelerin içine terapötik parçaların taşınması amacıyla değişikliğe uğratılabilmektedir. Nanopartikül aracılı hedeflenmiş ilaç taşınımı sistemlerinde aptamer moleküllerinin kullanımı özgüllük ve kolay modifiye edilebilirlik yönleriyle, bu sistemlere ek avantajlar sunmaktadır. Bunun yanında, aptamer moleküllerinin nano ölçekteki küçük boyutları sayesinde oluşan kompozit, yapının boyutlarında çok küçük değişimlere sebep olmaktadır. Bu da ilacın pasif alımı ve taşınımı açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla gerçekleştirilen ilk yaklaşımda, önemli bir prostat hücre kanseri belirteci olan PSMA'ya karşı geliştirilen aptamer moleküllerine, antikanser ilaç yüklenmiş ve kanserli prostat hücrelerine etkin olarak tanıtılmıştır (Min et al., 2011).

Diğer bir uygulama alanı olan biyogörüntülemede, florofor, QD (quantum dot) veya manyetik rezonans görüntülemede (MRI) faydalı olabilecek herhangi bir materyal

ile aptamer molekülleri konjuge edilerek kullanılmaktadır. Aptamerlerin görüntüleme ajanı olarak kullanımındaki en büyük avantaj, nükleik asit doğalarından dolayı insan vücudu için toksik ve immünojenik özellikte olmamalarıdır. Bunun yanında aptamer kullanımı ile, kesin hedefleme ve kan dolaşımına hızlı difüzyon sağlanabildiği için teşhis ve analizde kesin sonuçlar alınabilmektedir. Bu sayede aptamerler tek bir proteinin veya hücrenin görüntülenmesinde aracı moleküller olarak kullanılmaktadır (Song et al., 2012).

Elbette, aptamerlerin biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için bazı problemlerin aşılması gerekmektedir. Örneğin, in vivo uygulamalar için modifiye edilmemiş aptamer molekülleri nükleaz yıkımlarına oldukça yatkındır. Bunun yanında, küçük boyutları sebebiyle renal filtrasyona eğilimlidirler (Nimjee et al., 2005). Ancak aptamerlerin eşsiz özellikleri nedeniyle biyolojik olarak kullanımlarının gittikçe artması beklenmektedir.

## **2.5. Model Aptamer Sistemi**

Model aptamer sistemleri, aptamer molekülleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda belirli bir standartın yakalanması amacıyla, literatürde genel olarak kullanılan ve kabul gören yayınlanmış SELEX yöntemi sonuçlarına dayanarak elde edilen aptamer-ligand yapılarıdır (Balamurugan et al., 2006).

## **2.6. Floresan Proteinler**

Floresan proteinler, çoğunlukla mercan resifleri olmak üzere deniz organizmalarının homolog proteinlerinden oluşan familyayı temsil etmektedir. 450 – 655 nm civarında, yaklaşık tüm görünür ışık spektrumunda parlak floresan ışımaya göstermeleri temel karakteristik özellikleridir (Pakhomov and Martynov, 2008; Shaner et al., 2007). Bu protein familyasının en çok çalışılmış, fotokimyasal ve fotofiziksel özelliklerinin anlaşılmasına katkı sağlayan pek çok varyantı bulunan üyesi, Yeşil Floresan Protein (GFP)'dir.

### **2.6.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)**

Yeşil floresan protein, keşfedilişinden bu yana biyolojik ve tıbbi araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılan bir protein haline gelmiştir. Yeşil floresan protein (GFP), ilk defa 30 yıldan fazla bir süre önce, 1962 yılında, bir medüz türü olan *Aequorea victoria*'dan izole edilmiş (Shimomura et al., 1962) ve orijinal floresan özellikleri

kaydedilmiştir (Shimomura et al., 1969). *Aequorea victoria* yeşil floresan proteini (wtGFP), 1992'de klonlanmasından sonra (Prasher et al., 1992) ve bir floresan etiketi olarak in vivo işaretlemedeki faydası ilk defa gösterildikten sonra (Chalfie et al., 1994) giderek ilgi toplamaya başlamıştır. Tamamen genetik olarak kodlanabilen bir işaret olarak GFP, canlı hücre ve organizmalardaki yapı ve prosesleri direk görüntüleme amacıyla kullanılan yegane araç olmuştur (Giepmans et al., 2006; Chudakov et al., 2005). Sonrasında, GFP-benzeri floresan proteinlerin yapı, biyokimya ve biyofiziksel özelliklerine olan ilgi artmaya başlamıştır (Chudakov et al., 2010).

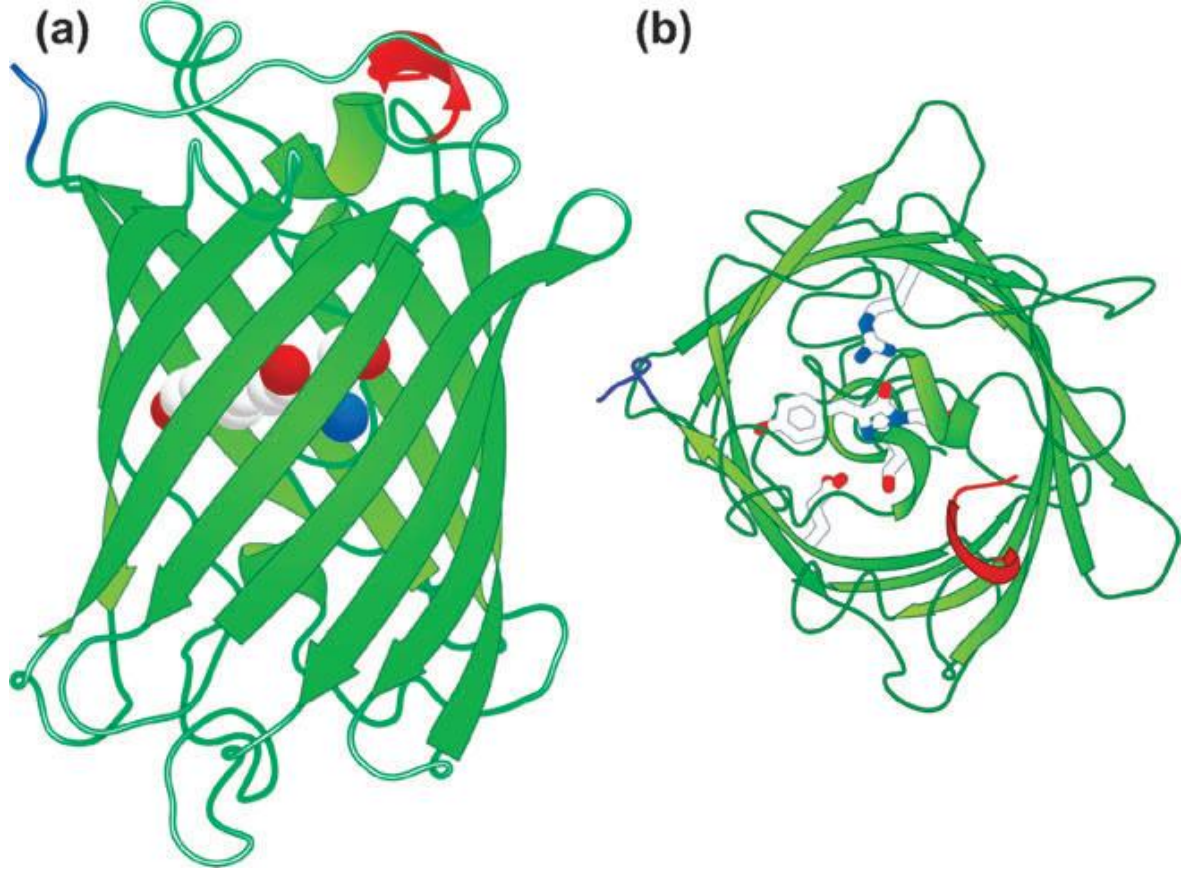
### **2.6.1.1. Yeşil Floresan Proteinin Yapısal Özellikleri**

Yeşil floresan protein ailesi, internal aminoasitlerinden türeyen kromoforları içeren deniz organizmalarının homolog proteinlerinden oluşmuştur. Çoğu GFP-benzeri protein, genetik olarak kodlanabilen optik özellikleri ve protein kabuğu içerisinde otokatalitik reaksiyonlarla post-translasyonel olarak oluşan kromofor merkezi ile parlak floresan ışımaya göstermektedir (Pakhomov et al., 2008).

wtGFP ve varyantlarının pekçok yapısal özelliği X-ışını kristallografisi çalışmaları ile tanımlanmıştır (Shaner et al., 2007). Yeşil floresan protein ailesinin floresan proteinleri ve kromoproteinleri ~220-240 amino asitten oluşmaktadır (25kDa). *Aequorea victoria* yeşil floresan proteini (wtGFP) 238 amino asit içermektedir (Prasher, 1992). Floresan protein üyeleri genel bir 3 boyutlu yapıyı paylaşmaktadır. Yeşil floresan proteinin kristal yapısı (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996) 11-zincirli- $\beta$ -fiçisi ve bu yapı içinde silindir eksenini boyunca bükülmüş olarak bulunan bir alfa-heliksten oluşmaktadır. Beta-fiçisi yapısı 42 Å ile 24 Å boyutlarında neredeyse kusursuz bir silindir oluşturmaktadır (Craggs, 2009). Merkezi, koaksiyel alfa-heliks yapısı buraya gömülü halde bulunan kromofor öncülü kromojenik X-Tyr-Gly (wtGFP'de, Ser65-Tyr66-Gly67) tripeptidini içermektedir (Remington, 2006). Kromoforu oluşturan 65. pozisyondaki ilk amino asitin yan zinciri çeşitlilik gösterebilirken, Tyr66 ve Gly67 tüm doğal GFP-benzeri proteinler arasında korunmuştur (Chudakov et al., 2010). Yeşil floresan proteinin tersiyer yapısı Şekil 2.11.'de ve kromoforunun yapısı Şekil 2.12.'de gösterilmiştir.

Bugüne kadar bulunan doğal olarak oluşan ikiyüzden fazla floresan protein sekansı içinde sadece dört aminoasit tamamen korunmuştur (Stepanenko et al.,

2008). Bu dört aminoasit Arg96, Glu222 ve kromojenik tripeptidde bulunan Tyr66 ve Gly67 olarak belirtilmektedir. Gly67 kromojenik tripeptid içinde kromofor oluşumu için gerekli tek aminoasittir ve omurga siklizasyon işlemini başlatan nükleofil olarak düşünülmektedir. Arg96 ve Glu222'in de elektrostatik ve baz katalizörler olarak kromofor oluşumunu katalitik olarak desteklediği kabul edilmektedir (Malo et al., 2007).

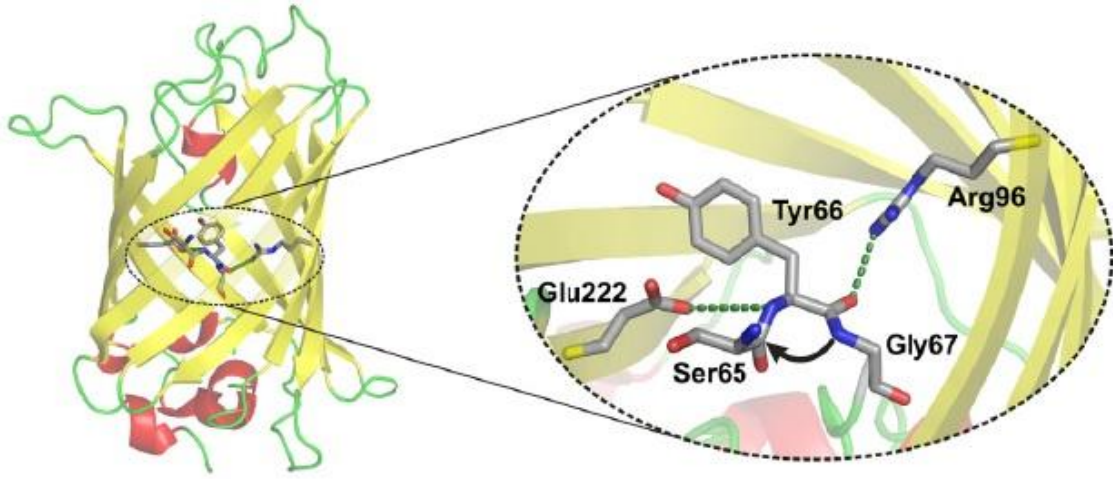


Şekil 2.11. Yeşil floresan protein'in (GFP) tersiyer yapısı. a)  $\beta$ -fıçısı ve merkezi kromofor yapısını oluşturan alfa heliks katlanmaları yandan ve b) üstten görülmektedir (Craggs, 2009).

Matürasyon olarak da adlandırılan GFP kromofor oluşumu detaylı olarak çalışmıştır (Wachter, 2007; Craggs, 2009). wtGFP amino asit sekansı Şekil 2.13.'de verilmiştir. GFP sekansındaki 65, 66 ve 67'nci kalıntılar (wtGFP'de, Ser65-Tyr66-Gly67) floresan kromoforu olan 4-(p-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone'u (p-HBI) kendiliğinden oluşturmaktadır (Cody et al., 1993; Chalfie et al., 1994). Matürasyon sürecinde ilk olarak GFP hemen hemen doğal konformasyonunu oluşturacak şekilde katlanmaktadır. Daha sonra, Gly67 amid nitrojeninin Ser65 karbonil karbonuna nükleofilik atak yapmasıyla peptid



omurgasının siklizasyonu başlamaktadır. Birbirini takip eden oksidasyon ve dehidrasyon basamakları ile Tyr66 aminoasitinin yan zincirine konjuge olan imidazolinon halkası oluşmaktadır. O<sub>2</sub>, oksidasyon basamağında esansiyel bir faktördür (Iizuka et al., 2011). Yapılan kapsamlı çalışmalar (Heim et al., 1995; Cormack et al., 1996) Gly67'nin fonksiyonel florofofor için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu proses, bilinen hiçbir kofaktör veya enzimatik bileşene ihtiyaç göstermediği için otokatalitik olmasının yanında oldukça sıcaklık duyarlı bir süreçtir. Ürün olarak oluşan floresan olarak aktif total GFP miktarı 30C'den daha yüksek sıcaklıklarda azalma göstermektedir (Lim et al., 1995). GFP'in fonksiyonel formu bir kere oluştuğunda ise yüksek ısı-kararlı özellik göstermektedir.



Şekil 2.12. Yeşil floresan proteinin (GFP) yapısında bulunan kromofor (Pakhomov and Martynov, 2008).

### 2.6.1.2. Yeşil Floresan Proteinin Fotofiziksel Özellikleri

wtGFP, doğal ve anyonik kromoforları nedeniyle, 475 nm'de küçük bir pik vererek, 395 nm'de ışığı absorblamakta ve 508 nm'de yeşil ışık yaymaktadır (Şekil 2.14.) (Heim et al., 1994). 503 nm (475 nm'de uyarım) veya 508 nm (395 nm'de uyarım) olmak üzere her iki dalga boyunda uyarım yeşil floresan emisyonuna yol açmaktadır. Florofoforun baskın olarak 395 nm'de absorblayan formu yüksüz fenol türlerine ve daha küçük olan 475 nm formu fenolat anyonuna dayanmaktadır. Bu durumlar arasındaki eşitlik, kromoforun fenol hidroksilinden Glu222'nin karboksilat grubuna uyarılmış-durum proton transferi (ESPT) yapan internal hidrojen bağı ağı ile kontrol edilmektedir. Doğal form uyarıldığı zaman ESPT'ye girerek fenolat

anyonu oluşturmakta ve yeşil ışık yaymaktadır (Brejc et al., 1997; Palm et al., 1997).

### **2.6.1.3. Yeşil Floresan Proteinin Stabilitesi**

GFP, sıkı ve kompakt “ $\beta$ -fiçısı” yapısından dolayı ısı, pH, proteaz ve denatüranlara karşı olağanüstü bir stabiliteye sahiptir (Nagy et al., 2004; Penna et al., 2004). GFP'nin 8 M üre, 6 M guanidin hidroklorür ve 1% sodyum dodesil sülfat (SDS) ile denatürasyona dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Ward, 1998). Bunun yanında, GFP'nin floresan ışımalarının pH bağımlı olması diğer bir ilginç bulgu olarak işaret edilmektedir (Kneen et al., 1998).

Yapılan bir çalışmada GFP stabilitesinin ve çeşitli kaotropik ajanlar ve ısı ile denatürasyonunun yüksek ölçüde pH bağımlı olduğu gösterilmiştir. 6,5 civarındaki pH değerlerinde GFP'nin denatürasyona oldukça hassas olduğu, renatürasyona uğrayamadığı; 6,5 ile 7,5 arasındaki pH'larda ise muhtemelen yapısal bir değişim geçirdiği ve floresan özelliğini koruduğu gösterilmiştir (Alkaabi et al., 2005).

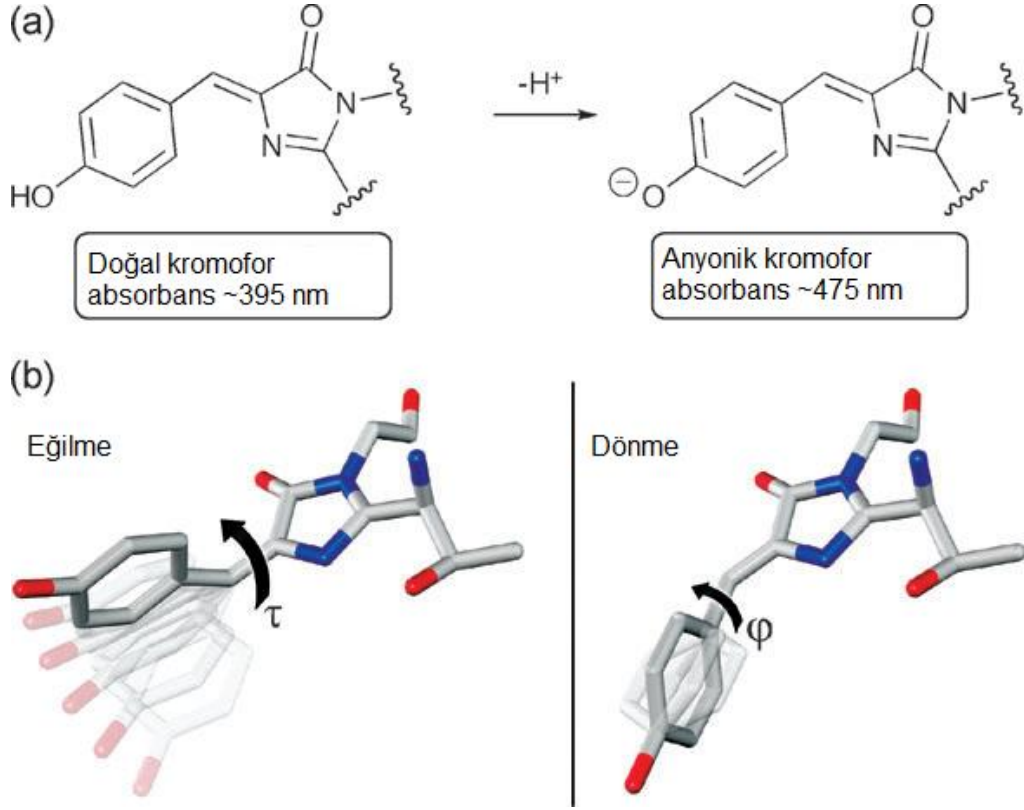
### **2.6.1.4. Yeşil Floresan Proteinin Genel Uygulama Alanları**

Moleküller, hücre içi organeller, canlı hücreler ve tüm organizmaların floresan olarak biyogörüntülenmesi, biyokimya, biyoteknoloji, hücre ve gelişim biyolojisi alanlarında yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Floresan işaretleyiciler uygulanarak yapılan biyolojik araştırmalarda, yeşil floresan proteinin klonlanması (Shimomura et al., 1962; Shimomura and Johnson, 1962), ve yeni GFP mutantlarının geliştirilmesiyle (Morin and Hastings, 1971; Chalfie et al., 1994) yeni bir çağ başlamıştır. GFP ve pek çok varyantı bugüne kadar, protein-protein etkileşiminin gösterilmesi, protein ve hücre izleme çalışmaları gibi hücre içi süreçleri aydınlatmak için genetik olarak kodlanabilen biyosensörler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Prasher et al., 1992).

Bu proteinlerin floresan özellikleri ortamın pH değerine, hücrenin redoks potansiyeline ve metal iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Bunun yanında, diğer floresan etiketleri üzerinde GFP ve benzeri proteinlerin en büyük avantajı moleküler oksijen dışında hiçbir aksesuar kofaktör, enzim veya yüzeye gerek duymaksızın (Prasher et al., 1992; (Craggs, 2009), canlı organizma, doku ve hücrelerde kromofor oluşumunun mümkün olmasıdır (Morin and Hastings, 1971).

ATG      AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT    60  
 Met      Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly  
 1 Val                    5                    10                    15                    20  
 (1a)  
 GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA 120  
 Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly  
                           25                    30                    35                    40  
 AAA CTT ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CCT GTT CCA TGG CCA ACA CTT 180  
 Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu  
                           45                    50                    55                    60  
 GTC ACT ACT TTC TCT TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCA GAT CAT ATG AAA CAG 240  
 Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln  
                           Leu Thr                    70                    75                    80  
                           65  
 CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGA ACT ATA TTT TTC 300  
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe  
                           85                    90                    95                    100  
 AAA GAT GAC GGG AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT 360  
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val  
                           105                    110                    115                    120  
 AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA 420  
 Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys  
                           125                    130                    135                    140  
 TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA 480  
 Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
                           145                    150                    155                    160  
 ATC AAA GTT AAC TTC AAA ATT AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC 540  
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp  
                           165                    170                    175                    180  
 CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC 600  
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr  
                           185                    190                    195                    200  
 CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT 660  
 Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu  
                           205                    210                    215                    220  
 CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTA TAC AAA TAA TAA 720  
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Stop  
                           225                    230 Leu                    235

Şekil 2.13. *Aequorea victoria* Yeşil Floresan Proteini (wtGFP) amino asit sekansı.

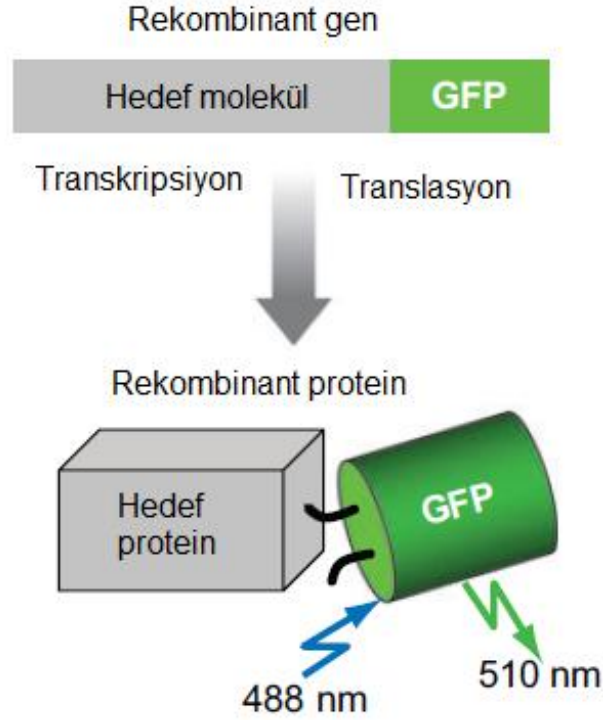


Şekil 2.14. Yeşil floresan protein kromoforunun geçirdiği protonasyon durumları (Craggs, 2009).

GFP'ye dayalı fotoişaretleme tekniklerinin hücresel olayların dinamiklerinin gerçek-zamanlı izlenmesinde kullanımını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (March et al., 2003).

GFP, belirli bir proteinin habercisi olması amacıyla protein füzyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.15). GFP, füzyon partnerlerinin stabilitesine katkıda bulunmakta ve proteinin lokalizasyonu ve miktarı ile ilgili kolayca bilgi vermektedir. GFP'nin füzyon proteini olarak kullanımı, hem laboratuvar ölçeğinde hem endüstriyel ölçekte biyoproseslerin kesin olarak takip edilebilebilmesini sağlamıştır. Literatürde bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda, biyoprosesdeki ürün oluşumu veya varlığı, GFP floresanı aracılığıyla gerçek-zamanlı veya doğrudan görüntülenmiştir. Promotor ile izleme diğer bir uygulama alanını oluşturmaktadır. Özgül bir promotor kontrolü altında, GFP ile, bir organizmadaki belirli hücre gruplarını, organlarını, dokularını veya hücre kültürlerini görüntülemek mümkün olmaktadır. Benzer olarak, GFP floresanı kullanılarak pH, sıcaklık, oksijen gibi parametreler izlenebilmektedir. Bu uygulamalarda GFP, bir stres koşulu veya çevresel değişikliklere cevap verecek bir promotor ile

ilişkilendirilmekte ve cevaben alınan floresan, stres düzeyini veya çevresel koşullardaki değişiklik sonucu ortamda bulunan toksik bileşik konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.



Şekil 2.15. Yeşil floresan protein (GFP) kullanılarak gerçekleştirilen protein füzyon çalışmalarının temel prensibi (Wang et al., 2008).

GFP'nin yaygın kullanım alanlarından bir diğeri, organizmaların bütün olarak görüntülenmesidir. Bu yaklaşım genellikle çevresel biyoteknoloji alanında kullanılmaktadır. Bu şekilde, çeşitli mikroorganizmaların, GFP taşıyan plazmidler aracılığıyla, büyümesi ve dağılımı incelenebilmektedir.

Özetle, günümüzde GFP ve varyantları; protein ve nükleik asitlerin işaretlenmesinde, protein hareketlerinin, etkileşimlerinin, aktivitelerinin, degradasyonlarının ve promotor aktivasyonunun izlenmesinde, sinyal molekül konsantrasyonu, membran potansiyel değişimleri gibi farklı hücresel parametrelerin, organizma ölçeğinde ise hücre, doku ve organların görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Chudakov et al., 2010).

### 3. MATERYAL ve METOT

Sunulan çalışmanın amacı, yeşil floresan proteine (GFP) karşı SELEX yöntemi ile aptamer üretilmesi ve bu aptamer moleküllerinin optik tanıma tabanlı biyosensör sistemlerine uygulanabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar yedi temel aşamada tamamlanmıştır.

Gerçekleştirilen bu aşamalar sırası ile aşağıda verilmiştir:

1. Model bir sistem olarak önerilecek hedef molekülün belirlenmesi.
2. Belirlenen hedef moleküle karşı in vitro seçim tekniği ile aptamer moleküllerinin seçilmesi için gerekli olan başlangıç RNA kütüphanesinin tasarımı.
3. In vitro seçim tekniği için gerekli parametrelerin belirlenmesi ve optimizasyonu
4. Başlangıç RNA kütüphanesinin in vitro ortamda oluşturulması
5. SELEX döngülerinin gerçekleştirilmesi, optimizasyonu ve tekrarlanması
6. Sonuç olarak elde edilen aptamer moleküllerinin DNA dizi analizi ile primer dizilerinin belirlenmesi
7. Dizisi belirlenen seçilmiş aptamer moleküllerinin altın yüzeye immobilize edilerek, hedef molekül ile aptamer molekülleri arasındaki etkileşimin optik bir sistem aracılığıyla gösterilmesi

Çalışmanın ilk basamağında optik biyosensör uygulamalarında model bir sistem olarak kullanılacak hedef molekül-aptamer kompleksi belirlenmiştir. Aptamer tabanlı biyosensör sistemlerinde kullanılan çok farklı tanıma stratejileri ve yaygın olarak kullanılan birkaç tane model aptamer sistemi bulunmaktadır. Biyosensör sistemlerinin analitik performanslarının geliştirilmesi amacıyla, model biyotaniyıcı moleküllerle gerçekleştirilen çalışmalarda, hassaslık, özgüllük, analiz zamanı ve maliyet göz önünde bulundurulması gereken parametreler olarak öne çıkmaktadır. Bu doğrultuda, uygulamada oldukça kolay ve hassas olan floresan tabanlı optik tanıma sistemlerinde uygulanabilmesi amacıyla hedef molekül olarak bir floresan

protein seçilmesine karar verilmiştir. Floresan protein olarak, literatürde bugüne kadar en çok çalışılmış ve özellikleri en iyi tanımlanmış Yeşil Floresan Protein (GFP) kullanılmıştır.

Daha sonra, GFP'ye karşı geliştirilecek aptamer moleküllerinin SELEX prosedürü ile seçilmesi için başlangıç RNA kütüphanesi tasarlanmıştır. Başlangıç RNA kütüphanesi tasarlanırken, daha önce GFP'ye karşı seçilmiş bir aptamer dizisinin işlevselliğinin artırılabilmesi amacıyla bölgesel olarak randomize edilmiş bir başlangıç kütüphanesi ve tamamen rastgele ikinci bir RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. SELEX prosedürünün her iki başlangıç kütüphanesiyle paralel olarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Çalışma süresince SELEX döngülerinin tekrar edilebilirliği açısından gerekli parametreler optimize edilmiştir. Bu aşamada oligonükleotid dizilerinin sentezlenmesi ve tekrar kullanımları için gerekli dönüşümleri geçirebilmesi amacıyla tasarlanan oligonükleotid dizileri ve komplementer primer dizilerinin optimal çalışma koşulları tespit edilmiştir. Diğer yandan in vitro seçim prosedürünün oldukça önemli seleksiyon basamağı için ise proteinleri biyotinlemek amacıyla kullanılan ticari bir kitin kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimizasyonlar yapıldıktan ve gerekli parametreler belirlendikten sonra, SELEX prosedürü gerçekleştirilmiş ve döngüler tekrar edilmiştir. Daha sonra SELEX sonucunda elde edilen zenginleştirilmiş aptamer moleküllerinin primer dizilerinin belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Hedef molekül ile aptamer molekülleri arasındaki etkileşimin gösterilmesi amacıyla, seçilen aptamer moleküllerinin altın yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada öncelikle avidin molekülleri altın yüzeye tiyol etkileşimi ile bağlanmıştır. Daha sonra biyotinlenmiş poli-(T) dizisi yüzeye immobilize edilmiştir. Ucuna poli-(A) dizileri eklenmiş seçilmiş aptamer molekülleri poli-(A)-poli-(T) etkileşimi ile yüzeye immobilize edilmiştir. Son olarak, modifiye edilmiş altın yüzeylerin hedef molekül (GFP) ile inkübasyonu sonucunda, aptamer ile hedef molekülün bağlanması floresan mikroskop ile test edilmiştir.

### 3.1. Materyal

#### 3.1.1. Teknik Ekipman

Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman

Ekipman	Marka/Model
Santrifüjler	Labnet, Spectrafuge 6C Labnet, Spectrafuge 24D Labnet, Microfuge C1200 Thermo, SL 16R
Dijital ısıtıcılı manyetik karıştırıcı	IKA, RCT Basic
DNA dizi analizi cihazı	ABI, 310
Otoklav	Hirayama, HVE-50
pH metre	Hanna, HI221
Hassas tartı	Denver, TP-3002 Denver, TP 214
Elektroforez sistemi	Thermo, Owl EasyCast B1A Mini Gel, 7 x 8 cm Thermo, Owl EasyCast B1 Mini Gel, 9 x 11 cm Thermo, EC 300XL
Jel görüntüleme ünitesi	Vilber Lourmat
Mikrodalga fırın	Arçelik, MD 551
Buz makinası	Braun, Multiquick 5
Su banyosu	Memmert, WNB 14
PCR cihazı	Techne, TC-3000X
Vortex	Labnet
Floresan mikroskop	Nikon, Eclipse E600 Nikon, DXM 1200
Kuru blok ısıtıcı	Labnet, Accublock
Spektrofotometre	Thermo, NanoDrop 2000
Orbital karıştırıcı	
Çeker ocak	
Buzdolapları	Samsung (+4°C), Bloomberg (-20°C), Thermo (-80°C)
Biyogüvenlik kabini (Sınıf IIA)	ESCO, AC2-4E1
Distile su cihazı	GFL, 2004
Şırınga filtre	
Mikropipet seti	Thermo, Finn timer 2µl, 5µl, 10µl, 20 µl, 100µl, 1000µl, 10ml
Tüpler	Neptune, 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml IsoLab, 15ml, 50ml
Enjektörler	
Serolojik pipetler	



### 3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal malzemeler ve enzimler, Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme	Marka
Boric Acid	Merck
Sodium acetate	
Glycerol	
Phenol	
Sodium hydroxide	
Chloroform	
Isopropanol	
Trizma base	Sigma
PBS pH, 7.4	
Hydrochloric acid (1N)	
Avidin agarose	
Acetic acid, glacial	
EDTA	AppliChem
Ethidium bromide	
Ethanol	
Agaroz	Prona
DEPC	IsoLab

### 3.1.3. Oligonükleotidler

Çalışma sürecinde başlangıç kütüphanesi olarak kullanılan rastgele DNA oligonükleotidler ve primer oligonükleotidleri tasarımı yapılarak yurtdışından temin edilmiştir (IDT, Amerika Birleşik Devletleri). Oligonükleotid dizilerinin tasarımı yapılırken, internet üzerinden kolaylıkla ulaşılabilen IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) kullanılarak, GC içerikleri ve dimer oluşumları kontrol edilmiştir. Başlangıç kalıp DNA oligonükleotid dizilerinin ve primer dizilerinin primer yapıları Çizelgede gösterilmiştir.

### 3.1.4. Proteinler

SELEX sürecinde hedef molekül olarak yeşil floresan protein (GFP) kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen aptamer dizilerinin altın yüzeye immobilizasyonu için tiyollenmiş avidin kullanılmıştır. Yeşil floresan protein (Millipore, Amerika Birleşik Devletleri) ve tiyollenmiş avidin (ProteinMods, Amerika Birleşik Devletleri) yurtdışından temin edilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan enzim ve reaktifler

Malzeme	Marka
Nuclease free water	
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, 5u/ul	
T7 RNA Polymerase, 20u/µl	
RiboLock RNase Inhibitor, 40u/µl	
DNase I, RNase free, 1u/µl	
RevertAid Premium Reverse Transkriptase, 200 u/ul	
RNase H, Ecoli, 5u/µl	
NTP set, 100mM	
dNTP set, 100mM	
GeneRuler 100 bp DNA ladder plus	
GeneRuler 50 bp DNA ladder	
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas
6X DNA Loading Dye	
EDTA, 0.5 M	
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	
2X RNA Loading Dye	
10X hot start PCR buffer	
5X RT buffer	
5X Transcription buffer	
10X reaction buffer for RNase H	
10X reaction buffer for DNase I	
10X Reacrion buffer without MnCl <sub>2</sub> for DNase I	
3M Sodium Acetate Solution , pH: 5,2	
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment 5000u/ml	New England Biolabs
NEB Buffer 2	
Nuclease free water	
RNase Zap	Ambion

### 3.1.5. Ticari Kitler

Çalışma süresince kullanılan ticari kitler Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışma kapsamında kullanılan ticari kitler

Kit	Marka
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit	Fermentas, K0441
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, K1621
RNA Clean & Concentrator™-25	Zymo, R1017
Zymoclean™ Gel RNA Recovery Kit	Zymo, R1011
UltraClean® GelSpin® DNA Extraction Kit	MoBio,12400
Biotinylation Kit, Cleavable	Sigma, BK200

### 3.1.6. Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler

Çalışma kapsamında çeşitli amaçlarla hazırlanan çözeltiler aşağıda özetlenmiştir.

#### NaOH çözeltisi (10N):

100 g NaOH 150 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

#### 0,5 M EDTA (pH:8):

146,125 g EDTA 800 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Çözeltinin pH'ı 10N NaOH ile ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

#### TBE tamponu (5X):

5X TBE tamponu agaroz jel elektroforezinde agaroz jeli hazırlarken ve elektroforez tamponu olarak kullanılmıştır. 5X TBE tamponu kullanılmadan önce distile su ile 1X konsantrasyona sulandırılmıştır. 5X TBE tamponunun hazırlanışı Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

#### Çizelge 3.5. 5X TBE tamponunun hazırlanması

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Tris baz	54g
Borik asit	27,5g
0,5M EDTA (pH:8)	20ml
Distile su	1L'ye tamamlanır.

Hazırlanan çözelti 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

#### 50mM Tris-HCl (pH:8):

6,1 g Tris baz, yaklaşık 800 ml distile su içinde çözüldükten sonra çözeltinin pH'ı 1N HCl ile 8'e getirilmiştir. Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

### 50mM Sodyum asetat (pH:4.5):

6,8 g sodyum asetat, 1,5 ml asetik asit yaklaşık 800 ml distile su içinde çözüldükten sonra çözeltinin pH'ı 10N NaOH ile 4.5'e getirilmiştir. Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

### 0,1% DEPC-su:

1 ml DEPC 1L distile su içinde oda sıcaklığında 1 saat karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek, 121°C'de 45 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. RNA Kütüphanesi Tasarımı**

Oligonükleotid moleküllerinin sentezlenmesi işlemi rölatif olarak ucuz ve kolay otomatize bir prosestir. Bunun yanında, sentezlenen rastgele oligonükleotidlerin aptamer molekülleri olarak fonksiyon gösterebilmesi için; (1) oluşturulacak kütüphanenin karmaşıklığı ve (2) sabit bölgelerin primer tasarımı göz önünde bulundurulması gereken iki önemli faktördür.

Üretim sürecinin tamamen rastgele olduğu kabul edilerek, oluşturulacak kütüphanenin karmaşıklığı kolaylıkla hesaplanabilmektedir. X nükleotid uzunluğunda, y farklı nükleotid tarafından oluşturulan rastgele kütüphanenin karmaşıklığı,  $y^x$  ile ifade edilmektedir. X = 35 ve y = 4 olduğu durumda "sekans boşluğu" olarak da ifade edilen maksimum çeşitlilik yaklaşık  $10^{21}$ 'dir. Fakat, böyle bir kütüphanenin sekans boşluğu olarak bilinen teorik çeşitliliği, büyüklük olarak genellikle uygulamada ele alınabilir moleküllerinin sayısını oldukça aşmaktadır. Elde edilebilirlik ve maliyet açısından başlangıç kütüphanesinde oluşabilecek maksimum çeşitlilik  $10^{13}$ -  $10^{15}$  arasında olabilmektedir (James, 2000).

Aptamer moleküllerinin merkezini rastgele oligonükleotid dizileri oluşturmaktadır. Ancak bu rastgele dizilerin 5' ve 3' uçlarında, her biri SELEX prosedürü için esas olan Klenow uzaması, cDNA sentezi, PCR amplifikasyonu ve T7 RNA polimeraz transkripsiyonu basamakları için primer bağlanma bölgelerini içeren sabit dizilerin bulunması gerekmektedir.

Bu sabit dizilerin seçimi, SELEX prosesinin optimal düzeyde çalışmasını doğrudan etkilediği için oldukça önemlidir. 3' ucu sabit dizisi, ters-transkriptaz enziminin primer bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır. 5' ucu sabit dizisi ise, seçilen dizilerin amplifikasyonunu sağlayan PCR için primer bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır.

Primer bağlanma bölgeleri olan bu sabit diziler, T7 RNA polimeraz transkripsiyonunu optimize edecek, primer/dimerlerini ve PCR amplifikasyonu sırasında kendinden eşleşmeyi elimine edecek, ve aptamer molekülünün halkasal konformasyona girmesine neden olacak iki sabit dizi arasında baz eşleşmesini en aza indirecek şekilde tasarlanmalıdır. Sabit bölgelerin SELEX prosedürü için tasarlanması normal bir PCR için tasarlanmasına göre, ürünler ardarda pek çok seleksiyon ve amplifikasyon döngüsü geçireceği, yani, eser seviyelerde bulunan herhangi bir artefakt sonuçta elde edilecek saf aptamer popülasyonu içinde çoğalacağı için çok daha önemlidir.

Çalışma kapsamında kullanılan oligonükleotid kütüphaneleri tasarlanırken ilk olarak rastgele bölgelerin tasarımı üzerine çalışılmıştır. Bunun için yapılan literatür araştırması sonucu daha önceden tanımlanmış (Mallik et al., 2010) olan GFP aptamer dizisi baz alınmıştır. Tanımlanan diziden köken alan fonksiyonel olarak daha verimli ikinci bir dizinin tanımlanabilmesi amacıyla, önceden tanımlanan aptamer dizisinin olası sekonder yapıları M-Fold programıyla (Zuker, 2003) (<http://mfold.rna.albany.edu>) incelenerek belirlenmiş ve GFP'ye bağlanmada aktif olmayan stem bölgeleri arasına rastgele diziler yerleştirilerek, kısmi olarak randomize edilmiş yeni bir oligonükleotid kütüphanesi oluşturulmuştur. Bunun yanında, daha önceden tanımlanmış diziyi karşılaştırılmak üzere tamamen rastgele ikinci bir oligonükleotid kütüphanesi oluşturulmuştur. Rastgele bölgelerin uçlarında bulunan sabit primer bağlanma dizileri ise yukarıda anlatılan gereksinimler göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır. Bunun için kütüphanelerin 5' sabit ucunda T7 RNA polimeraz enziminin evrensel promotor dizisi (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') ve PCR için ileri primer dizisi; 3' ucunda ise PCR için geri primer dizisinin bağlanacağı bölgeler oluşturulmuştur. Oluşturulan sabit bölgelerin komplementer primer dizileri ve ters-transkripsiyon reaksiyonundan sonra T7 promotorunun tekrar diziye katılabilmesi için ikinci bir 5' primer dizisi sentezlenmiştir.

Tasarımı tamamlanan başlangıç kütüphanesini oluşturacak tek zincirli DNA dizileri, oligonükleotid primer dizileri ve yüzey immobilizasyonu aşamasında kullanılacak biyotinlenmiş poli-A dizisi yurt dışından temin edilmiştir (IDT, Amerika Birleşik Devletleri). Liyofilize olarak temin edilen tüm oligonükleotid dizileri son konsantrasyonu 100 pmol/μl olacak şekilde nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan oligonükleotid çözeltileri belirli hacimlere bölünerek -80 °C'de saklanmıştır. Sentezlenen oligonükleotid dizileri ve özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışma kapsamında kullanılan oligonükleotid dizileri ve özellikleri

Oligonükleotid	Primer dizi	Uzunluk (baz)	T <sub>M</sub> (°C)
<b>RNA kütüphanesi_1</b>	5'-GGACCGAGTCCAGAA-N <sub>21</sub> - GCCCATTC-N <sub>21</sub> - TTCTGTGGTGGCCCTCTTTTAAGGACTT TCCCCACCCAATTCGCCACGCCATCGT GCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC ATTTC -3'	153	71,5
<b>RNA kütüphanesi_2</b>	5'-N <sub>135</sub> - CCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCATTT C-3'	165	71
<b>T7 promotor primeri</b>	5'- GAAATGAAATTAATACGACTCACT ATA -3'	27	49,5
<b>Geri Primer</b>	5'- GGA CCG AGT CCA GAA -3'	15	50
<b>İleri primer</b>	5'- GAA ATG AAA TTA ATA CGA CTC ACT -3'	24	49,3
<b>RT-primeri</b>	5'- GAAATGAAATTAATACGACTCACT ATAGGGAGCACGATGG -3'	40	49
<b>Poli-(T) (3' biyotinlenmiş)</b>	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	20	

### 3.2.2. SELEX Deneyleri

SELEX prosedürünü RNA kütüphanesinin oluşturulması, hedef molekül ile inkübasyon, seleksiyon, seperasyon basamaklarının tekrarlanması ve sonuç olarak seçilen aptamerlerin dizilerinin tanımlanması oluşturmaktadır. Bu aşamalarda kullanılan metotlar ve protokoller aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

#### 3.2.2.1. Çift Zincirli Promotor Bölge Oluşturulması

Başlangıç RNA kütüphanesinin oluşturulabilmesi için öncelikle tek zincirli DNA molekülleri olarak sentezlenmiş diziler üzerinde T7 RNA polimeraz enziminin

aktivite gösterebilmesi amacıyla çift zincirli promotor bölgeler oluşturulmuştur. Bunun için, 5' ucunda T7 promotor dizisini içeren tek zincirli DNA molekülleri ile promotor bölgenin komplementer DNA dizisi hibridize edilmiştir. Gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Çizelge 3.7.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. Çift zincirli promotor bölge oluşturulurken kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Kalıp ssDNA (100pmol/μl)	2,5 μl
Komplementer promotor primeri (100 pmol/μl)	2,5 μl
Transkripsiyon tamponu (5X)	10 μl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	22,25 μl

Çizelge 3.8. Çift zincirli promotor bölge oluşturulurken kullanılan reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre
94 °C	5 dakika
50 °C	5 dakika
Oda sıcaklığı	min. 3 dakika

### 3.2.2.2. In vitro Transkripsiyon

RNA polimeraz aracılığıyla in vitro transkripsiyon biyofiziksel, biyokimyasal ve moleküler biyoloji deneyleri için RNA üretmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Pleiss et al., 1998). RNA, bakteriyofaj sistemlerinin birleşenleri kullanılarak in vitro transkripsiyon ile kolayca sentezlenebilmektedir (Beckert and Masquida, 2011). Sıklıkla kullanılan sistemlerden biri de T7 bakteriyofaj sistemidir. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz, promotor dizisine oldukça kuvvetli bir özgüllük gösteren ve transkripsiyonun başlama, uzama ve sonlanma basamaklarını promotor-sepesifik olarak ve herhangi bir aktivatör proteinin yardımına ihtiyaç duymaksızın gerçekleştirebilen bir enzimdir (Guerniou et al., 2005; Pal et al., 2012). T7 RNA polimeraz RNA molekülünün 5' ucundan 3' ucuna doğru sentezini gerçekleştiren DNA-bağımlı bir RNA polimerazdır. In vitro transkripsiyon için kalıp molekül; PCR'da kullanılan 5' oligonükleotidin bir parçası olarak T7 promotoru içeren bir PCR ürünü veya transkribe edilecek kalıp dizinin yanında T7 promotor dizisini ve promotor komplementerini içeren tek zincirli bir oligonükleotid olabilmektedir (Beckert and Masquida, 2011).

Çalışma süresince tek zincirli DNA molekülleri ve PCR ürünü olan çift zincirli DNA moleküllerinin komplementer RNA dizilerinin sentezlenmesi amacıyla T7 RNA polimeraz aracılığıyla in vitro transkripsiyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9. In vitro transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Çift zincirli promotor bölge içeren kalıp ssDNA (100pmol/μl) / PCR ürünü	5 μl
Transkripsiyon tamponu (5X)	10 μl
NTP karışımı (10mM)	10 μl
RiboLock RNaz inhibitörü (40u/μl)	1,25 μl
T7 RNA polimeraz (20u/μl)	1,5 μl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	22,25 μl
Toplam reaksiyon	50 μl

Reaksiyon karışımı 37 °C'de 4 saat inkübe edilerek in vitro transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. In vitro transkripsiyon ürünleri, bir sonraki seleksiyon basamağında yalnız pozitif sonuçlar alınmasını engellemek amacıyla reaksiyon karışımında bulunan kalıp DNA moleküllerinin ortamdaki uzaklaştırılması için DNaz ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.10.). Daha sonra RNA Clean & Concentrator™-25 ile pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonunda hemen kullanılmayacak reaksiyon tüpleri -80°C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 3.10. DNaz uygulaması reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
In vitro transkripsiyon ürünü	50 μl
DNase I, RNase free (1u/μl)	2 μl
EDTA (0,5mM)	2 μl
Toplam reaksiyon	54 μl

Çizelge 3.11. DNaz uygulaması reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre
37 °C	15 dakika
65 °C	10 dakika

### 3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Polymerase Chain Reaction”, PCR)

PCR, doğal DNA sentezi ve replikasyon proseslerinin temel elemanlarını kullanarak spesifik bir DNA fragmentinin in vitro olarak kopyalanmasıdır. Basit olarak, çift zincirli DNA molekülünün her bir zinciri komplementer zincirin



üretilebilmesi için kalıp olarak görev yapmaktadır. Bu kopyalama çok iyi bilinen Watson-Crick kurallarına göre gerçekleşen baz eşleşmesine dayanmaktadır. DNA polimeraz ile DNA sentezi için “primer” olarak adlandırılan yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda sentetik olarak üretilen komplementer DNA dizileri, dNTP molekülleri, enzimin aktivite göstereceği tampon ve  $MgCl_2$  gerekmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, bir döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olmak üzere üç basamaktan oluşan, her basamak için farklı sıcaklıkların kullanılmasına dayanan bir procestir. Denatürasyon basamağında DNA sarmalındaki baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları 94 - 95°C'ye ısıtılarak kırılmaktadır. Kalıp DNA molekülü denatürasyonunu takiben ileri ve geri olmak üzere iki adet dizi spesifik primer kalıp DNA zincirindeki komplementer dizilerine bağlanmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklığı ( $T_M$ ) diziye özgül bir parametre olmakla birlikte reaksiyonun yüksek özgüllüğünü sağlamaktadır. Daha sonra DNA Polimeraz, optimal aktivite gösterdiği 72°C'de, her iki primerin de 3'-OH gruplarına normal baz eşleşmesi kurallarına göre deoksinükleotidleri ekleyerek yeni çift zincirli DNA moleküllerini oluşturmaktadır. Ardarda tekrarlanan PCR döngüleri ile bir döngü sonunda sentezlenen ürünün bir sonraki döngüde kalıp olarak görev yapması sonucunda DNA parçalarının miktarı üssel olarak artmaktadır.

### **3.2.2.3.1. Hot-Start PCR**

PCR performansını ve ürün miktarını artırmak için sıklıkla kullanılan bir yaklaşımdır. Oda sıcaklığında veya daha altındaki sıcaklıklarda hazırlanan PCR reaksiyonları, PCR cihazına konulana kadar ve PCR cihazında sıcaklık 65-70°C'ye çıkana kadar geçen sürede, spesifik olmayan primer/kalıp zincir ve primer/primer bağlanmaları olabilmekte ve bu ürünler DNA polimeraz için substrat olabilmektedir. Bu şekilde oluşan ürünler daha sonraki amplifikasyon basamaklarında kalıp olarak kullanıldığında spesifik olmayan ürünler ve/veya primer/dimer çiftleri oluşabilmektedir. Ancak, eğer polimerizasyon başlamadan önce reaksiyon 65- 70°C ısıtılırsa, primer bağlanmasının kesinliği artacak ve istenmeyen PCR ürünlerinin sentezi engellenecektir.

“Hot-start”, PCR döngüsünün başlangıç denatürasyon basamağına kadar DNA polimeraz enziminin inaktivasyonunu tanımlayan bir terimdir. Manuel olarak geliştirilen Hot-start prosedürler, oda sıcaklığında veya buz üzerinde hazırlık

aşaması gerçekleştirilirken reaksiyon 65- 70°C'ye çıkana kadar kritik bir birleşenin reaksiyon karışımına ilave edilmemesine dayanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen çeşitli ticari ürünlerin çalışma prensibinde ise DNA polimeraz inaktivasyonu için, kimyasal modifikasyon, fiziksel modifikasyon, antikör veya aptamer bağlama gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Çalışma kapsamında kullanılan Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase enziminin aminoasit rezidülerine ısıya duyarlı bloke edici gruplar eklenerek kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Enzimin aktivasyonu 4 dakika 95°C'de inkübasyon ile gerçekleşmektedir.

### **3.2.2.3.2. Touchdown PCR**

Polimeraz zincir reaksiyonunda optimal primer bağlanma derecesi gerekmektedir. Normalde bu parametre primer/kalıp zincirin  $T_M$  derecesine bağlıdır. Ancak  $T_M$  değeri tampon birleşenleri, primer ve kalıp zincir konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği için hesaplanan değer tahmini bir değer olmaktadır. Bu sebeple genellikle doğru primer bağlanma derecesini saptamak zordur.

Touchdown (TD) PCR, özgülüğü, hassaslığı ve ürünü artırmaya yarayan basit ve hızlı bir PCR optimizasyon yöntemidir. Bu yöntemle uzun süren optimizasyon basamakları ve primer dizaynının tekrarı elimine edilmektedir. TD-PCR, primer bağlanma derecesi başlangıçta primerlerin  $T_M$  değerinden daha yüksek bir sıcaklıkta başlamakta ve her döngüde bağlanma derecesi kademeli olarak en sonunda  $T_M$  derecesinin altında bir değere kadar azaltılmaktadır. Böylece herhangi bir spesifik olmayan bağlanma olayı gerçekleşmeden önce komplementer diziyeye sadece spesifik primer bağlanmasının gerçekleşmesi sağlanmaktadır. İlk döngülerde oluşan ürünler spesifik ürünler olmakta ve daha sonraki döngülerde kalıp görevi görececek doğru dizilerin birikimi sağlanmaktadır.

Çalışma süresince istenilen DNA fragmanlarını çoğaltmak ve optimizasyonunu sağlamak amacıyla Hot-start TD-PCR gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen PCR reaksiyon ve program koşulları uygulanmıştır.



Şekil 3.1. PCR cihazı

Çizelge 3.12. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen HotStart TD PCR reaksiyon birleşenleri

Bileşen	Miktar
Kalıp DNA (100pmol/µl)	2,5 µl
Reaksiyon tamponu (10X)	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	12 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
İleri primer (100pmol/µl)	1,2 µl
Geri Primer (100pmol/µl)	1,2 µl
Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,6 µl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	70,5 µl
<b>Toplam reaksiyon</b>	<b>100 µl</b>

Çizelge 3.13. HotStart TD PCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	4 dk	
Denatürasyon	95 °C	45 sn	} X16 siklus
Primer bağlanması	55- 45 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	
Denatürasyon	95 °C	45 sn	} X24 siklus
Primer bağlanması	45 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	
Final uzaması	72 °C	5 dk	

#### 3.2.2.4. Seleksiyon

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen SELEX döngülerinin seleksiyon basamaklarında, hedef moleküle bağlanan RNA aptamer moleküllerinin bağlanmayan aptamer moleküllerinden ayrılması ve geri kazanılması amacıyla pek çok molekülün tanı ve izolasyonu amacıyla sıklıkla kullanılan avidin/biyotin etkileşimini temel alan ticari bir kit kullanılmıştır (Sigma-Aldrich's Cleavable Biotinylation Kit). Seleksiyon basamakları üç temel aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Hedef molekülün (GFP) biyotininasyonu
2. Avidin agaroz kolon ile aptamer moleküllerinin seleksiyonu
3. Kolon materyaline bağlanan hedef molekülün (GFP) geri kazanılması

#### Hedef molekülün (GFP) biyotininasyon protokolü:

1. Fosfat tampon (PBS) içinde çözülmüş olarak temin edilen, 1mg/ml konsantrasyonunda hedef protein molekülü kullanılmıştır.
2. Biyotininasyon reaktifi (Biotin disulfide N-Hydroxysuccinimide ester) 1 mg/ml olacak şekilde 6 µl DMF (N,N'-Dimethylformamide) içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu çözelti 4°C'de 24 saat kararlı olduğundan, kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan biyotininasyon çözeltisi 100 µg protein çözeltisinin içine yavaşça eklenmiş ve pipetlenerek karıştırılmıştır.
4. 1 saat oda sıcaklığında, orbital karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra biyotininasyon işlemi tamamlanmıştır.
5. Sephadex-G25 kolonu 3 kolon hacmi (30ml) 1X DEPC-PBS (pH: 7,4) ile dengeye getirilmiştir.
6. Biyotininasyon işlemi bittikten sonra, biyotininasyon karşımı Sephadex-G25 kolonuna alınmıştır.
7. Kolon 5000xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra biyotinlenen GFP molekülleri biyotininasyon reaktifinden arındırılmıştır.

8. Kolona 1 ml 1X DEPC-PBS (pH: 7,4) ilave edilmiştir. 5000xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra biyotinlenen GFP molekülleri DEPC-PBS içinde toplanmıştır.

Seleksiyon protokolü:

1. 1ml afinite matriksi (avidin agaroz) santrifüj kolonunun (5 ml toplam hacim, 2 ml matriks yatağı) içine alınmıştır.
2. Matriks 3ml DEPC-PBS (pH:7,4) çözeltisi ile yıkanarak dengeye getirilmiştir.
3. Biyotinlenmiş protein karışımı kolona alınmış ve 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edilmiştir.
4. Kolon 5000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Matriks 3 kez 3ml 1X DEPC-PBS (pH:7,4) çözeltisi ile yıkanmıştır.
6. Farklı tüplerde paralel olarak gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon ürünü olan RNA kütüphaneleri kendi aralarında birleştirilerek, RNA pürifikasyon kiti ile pürifiye edilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen su içerisinde toplanmıştır. Böylece RNA kütüphanesinin yoğunluğu artırılmış ve transkripsiyon reaksiyon bileşenlerinden arındırılmış olmaktadır. Pürifikasyondan sonra elde edilen RNA kütüphanesi 1X DEPC-PBS (pH:7,4) çözeltisi ile 10 kat sulandırılmıştır.
7. Oluşturulan RNA kütüphanesi kolona alındıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
8. Kolon 5000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek, hedef moleküle (GFP) bağlanmayan RNA molekülleri bağlananlardan ayrılmıştır.
9. Matriks 3 kez 3ml 1X DEPC-PBS (pH:7,4) çözeltisi ile yıkanmıştır.
10. Hedef moleküle (GFP) bağlanan RNA moleküllerini toplamak için kolona 1 ml toplama çözeltisi (8 M üre, 5 mM EDTA) ilave edilmiştir.
11. Kolon 5000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek, hedef moleküle (GFP) bağlanan RNA molekülleri toplanmıştır.

12. Toplanan, hedef molekül ile bağlanan aptamer molekülleri Sephadex G-25 kolonu kullanılarak toplama tamponundan arındırılmış ve 2 ml nükleaz içermeyen su içerisinde tekrar çözülmüştür.

13. Toplanan RNA moleküllerinin yoğunluğunu artırmak amacıyla, fenol/klorofom yöntemi ile pürifikasyon yapılmıştır. Elde edilen RNA molekülleri bir sonraki SELEX döngüsünde kullanılmak üzere RT-PCR ile DNA komplementlerine çevrilip çoğaltılmıştır.

#### Sephadex G-25 kolonunun rejenere edilmesi:

1. Kolon, 3 kolon hacmi kadar (30 ml) 0,5M NaCl ile yıkanmıştır.
2. Daha sonra 3 kolon hacmi (30ml) 1X DEPC-PBS (pH: 7,4) ile dengeye getirilmiştir.

#### Biyotinlenmiş hedef molekülün geri toplanması:

1. Avidin agaroz matriksine bağlı kalan biyotinlenmiş protein molekülleri 3ml 50mM DTT içeren PBS ile 1 saat karıştırılarak inkübe edilmiştir.
2. Kolon 5000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
3. 3ml 50mM DTT içeren PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 5000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Bu işlem sonucunda biyotinyasyon ajanının içerdiği disülfid bağları kırılmış ve serbest sülfidril grupları içeren protein molekülleri tekrar kazanılmıştır.
5. Geri kazanılan protein molekülleri Sephadex G-25 kolonu ile DTT'den arındırılmış ve PBS içerisinde tekrar toplanmıştır.

#### **3.2.2.5. Ters-Transkripsiyon (Reverse Transcription)**

Ters-transkripsiyon, RNA- bağımlı bir DNA polimeraz olan ters-transkriptaz enzimi aracılığıyla kalıp olarak RNA molekülü kullanılarak komplementer DNA (cDNA) dizisinin sentezlemesidir. Sentezlenen cDNA daha sonra PCR ile çoğaltılabilmekte veya cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılabilir. Herhangi bir RNA molekülü ile, RNA molekülüne hibridize olmuş tek zincirli DNA primerinin

varlığında ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. DNA primerinin hibridizasyonundan sonra ters-transkriptaz (RT) enzimi primerin 3' ucundan kalıp RNA molekülünü kullanarak komplementer diziyi sentezlemektedir. Ters-transkripsiyonda kullanılan kalıp RNA dizisine bağlı olarak oligo-T primer, rastgele primer (random primer) veya dizi spesifik primer olmak üzere üç farklı DNA primeri kullanılabilir.

Doğal ters-transkriptazlar, DNA polimeraz aktivitelerinin yanında bazılarında endojen olarak RNaz H aktivitesi de gösterebilen çok fonksiyonlu enzimlerdir. Endojen RNaz H aktivitesi ise RNA/DNA hibridini oluşturan RNA molekülünün degradasyonuna neden olmaktadır. cDNA sentezi sırasında RNA molekülünün degrade olması ürün miktarını ve sentezlenen cDNA molekülünün uzamasını engellerken, cDNA sentezinden sonra PCR yapılacaksa orjinal RNA molekülünün ortamda olması kısıtlayıcı bir faktördür.

Çalışma kapsamında herhangi bir aşamada in vitro transkripsiyon ile elde edilen RNA moleküllerinin komplementer DNA moleküllerinin sentezlenmesi amacıyla ters-transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen reaksiyon ve program koşulları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.14. Ters transkripsiyon basamağında kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Kalıp RNA	1 µl (~1 µg)
Reaksiyon tamponu (5X)	4 µl
Geri primer (100 pmol/µl)	1 µl
RiboLock RNaz inhibitörü (40u/µl)	1 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
RevertAid Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	10 µl
Toplam reaksiyon	20 µl

Çizelge 3.15. Ters transkripsiyon basamağında gerçekleştirilen reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon (Primer+kalıp+ dH <sub>2</sub> O)	65 °C	5 dk
	Buz üzerinde	min. 3 dk
Sentezleme	42 °C	60 dk
Sonlanma	70 °C	10 dk

Reaksiyon sonrasında oluşan ürünler ile tercihen hemen PCR gerçekleştirilmiştir. Hemen kullanılmayacak örnekler -80°C'de saklanmıştır.

Ters transkripsiyon reaksiyonundan sonra gerçekleştirilen PCR koşulları yukarıda anlatılmıştır. Ancak bu aşamada elde edilen cDNA dizileri öncelikle RNaz H ile muamele edilmiştir. 1u RNaz H reaksiyon karışımına eklendikten sonra 15°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 0,1 M EDTA (pH:8) ilavesiyle sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımında bulunan RNA molekülleri ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra cDNA dizileri RT-primeri ile hibridize edilerek dizi uzaması yapılmış, daha sonra ileri ve geri primerler ile PCR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.16. RNaz H uygulaması reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Ters transkripsiyon ürünü	20 µl
RNase H (5u/µl)	0,2 µl
EDTA (0,5 M, pH:8)	5 µl
Toplam reaksiyon	25 µl

Çizelge 3.17. RT-PCR öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
Ters transkripsiyon ürünü	20 µl
Reaksiyon tamponu (10X)	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	12 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
RT-primer (100pmol/µl)	1,2 µl
Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,6 µl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	51,8 µl
Toplam reaksiyon	97,6 µl

Çizelge 3.18. RT-PCR öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon+enzim aktivasyonu	95 °C	4 dk
Primer bağlanması	50 °C	45 sn
Uzama	72 °C	5 dk

Primer uzaması reaksiyonundan sonra reaksiyon karışımının içerisine ileri ve geri primerler, her birinin son konsantrasyonu 1,2 pmol olacak şekilde eklenerek yukarıda anlatılmış olan HS TD-PCR protokolü (Çizelge 3.13.) gerçekleştirilmiştir.



### 3.2.2.6. Nükleik Asit Moleküllerinin Analizi

#### 3.2.2.6.1. Spektral Yöntem

Nükleik asit moleküllerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop 2000 ile spektrofotometrik olarak tanımlanmıştır. DNA ve RNA moleküllerinin saflığını belirlemek amacıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon oranına ( $A_{260}/A_{280}$ ) ve 260 nm ve 230 nm dalga boylarındaki absorpsiyon oranına ( $A_{260}/A_{230}$ ) bakılmıştır.  $A_{260}/A_{280}$  absorpsiyon oranı, saf bir DNA çözeltisinde yaklaşık 1,8 iken saf bir RNA çözeltisinde yaklaşık değeri 2,0 olmalıdır. Protein kontaminasyonu varlığında bu oranın düşmesi beklenmektedir.  $A_{260}/A_{230}$  absorpsiyon oranı ise saflıkla ilgili ikincil bir ölçümdür. Bu oran, saf bir nükleik asit çözeltisinde respektif olarak  $A_{260}/A_{280}$  oranından daha yüksek olmakla birlikte 2,0 ile 2,2 arasında olması beklenmektedir.

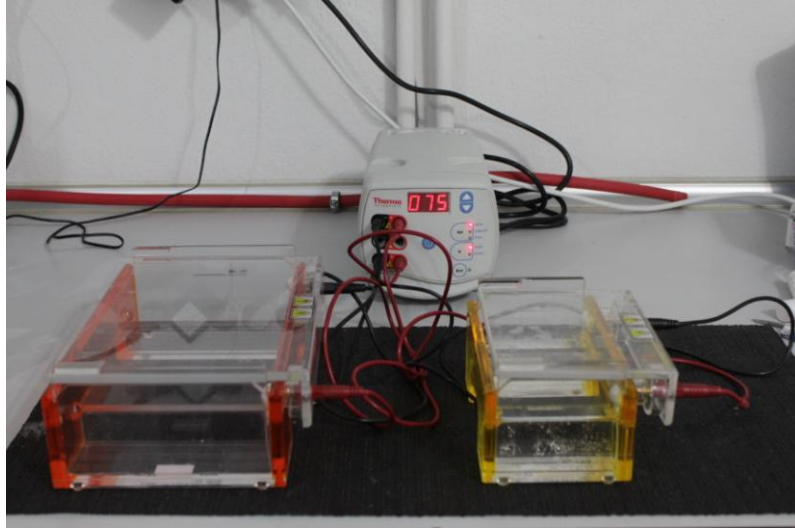


Şekil 3.2. Spektrofotometrik ölçümler için kullanılan NanoDrop 2000 cihazı.

#### 3.2.2.6.2. Agaroz Jel Elektforezi

Elektforez, bir karışımda çözülmüş halde bulunan moleküllerin bir elektrik alanın etkisiyle destek materyali üzerinde hareket etmeleri prensibiyle bu molekülleri ayırmaya yarayan bir tekniktir. Moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, destek materyalinin konsantrasyonuna ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır. Elektforez sistemini katı bir destek, elektriği iletmeye yarayan bir tampon çözelti ve güç kaynağı oluşturmaktadır. Nükleik asit moleküllerinin analizinde kullanılan standart yöntem, destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektforezdir. Ultraviyole ışık altında floresan etki gösteren

etidyum bromür (EtBr) boyasının kullanımı ile nükleik asit moleküllerinin jelde görünür hale gelmesi analizin kolayca yapılabilmesine olanak vermektedir.



Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforez sistemi

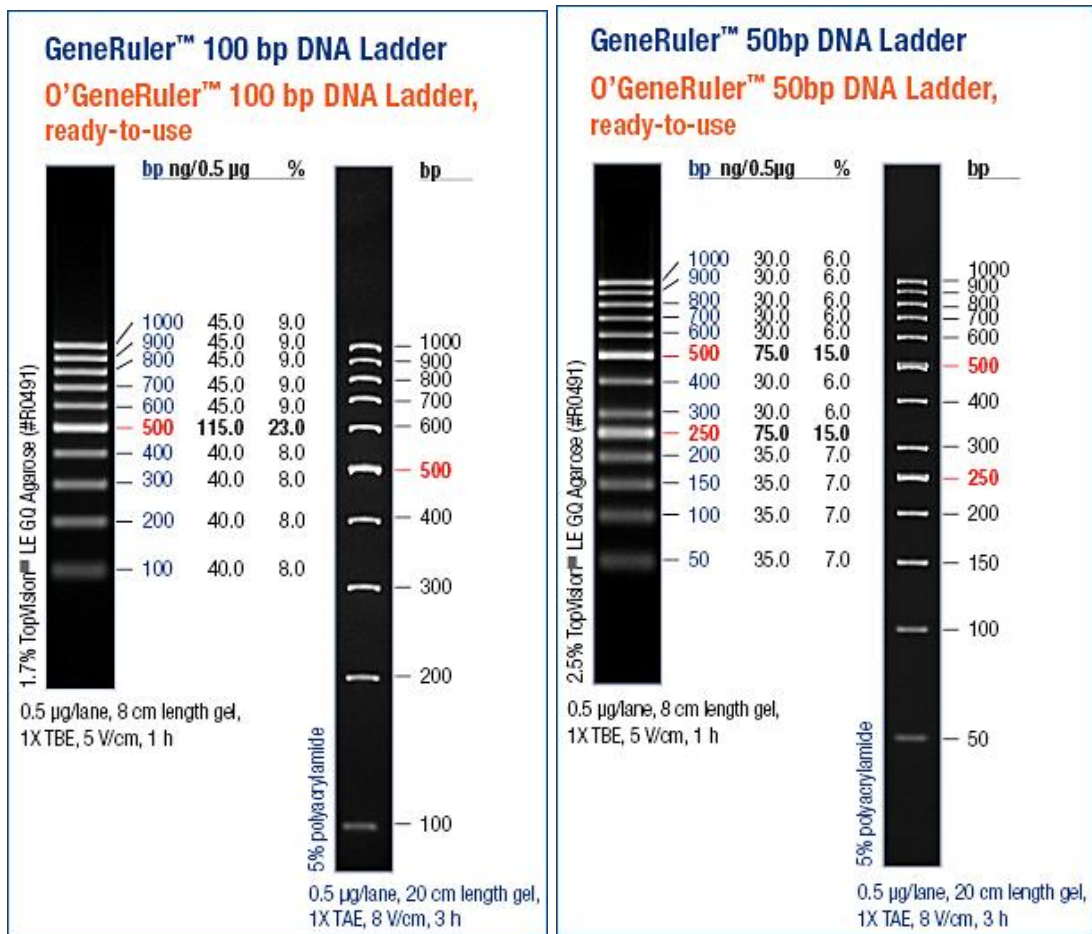
Çalışma kapsamında DNA moleküllerinin analizi için %1- 1,5; RNA moleküllerinin analizinde ise %2,5 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jeller kullanılmıştır. Çalışma süresince, DNA molekülleri, polimerizasyon, PCR ve ters-transkripsiyon PCR basamaklarından sonra; RNA molekülleri ise transkripsiyon reaksiyonlarından sonra doğal agaroz jel elektroforeziyle analiz edilmiştir.

%1'lik agaroz jel hazırlanırken aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. 0,35 gram agaroz 35 ml 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga ile kaynatılarak çözülmüştür.
2. Elle tutulabilecek sıcaklığa (50-55 °C) düşene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir
3. Etidyum bromür, jeldeki son konsantrasyonu 0,5 µg/ ml olacak şekilde ilave edilip ve iyice karıştırılmıştır.
4. Jel, tarakları yerleştirilmiş elektroforez tepsisine dökülmüştür.
5. Jel iyice katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılmış ve jel 1X TBE tamponu ile dolu tankın içine alınmıştır.

RNA jel elektroforezi için kullanılan her malzeme RNaz zap ile silinmiş ve DEPC-sudan geçirilmiştir. RNA agaroz jel elektroforezi için kullanılan tampon çözelti (5X TBE) DEPC-su ile 1X konsantrasyona getirilmiştir.

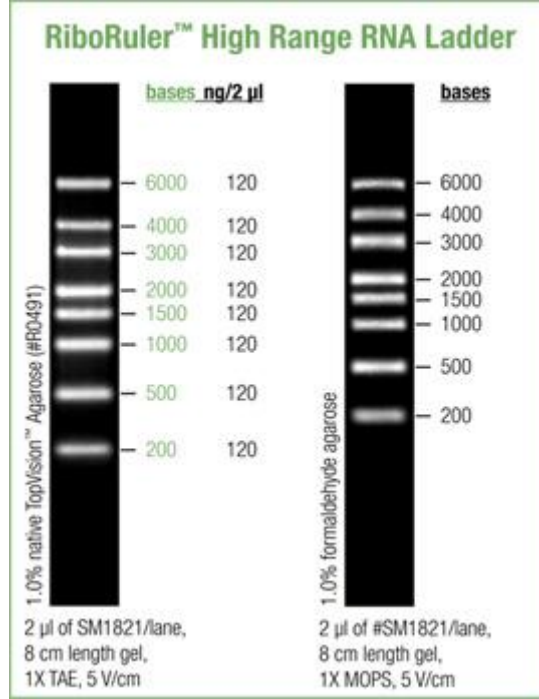
DNA, 6X DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA) ile 5:1 oranında karıştırıldıktan sonra agaroz jel üzerindeki kuyulara yüklenmiştir. Fragmentlerin boy kontrolü için GeneRuler 100 bp DNA ladder plus (Şekil 3.4.) ve GeneRuler 50 bp DNA ladder (Şekil 3.4.) kullanılmıştır. Elektroforetik ayırım 5V/cm olacak şekilde sabit akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA markerları

RNA molekülleri, elektrik alandaki hareketlerini etkileyecek ikincil yapılarına katlandıkları için denatüre edilerek elektroforez işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla denatüre edici agaroz jeller hazırlanmaktadır. Ancak RNA molekülleri, jele yüklenmeden önce denatüre edilerek, denatüre edici

olmayan agaroz jellerde de analiz edilebilmektedir. Formaldehit ve formamid RNA molekülünü denatüre etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında ise ticari olarak satılan 2X RNA Loading Dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% ethidium bromide, 0.5 mM EDTA) ile RNA örnekleri denatüre edilerek, denatüre edici olmayan agaroz jelde analiz edilmiştir.



Şekil 3.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan RNA markerı

RNA moleküllerinin denatüre edilerek agaroz jele yüklenmesi aşamasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. 4 µl 2X RNA yükleme boyası, 4 µl RNA ile karıştırılmıştır.
2. RNA fragmentlerinin boy kontrolü için marker olarak RiboRuler RNA Ladder (High Range) (Şekil 3.5.) kullanılmıştır.
3. Örnek karışımları ve 4 µl kullanıma hazır RNA markerı 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüpler hemen buz üzerine alınarak denatüre edilmiş yapıların korunması sağlanmıştır. Tüpler buz üzerinde en az 3 dakika inkübe edilmiştir.

4. Hazırlanan örnek karışımlarının hepsi agaroz jele yüklenmiştir.
5. Daha sonra elektroforetik ayırım 5V/cm olacak şekilde sabit akım uygulanarak agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Tüm jellerin analizi UV ışık altında jel görüntüleme ünitesi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Jel görüntüleme ünitesi

### **3.2.2.7. Nükleik Asit Moleküllerinin Saflaştırılması**

#### **3.2.2.7.1. Fenol/Kloroform Yöntemi**

##### **3.2.2.7.1.1. Fenolün Hazırlanması**

Fenol, oldukça toksik bir kimyasal madde olduğu için aşağıda belirtilen tüm aşamalar çeker ocak altında gerçekleştirilmiştir. Gerekli tüm önlemler alınmıştır.

1. Isıtıcı blok üzerinde bir beher içerisindeki su 65°C'ye kadar ısıtılmıştır. Kristalize fenol şişesi kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. 100 gr fenol kristali tartılarak cam bir şişeye alınmıştır.
3. Cam şişe, 65°C'deki suyun içerisine alınarak fenol benmari usulü eritilmiştir.
4. Fenol tamamen eridikten sonra şişe suyun içerisinden çıkarılmış, üzerine 100 ml 0,5M TrisCl (pH: 8) tamponu\* ilave edilmiştir.

5. Tampon ve fenol iyice karıştırıldıktan sonra karışım 500 ml'lik ayırma hunisi içine alınmıştır.
6. Fazların ayrımı için bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.
7. Üst faz tamamen berraklaştıktan sonra alt faz yeni bir şişede toplanmıştır. Üst fazın pH değeri, pH indikatör kağıtlarıyla ölçülmüştür. Üst faz atılmıştır.
8. Alt faz olarak toplanan fenolün üzerine tekrar 100 ml 50mM TrisCl (pH: 8) tamponu ilave edilmiştir.
9. 5., 6. ve 7. basamaklar tekrar edilmiştir. Oda sıcaklığında bekletme süresi fazların ayrışma süresi ile bağlantılı olduğundan, bu süre her tekrarda farklılık gösterebilmektedir.
10. pH değeri tampon pH'ı ile dengeye gelene kadar bu işlemler tekrarlanmıştır.
11. Tampon çözelti ile doyurulan fenol kullanıma hazır hale gelmiş ve 15'er ml olmak üzere santrifüj tüplerine bölünmüştür.
12. Bir kısmının üzerine 1:1 oranında 0,5M TrisCl (pH: 8), diğerlerinin üzerine 1:1 oranında kloroform eklenmiştir.
13. Hazırlanan fenol çözeltileri dik konumda -20°C'de saklanmıştır.

RNA saflaştırılmasında kullanılacak asit fenolün hazırlanması için ise fenol, 50mM sodyum asetat tamponu (pH: 4,5) ile doyurulmuştur.

#### **3.2.2.7.1.2. Fenol/Kloroform Yöntemi ile RNA Saflaştırılması**

Bu yöntemle RNA saflaştırılmasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. DNaz ile muamele edilen transkripsiyon ürünlerinin miktarları ölçülerek nükleaz içermeyen su ile son hacimleri 135 µl'ye tamamlanmıştır.
2. Her bir tüpe 15 µl 3M sodyum asetat ilave edilmiştir.
3. 150 µl asit-fenol ilave edilip, vortexlenmiştir.
4. 12000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.7. Çeker ocak

5. Supernatan yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 150 µl kloroform ilave edilip, vortexlenmiştir.
6. 12000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
7. 5. ve 6. basamaklar tekrar edilmiştir.
8. Supernatan yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 300 µl soğuk saf alkol eklenmiştir.
9. -80 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
10. 12000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Supernatan atılmış, pelet üzerine 400 µl %70 etanol ilave edilmiştir.
12. 12000xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
13. Supernatan atıldıktan sonra, tüpler biyolojik güvenlik kabini içerisine alınarak kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

14. Hafif kuruyan pelet 40 µl nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüş ve -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Bu yöntemle seleksiyon sonrası RNA saflaştırılmasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Seleksiyon basamağından sonra 2ml hacimle toplanan RNA moleküllerinin konsantrasyonunun artırılması ve pürifiye edilmesi amacıyla fenol/kloroform yönteminden faydalanılmıştır.
2. Her bir tüpe 225 µl 3M sodyum asetat ilave edilmiştir.
3. 2250 µl asit-fenol ilave edilip, vortexlenmiştir.
4. 12000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
5. Supernatan yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 2250 µl kloroform ilave edilip, vortexlenmiştir.
6. 12000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
7. 5. ve 6. basamaklar tekrar edilmiştir.
8. Supernatan yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 4500 µl soğuk saf alkol eklenmiştir.
9. -80 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
10. 12000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Supernatan atılmış, pelet üzerine 400 µl %70 etanol ilave edilmiştir.
12. 12000xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
13. Supernatan atıldıktan sonra, tüpler biyolojik güvenlik kabini içerisine alınarak kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.
14. Hafif kuruyan pelet 40 µl nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüş ve -20 °C'ye kaldırılmıştır.



### 3.2.2.7.2. Agaroz Jelden ve Reaksiyon Karışımından Saflaştırma

SELEX döngülerinin başında in vitro transkripsiyondan sonra seleksiyona girecek RNA moleküllerinin saflaştırılması amacıyla Zymoclean™ Gel RNA Recovery Kit veya RNA Clean & Concentrator™-25 ticari kiti kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonundan sonra in vitro transkripsiyona girecek veya sekans analizi yapılacak DNA moleküllerinin saflaştırılması amacıyla UltraClean® GelSpin® DNA Extraction Kit ticari kiti kullanılmıştır.

DNA moleküllerinin agaroz jelden saflaştırılması için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Saflaştırılmak istenilen fragment(ler) steril bir bisturi ucu yardımıyla agaroz jelden kesilmiştir.
2. Kesilen jel parçaları önceden ağırlığı alınmış steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alınıp, tüplerin dolu ağırlıkları alınmıştır. Böylece kesilen jel parçalarının ağırlıkları hesaplanmıştır.
3. Bu şekilde ağırlıkları belirlenen jel parçalarına 3:1 (hacim: ağırlık) oranında kitin içerisindeki GelBind bağlanma tamponu eklenmiş ve 56 °C'de jel parçaları eriyene kadar yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada jel geri dönüşümsüz olarak oda sıcaklığında tekrar katılaşmayacak şekilde eritilmiş olmaktadır.
4. Santrifüj tüpü kısaca vortekslendikten sonra içeriği kit içerisinde bulunan SpinFilter kolona alınarak 10000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Bu aşamada eriyen jel materyali ve istenmeyen çözelti toplama tüpünde birikirken, DNA fragmentleri kolon membranına tutunmuş olmaktadır.
5. Altta toplanan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Kolon üzerin 300 µl etanol içeren GelWash yıkama çözeltisi eklenerek 10000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Böylece kolon membranında kalmış olabilecek artıklar ortamdan uzaklaştırılmış olmaktadır.
6. Altta toplanan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Tekrar 10000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek fazla etanol uzaklaştırılmıştır.

7. Kolon steril bir santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek 40 µl nükleaz içermeyen su membran üzerine ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 10000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Böylece DNA molekülleri santrifüj tüpünde toplanmıştır.

RNA moleküllerinin reaksiyon karışımından saflaştırılması için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Saflaştırılmak istenilen reaksiyon karışımının üzerine reaksiyon hacminin 2 katı kadar kitin içerisinde bulunan RNA Binding bağlanma tamponu ilave edilmiştir.
2. Yeni oluşan karışımın üzerine karışımın hacmi kadar saf etanol ilave edilmiştir. Pipetlenerek iyice karışması sağlanmıştır.
3. Hazırlanan karışım kitin içerisinde bulunan Zymo-Spin IIC kolonuna alınarak 12000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece RNA fragmentleri kolon membranına bağlanırken ve reaksiyon karışımının içeriği alttaki tüpte toplanmış olmaktadır. Altta toplanan kısım atılarak kolon toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirilmiştir.
4. Kolona kitin içerisinde bulunan RNA Prep tampon çözeltisinden 400 µl ilave edilerek 12000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım atılarak kolon toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirilmiştir.
5. Her örnek için 10 u DNase I, RNase free (1u/µl), 10X enzimin reaksiyon tamponu ve RNA Wash yıkama tamponu son hacim 100 µl olacak şekilde karıştırıldıktan sonra kolona alınmıştır.
6. Kolon 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 12000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım atılarak kolon toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirilmiştir. Böylece reaksiyon karışımındaki DNA moleküllerinin de ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır.
7. Kolona kitin içerisinde bulunan RNA Prep tampon çözeltisinden 400 µl ilave edilerek 12000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım atılarak kolon toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirilmiştir.

8. Kolona kitin içerisinde bulunan RNA Wash yıkama çözeltisinden 800 µl ilave edilerek 12000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım atılarak kolon toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirilmiştir.
9. Kolon boş olarak 12000xg'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon, toplama tüpünden ayrılarak, steril, RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpü içerisine alınmıştır.
10. 50 µl nükleaz içermeyen su membran üzerine ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 10000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Böylece DNA molekülleri santrifüj tüpünde toplanmıştır. Toplanan RNA molekülleri hemen kullanılmayacaksa -80°C'de saklanmıştır.

### **3.2.2.8. DNA Dizi Analizi**

Zincir sonlandırma yöntemiyle DNA dizi analizi (Sanger et al., 1977) 2', 3'-dideoksinükleotid sonlandırıcılarının (ddNTP) uzayan DNA zincirinin yapısına katılmasıyla gerçekleşmektedir. Temel olarak DNA dizi analizi reaksiyonu, primer molekülü bağlanmış tek zincirli kalıp DNA molekülünden DNA polimeraz aracılığıyla yeni DNA zincirinin sentezlenmesidir. DNA dizi analizi reaksiyonlarında kullanılmakta olan çeşitli DNA polimerazlar bulunmaktadır. DNA polimeraz, primerin 3' ucundan uzamayı sağlayarak DNA sentezi için dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) moleküllerini kullanmaktadır. Zincir sonlandırma yönteminde, her birinde dNTP moleküllerinin hepsi ve ddNTP moleküllerinden sadece bir tanesi bulunan dört adet reaksiyon gerçekleştirilir. Böylece 3'-OH grubu içermediği için fosfodiester bağının oluşumunu engelleyen ddNTP molekülü uzayan zincirin yapısına katıldığı zaman zincir uzaması sonlanır. Sonuçta birbirinden farklı uzunlukta bir dizi DNA fragmanı elde edilmekte ve yüksek çözünürlükte bir jelde veya kapiler elektroforez sisteminde fragmentlerin boylarına göre ayırım yapılmakta, DNA dizisi saptanmaktadır.

Reaksiyon ürünlerinin okunabilmesi amacıyla ürünler genellikle radyoaktif veya floresan ile etiketlenmektedir. Radyoaktif işaretleme manuel dizi analizi için kullanılmaktaysa da günümüzde otomatize edilmiş tanı sistemleri ve floresan boyalar yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu amaçla primer işaretleme veya daha yaygın olarak ddNTP işaretleme olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Floresan

tanı sistemi içeren DNA dizi analizi cihazları levha jel veya kapiler elektroforez sistemlerine dayanmaktadır. Kapiler sistemlerde DNA ayrımı polimerize olmamış jel dolgu materyali ve lazer tanıyıcı sistemi ile gerçekleştirilmektedir. Polimerin kapilerde hareketi, örneklerin yüklenmesi, yürütülmesi ve fragment analizi otomatize proseslerdir. Tek bir floresan etiket kullanılması dört farklı reaksiyon gerçekleştirilmesini gerektirmektedir. Ancak ddNTP'ler dört farklı floresan etiket ile işaretlendiğinde tüm reaksiyonlar tek bir tüp içinde gerçekleştirilebilmekte ve tek bir jel kuyusunda veya kapilerde analiz edilebilmektedir.

Çalışmada, SELEX döngüleri sonucunda elde edilen hedef moleküle bağlanan dizilerin tanımlanması amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

1. DNA dizi analizi için PCR gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada gerçekleştirilen PCR koşulları yukarıda belirtilmiştir.
2. Dizi analizi reaksiyonuna saf ürünle başlamak büyük bir önem taşımaktadır. Bu sebeple, PCR ürünleri yukarıda belirtildiği şekilde agaroz jelden izole edilmiştir. Böylece analizi yapılacak DNA fragmentleri, diğer fragmentlerden, dizi analizini etkileyecek primer veya nükleotidler gibi diğer birleşenlerden arındırılmıştır.
3. Direk DNA dizi analizi için orjinal PCR primerlerinden bir tanesi kullanılmıştır.
4. Doğrusal (lineer) PCR ile dideoksi dizi analizinde kalıp olarak kullanılacak tek zincirli DNA molekülleri elde edilmiştir. Döngüsel dizi analizi, dizi sonlandırıcılarının (ddNTP) doğrusal PCR'a katılmasıyla gerçekleşmektedir. Sadece bir primer kullanılarak ve denatürasyon, primer bağlanması ve uzama basamaklarını gerçekleştiren PCR cihazıyla, dideoksinükleotidlerin eş zamanlı olarak yapıya katılması sonucu lineer bir amplifikasyon sağlanmıştır. DNA dizi analizi basamağında hizmet alımı yapıldığı için doğrusal PCR basamağı hizmet sağlayıcısı tarafından gerçekleştirilmiştir (Biyonesil Biyolojik Ürünler Ar-Ge, Türkiye).

5. Döngüsel dizi analizi reaksiyonu ürünleri otomatize bir kapiler elektroforez sistemi olan ABI 310 ile gerçekleştirilmiş, sonuçlar Geneious R6 yazılımı ile analiz edilmiştir.

### **3.2.3. Yüzey İmmobilizasyon Deneyleri**

#### **3.2.3.1. Altın Yüzeylerin Hazırlanması**

8mm x 8 mm boyutunda, 10 nm krom üzeri 30 nm altın kaplı yüzeyler yurt içinden temin edilmiştir (Nanovak, Ankara). Altın yüzeyler immobilizasyon deneylerinde kullanılmadan önce, yüzeyde var olabilecek organik kalıntıların uzaklaştırılması amacı ile saf etanol kullanılarak temizlenmiştir. Altın yüzeylerin kuruma esnasında kirlenmesi ve oksitlenmesini engellemek amacıyla, 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur.

#### **3.2.3.2. Avidin İmmobilizasyonu**

1 mg ambalajında temin edilen tiyollenmiş avidin molekülleri, konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde PBS (pH:7.4) içinde çözülmüştür. Temizlenmiş ve kurutulmuş altın yüzeyler üzerine 5 µl damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS (pH:7.4) içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Yüzeyler 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur.

#### **3.2.3.3. Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FTIR)**

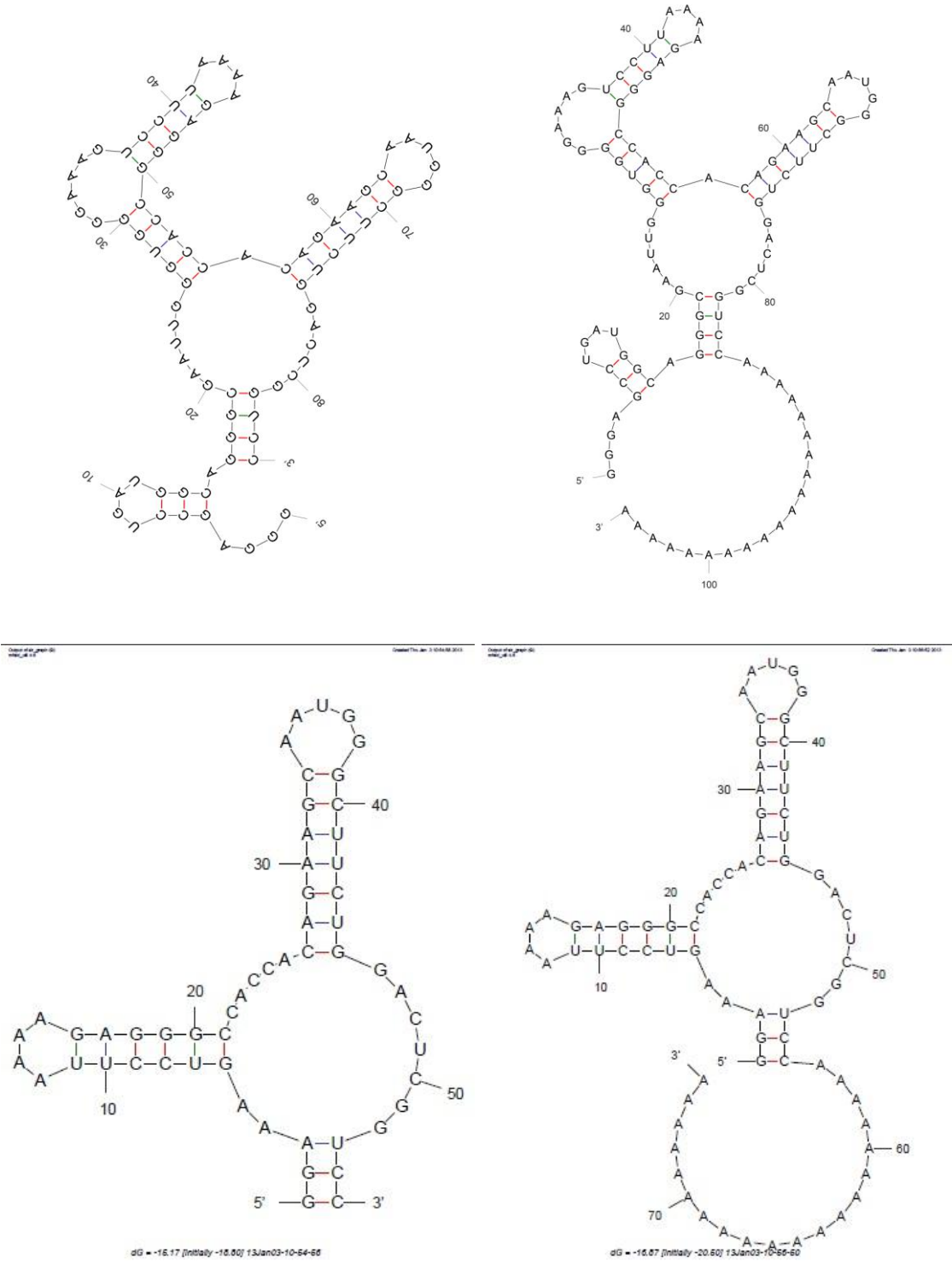
Avidin tutunmasının doğrulanması amacıyla yüzeylerin kimyasal yapıları Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), Attenuated Total Reflectance (ATR) aparatı kullanılarak incelenmiştir (Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR, ABD). Sistemde dedektör olarak mercury cadmium telluride (MCT) dedektörü kullanılmıştır. MCT dedektörü ölçümlerden önce sıvı azot ile soğutulmuştur. Spektrumlar 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlüğünde, her bir örnek için 128 adet tarama alınarak elde edilmiştir. Altın yüzey, güçlü yansıtıcı özellikte olduğu için negatif pikler vermektedir. Dolayısıyla bu negatif pikler, avidin immobilize yüzeylerde oluşan kimyasal gruplara ait bantları maskeleymektedir. Bu nedenle avidinin yüzeydeki varlığının doğrulanması için fark spektrumundan faydalanılmıştır. Fark spektrumu; boş altın yüzeyinin, avidin immobilize edilmiş altın yüzeyinden çıkartılması ile elde edilmiştir. Bu işlem cihaza ait yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.3.4. Aptamer İmmobilizasyonu

Ökaryot mRNA moleküllerinin 3' ucunda poli-(A) kuyruğu bulunmaktadır. mRNA yapısındaki bu poli-(A) kuyruğu, mRNA molekülünün sekonder yapısında ve işlevinde bir değişikliğe yol açmamaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak SELEX prosesi sonucunda elde edilen aptamer moleküllerinin 3' ucuna poli-(A) kuyruğunun eklenmesinin, aptamer molekülünün sekonder yapısında bir değişikliğe yol açmayacağı öngörülmüştür. Bununla birlikte, dizisi bilinen aptamer dizilerinin, poli-(A) kuyruğu eklenmiş ve eklenmemiş formlarının Mfold programı ile sekonder yapılarının kestirimi yapılmıştır. Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi, poli-(A) kuyruğunun aptamer molekülünün sekonder yapısında bir değişikliğe yol açmadığı doğrulanmıştır. Buradan yola çıkarak, altın yüzeye aptamer molekülleri immobilizasyonunun poli-(A) dizileri ile yapılmasına karar verilmiştir.

Avidin immobilize edilmiş altın yüzeyler üzerine 100 pmol/μl konsantrasyonundaki nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüş olan 3' ucu biyotinlenmiş poli-(T) çözeltisinden 50 μl damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS (pH:7.4) içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Yüzeyler 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur.

Yukarıda detaylı olarak anlatıldığı gibi son SELEX döngüsünde elde edilen RNA moleküllerinin ilk olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiş, ardından RT-PCR ile amplifiye edilmiştir. Daha sonra çoğaltılan DNA molekülleri UltraClean® GelSpin® DNA Extraction Kit ile saflaştırılmıştır. Zenginleştirilmiş aptamer moleküllerinin 3' uçlarında poli-(A) gruplarının oluşturulması amacıyla primer uzaması reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada poli-(T) primer kullanılmıştır. Reaksiyon bileşen ve koşulları aşağıda detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 3.8. Mfold programı ile sekonder yapılarının kestirimi yapılan aptamer molekülleri

Bu şekilde son SELEX döngüsü sonucunda elde edilen aptamer moleküllerinin öncelikle DNA komplementleri sentezlenmiş, PCR ile çoğaltılmıştır. Daha sonra elde edilen DNA dizilerinin 5' uçlarına primer uzaması yöntemiyle poli-(T) dizileri eklenmiştir.

Çizelge 3.19. İmmobilizasyon öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
RT-PCR ürünü (pürifiye edilmiş)	40 µl
Reaksiyon tamponu (10X)	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	12 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
Poli-(T)-primer (100pmol/µl)	2,4 µl
Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,6 µl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	33 µl
Toplam reaksiyon	100 µl

Çizelge 3.20. İmmobilizasyon öncesi gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon+enzim aktivasyonu	95 °C	4 dk
Primer bağlanması	50 °C	45 sn
Uzama	72 °C	5 dk

Elde edilen bu 5' ucu poli-(T) dizisi içeren DNA moleküllerinden tekrar in vitro transkripsiyon yapılarak 3' ucunda poli-(A) dizisi içeren seçilmiş aptamer molekülleri elde edilmiştir.

### 3.2.3.5. Hedef Molekül (GFP) ile İnkübasyon

1 mg/ml konsantrasyonunda temin edilen PBS içinde çözülmüş GFP molekülleri, aptamer immobilize edilmiş altın yüzeyler üzerine 25 µl damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS (pH:7.4) içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Yüzeyler 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur.

### 3.2.3.6. Floresan Mikroskop

Altın yüzey üzerinde aptamer molekülleri ile hedef molekül (GFP) arasındaki etkileşim durumunda yüzeyde oluşan hedef molekül kaynaklı floresan sinyallerin floresan mikroskop kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Floresan mikroskop ile görüntüleme işlemi Nikon Eclipse E600 ile plan 1X ve plan 4X objektifler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskoptaki görüntüler Nikon DXM 1200 kamera sistemi ile dijital ortama aktarılmış ve NIS Elements yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



## 4. DENEYSEL SONUÇLAR

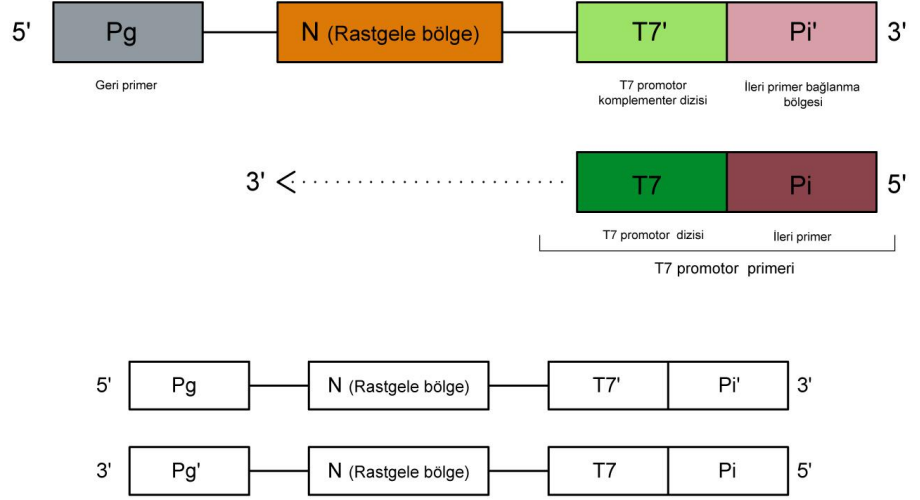
### 4.1. RNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Yurt dışından temin edilen rastgele kalıp DNA molekülleri otomatize bir prosedürle sentezlenmektedir. Bu prosedürün kısıtlamaları sebebiyle, sentezlenen rastgele DNA molekülü miktarının alabileceği maksimum bir değer vardır. Söz konusu bu miktarın SELEX deneylerinde kullanılmak üzere yetersiz kalacağı öngörülmüştür. Rastgele kalıp DNA moleküllerini sentezlemek için kullanılan bu sistemin kolaylıkla erişilebilir bir konumda bulunmaması ve dolayısıyla bu moleküllerin istenildiği zaman tekrar temin edilmesi oldukça zaman alan ve maliyetli bir süreç haline gelmektedir. Bu amaçla, başlangıç RNA kütüphanesinin kalıp molekülleri olan tek zincirli DNA (ssDNA) molekülleri ilk olarak, PCR ile amplifiye edilmiştir. Böylece kalıp DNA molekülleri istenilen miktarda ve oldukça düşük bir maliyetle çoğaltılmıştır. Ayrıca literatürde, hasara uğramış ve PCR ile çoğaltılamayacak ssDNA sentez ürünlerini elimine edebilmek amacıyla rastgele kalıp DNA moleküllerinin PCR ile amplifikasyonu tercih edilen bir basamak olarak belirtilmiştir (Marshall and Ellington, 2000). Başlangıç PCR basamağının bu avantajları yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. Kimyasal olarak sentezlenmiş DNA moleküllerinin polimeraz ile amplifikasyonunun farklı etkinlikte olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle her PCR döngüsünde bazı diziler kaybedilebilmektedir. Ancak tez çalışmasında kullanılan başlangıç RNA kütüphanesini oluşturan ssDNA dizilerinin rastgele bölge uzunluklarının pratik sınırları aşması sebebiyle, pratikte bu dizilerin bir kısmının SELEX döngüsüne başlamadan kaybedilmesi anlamlı bir değişiklik yaratmayacaktır. Bunun yanında, çalışma sırasında PCR için kullanılan Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase enziminin deoksinükleotidil transferaz aktivitesi sebebiyle sıklıkla PCR ürünlerinin 3' ucuna fazladan adenin nükleotidlerini eklediği belirtilmiştir. Bu ise oligonükleotid dizilerinin değişmesine sebep olmaktadır. Ancak bu durumda da, 3' ucuna takılacak adenin nükleotidleri T7 promotor dizisinin dışında kalacağı için eklenen bu nükleotidlerin hiç bir zaman RNA komplementeri sentezlenmeyecektir.

Tüm bu avantaj ve dezavantajlar göz önünde bulundurularak, rastgele ssDNA dizileri ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR'dan önce ssDNA molekülleri ile "fill-in" reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece, ssDNA molekülleri

çift zincirli hale gelmiş ve bu şekilde iki adet primer bağlanma bölgesi oluşturulmuştur (Şekil 4.1.).

#### FILL IN REAKSIYONU

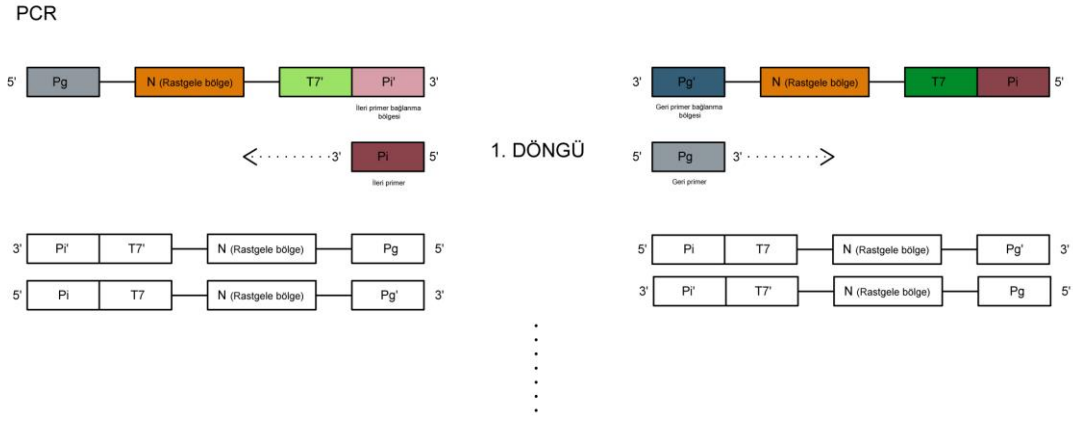


Şekil 4.1. Fill-in reaksiyonunun şematik gösterimi.

Bunun için 5 pmol/µl kalıp ssDNA ve 5 pmol/µl T7 primer dizisi, nükleaz içermeyen su ve NEB Buffer 2 (10X) içerisinde önce 94°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, ardından 50°C'de 5 dakika inkübe edilerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon karışımına 1,5u DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment ve 0,5 mM dNTP karışımı (10mM), son hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. 25°C'de 15 dakika, ve enzim inaktivasyonu için 75°C'de 20 dakika inkübe edilerek fill-in reaksiyonu tamamlanmıştır. Daha sonra "fill-in" reaksiyonu ürünleri kalıp olarak kullanılarak, ileri ve geri primerler yardımıyla PCR gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.).

Polimeraz zincir reaksiyonunun etkinliğinin artırılması ve reaksiyon koşullarının test edilmesi amacıyla optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık döngülerinin optimizasyonu için Hot-Start Touchdown PCR protokolünün kullanılmasına karar verilmiştir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu için, kalıp DNA, MgCl<sub>2</sub> ve primer miktarlarında değişiklik yapılmıştır. PCR optimizasyon

deneylerinde kullanılan parametreler Çizelge 4.1.'de, deney sonuçları ise Şekil 4.1.'de verilmiştir.

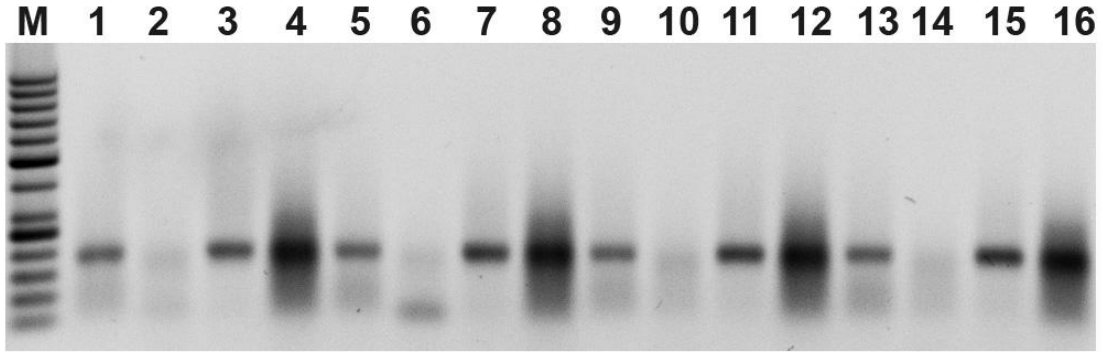


Şekil 4.2. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi.

Çizelge 4.1. PCR optimizasyon deneylerinde kullanılan parametreler

	Kalıp DNA (100 pmol/ µl)	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Primer (100 pmol/ µl)
A	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_1 (1:1000 sulandırma) RNA kütüphanesi_2 RNA kütüphanesi_2 (1:1000 sulandırma)	2,5mM	0,8 pmol/µl
B	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_1 (1:1000 sulandırma) RNA kütüphanesi_2 RNA kütüphanesi_2 (1:1000 sulandırma)	2,5mM	1,2 pmol/µl
C	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_1 (1:1000 sulandırma) RNA kütüphanesi_2 RNA kütüphanesi_2 (1:1000 sulandırma)	3mM	0,8 pmol/µl
D	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_1 (1:1000 sulandırma) RNA kütüphanesi_2 RNA kütüphanesi_2 (1:1000 sulandırma)	3mM	1,2 pmol/µl

PCR amplifikasyon ürünleri, protokolü yukarıda detaylı bir şekilde anlatıldığı şekilde %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3. PCR optimizasyonu sonucu amplifikasyon. M: 50 bp DNA marker; 1, 5, 9, 13 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1 (1:1000 sulandırma); 2, 6, 10, 14 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2 (1:1000 sulandırma); 3, 7, 11, 15 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1; 4, 8, 12, 16 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2. 1, 2, 3, 4 nolu kuyular: A grubu; 5, 6, 7, 8 nolu kuyular: B grubu; 9, 10, 11, 12 nolu kuyular: C grubu; 13, 14, 15, 16 nolu kuyular: D grubu.

Optimizasyon sonuçları yukarıda görülen (Şekil 4.3.) PCR amplifikasyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 50 bp DNA ladder (Şekil 3.4.) kullanılmıştır. Buna göre tüm fragmentlerin 150-200 bp arasındaki bölgede doğru olarak amplifiye olduğu görülmektedir. Bant yoğunlukları deney grupları arasında değerlendirildiğinde en fazla amplifikasyonun D grubunda olduğu görülmektedir. Kalıp DNA miktarları arasındaki bant yoğunlukları değerlendirildiğinde ise RNA kütüphanesi\_1 amplifikasyonu hem 1:1000 sulandırmada hem de sulandırılmamış örneklerde etkin bir şekilde gerçekleşmiştir. RNA kütüphanesi\_2 amplifikasyonu ise 1:1000 sulandırılmış örneklerde başarılı olmamış, ancak sulandırılmamış örneklerde çok miktarda amplifiye olmuştur. Buna göre, en iyi amplifikasyon 13, 15 ve 16 nolu kuyularda görülmektedir. Bu nedenle bundan sonraki PCR basamaklarında RNA kütüphanesi\_1 kullanılırken 1:1000 sulandırılmasına, MgCl<sub>2</sub> son konsantrasyonu 3mM ve primer son konsantrasyonu 1,2 pmol olacak şekilde kullanılmasına karar verilmiştir.

Tek zincirli rastgele kalıp DNA moleküllerinden, başlangıç RNA kütüphanesinin sentezlenmesi amacıyla in vitro transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. Transkripsiyondan önce ssDNA molekülleri T7 promotor primeri ile hibridize edilmiştir. Reaksiyondaki son konsantrasyonları 5 pmol/ µl ssDNA (100 pmol/ µl)

ve 5 pmol/ µl T7 promotor primeri (100 pmol/ µl), 5X Reaksiyon tamponu (200 mM Tris-HCl -pH 7.9, 25°C-, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM spermidine) ve nükleaz içermeyen su içerisinde son hacim 37,25 µl olacak şekilde, 94°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, ardından 50°C'de 5 dakika inkübe edilerek hibridize edilmiştir. Hibridizasyondan hemen sonra 2 mM NTP karışımı (10mM), 30u T7 RNA Polymerase (20u/µl) ve 50u RiboLock RNase Inhibitor (40u/µl), son hacim 50 µl olacak şekilde reaksiyona eklenmiştir. Transkripsiyon reaksiyonu optimal süreyi belirlemek amacıyla üç farklı grup ve her iki kalıp DNA ile 37°C'de inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

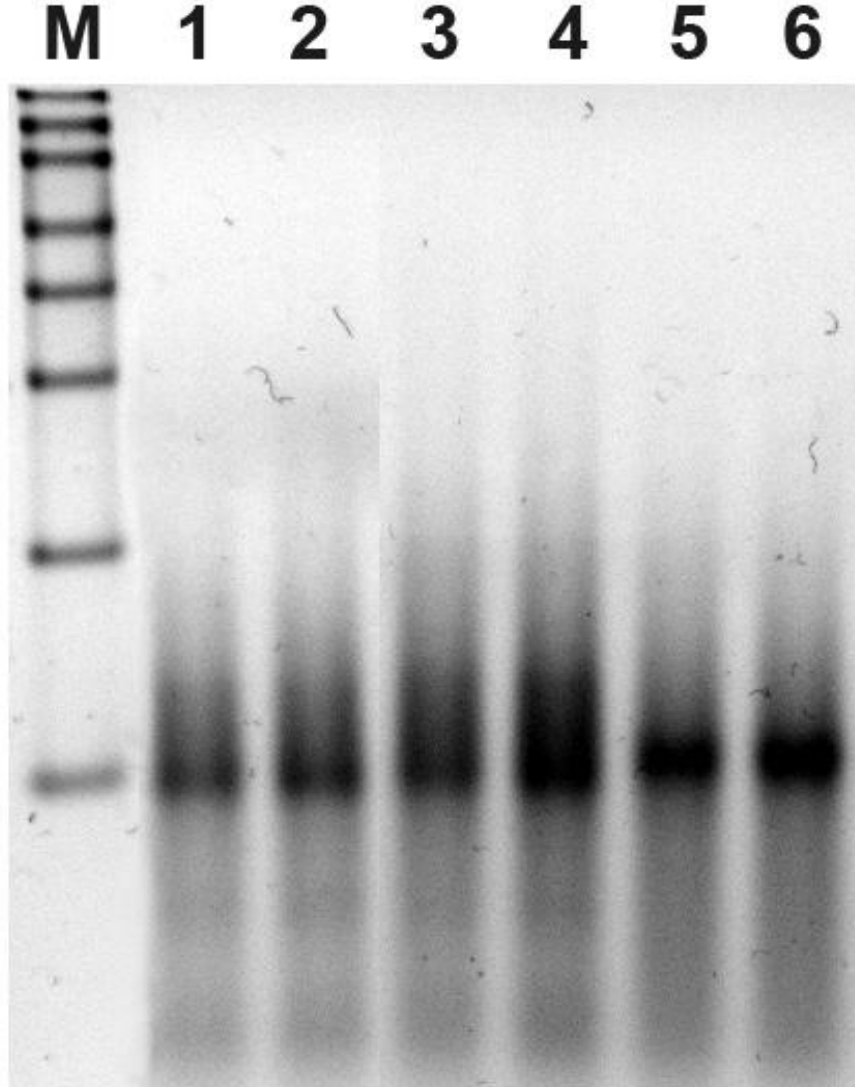
Çizelge 4.2. Transkripsiyon süresi optimizasyonu için kullanılan parametreler.

Kalıp ssDNA	Transkripsiyon süresi
RNA kütüphanesi_1	2 saat
	4 saat
	16 saat
RNA kütüphanesi_2	2 saat
	4 saat
	16 saat

In vitro transkripsiyon ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %2,5'lik agaroz jele denatüre edilerek yüklenmiştir. Bunun için 4 µl 2X RNA Loading Dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% ethidium bromide, 0.5 mM EDTA), 4 µl transkripsiyon ürünü ile karıştırılmıştır. Örnek karışımları ve 4 µl kullanıma hazır RiboRuler RNA Ladder (High Range) 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüpler hemen sonra buz üzerine alınarak denatüre edilmiş yapıların korunması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Farklı sürelerde gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon ürünleri Şekil 4.4.'de görülmektedir. Transkripsiyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak RiboRuler RNA Ladder (High Range) (Şekil 3.5) kullanılmıştır. Buna göre tüm fragmentlerin 200 bp bantının biraz aşağısındaki bölgede doğru olarak sentezlendiği görülmektedir. Değişen sürelerle göre bant yoğunlukları değerlendirildiğinde, en az sentez 2 saatlik grupta gerçekleşmiştir. 4 saatlik ve 16 saatlik reaksiyon bantlarına bakıldığı zaman iki grup arasında bir fark görülmemektedir. Deney süresinin kısaltılması amacıyla

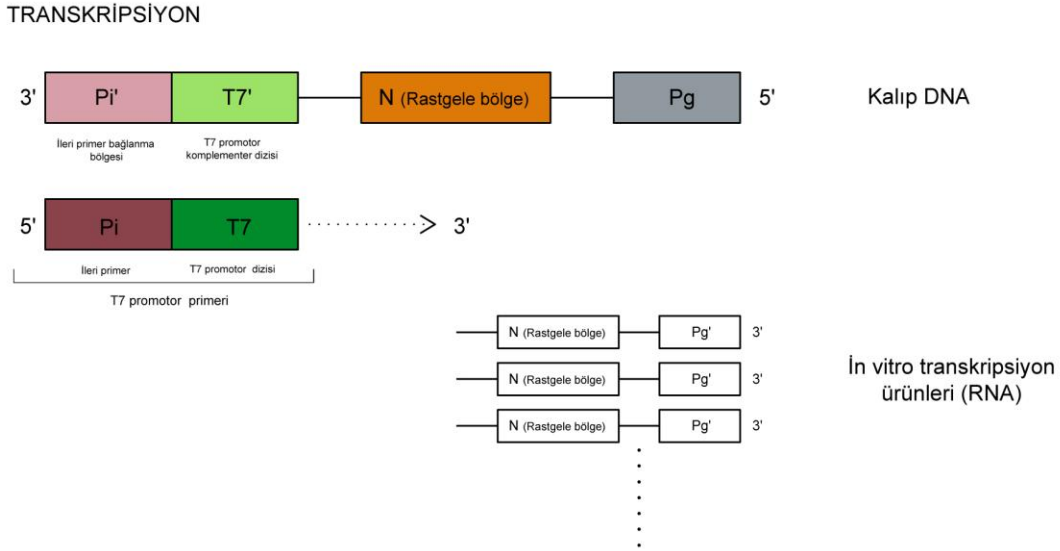
bundan sonraki transkripsiyon reaksiyonlarının 4 saat süre ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sürelerde gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon ürünleri. M: RiboRuler (High Range) RNA marker; 1, 3, 5 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1 (1:1000 sulandırma); 2, 4, 6 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2

Şekil 4.4.'de bazı kuyularda yoğunluğu düşük olan ikincil bantlar görülmektedir. Tek zincirli DNA molekülleri ile T7 promotor primeri arasında gerçekleştirilen hibridizasyon sırasında, promotor primerinin dizi içerisinde herhangi bir bölgeyle yanlış olarak eşleşmesi sonucu bu ikincil bantların oluşabileceği öngörülmüştür. Bu sebeple hibridizasyon koşulları değiştirilerek ikinci bir optimizasyon deneyi

yapılmıştır. Literatürde, transkripsiyon reaksiyonunun hassasiyetini ve ürün kalitesini artırmak amacıyla, transkripsiyondan önce “fill-in” reaksiyonu yapılması önerilmektedir (Liu et al., 2008). Bunun için bir grup örnekte “fill-in” reaksiyonu gerçekleştirilirken diğer grupta gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca, hibridizasyon reaksiyonunu, ayrı ayrı her iki grup için de PCR cihazı ve su banyosunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5. In vitro transkripsiyon reaksiyonunun şematik gösterimi

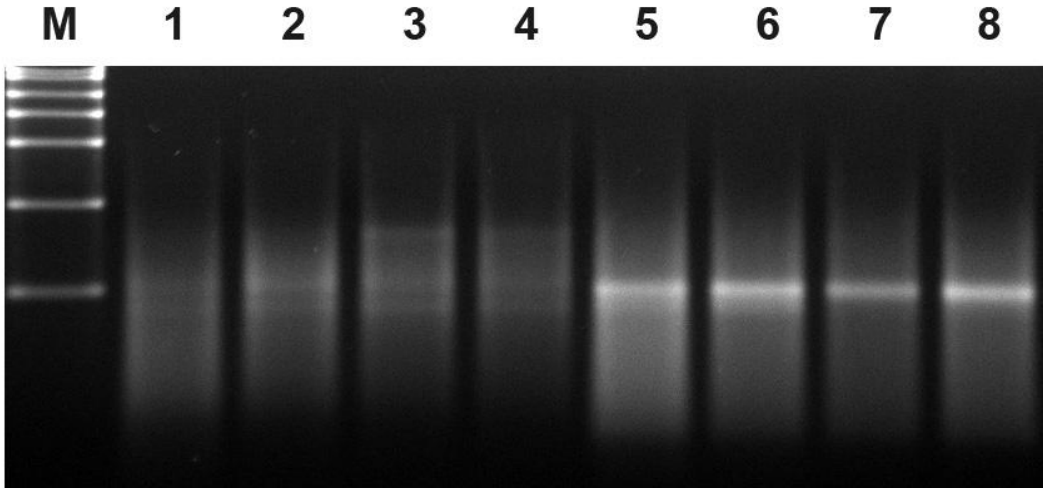
Fill-in yapılacak örnekler için NEB Buffer 2 (10X) tamponu, diğer örnekler için transkripsiyon reaksiyon tamponu (5x) kullanılarak hibridizasyon yapılmıştır. PCR cihazında hibridizasyon, reaksiyondaki son konsantrasyonları 5 pmol/ µl ssDNA (100 pmol/ µl) ve 5 pmol/ µl T7 promotor primeri (100 pmol/ µl), uygun tampon ve nükleaz içermeyen su içerisinde, 94°C’de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilip, ardından 50°C’de 5 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Su banyosunda hibridizasyon için aynı reaksiyon koşulları kullanılmıştır. Örnekler, 94°C’ye çıkarılan su banyosu içerisine alınmış, ardından su banyosu kapatılarak sıcaklık 50°C’ye düşene kadar hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyondan sonra fill-in reaksiyonu gerçekleştirilecek örneklere 1,5u DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5u/µl) ve 0,5mM dNTP karışımı (10mM), son hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. 25°C’de 15 dakika, ve enzim inaktivasyonu için 75°C’de

20 dakika inkübe edilerek fill-in reaksiyonu tamamlanmıştır. Daha sonra tüm örnekler ile in vitro transkripsiyon yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Transkripsiyon optimizasyonu için değiştirilen parametreler.

Kalıp ssDNA	Hibridizasyon	Fill-in
RNA kütüphanesi_1	Su banyosu	+
	PCR cihazı	-
RNA kütüphanesi_2	Su banyosu	+
	PCR cihazı	-

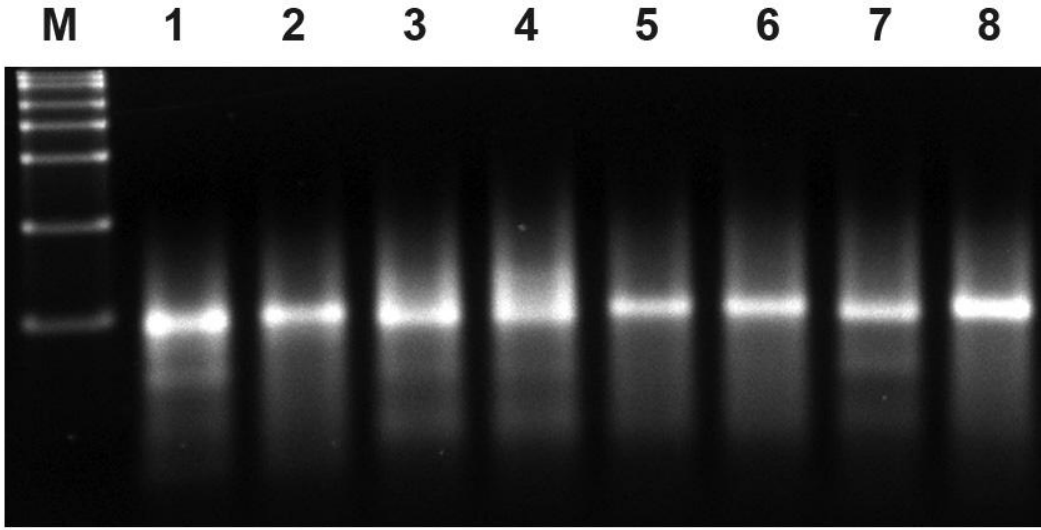
İn vitro transkripsiyon ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %2,5'lik agaroz jele denatüre edilerek yüklenmiştir. Bunun için 4 µl 2X RNA Loading Dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% ethidium bromide, 0.5 mM EDTA), 4 µl transkripsiyon ürünü ile karıştırılmıştır. Örnek karışımları ve 4 µl kullanıma hazır RiboRuler RNA Ladder (High Range) 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüpler hemen sonra buz üzerine alınarak denatüre edilmiş yapıların korunması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.65. Hibridizasyon koşulları değiştirilerek gerçekleştirilmiş in vitro transkripsiyon ürünleri. M: RiboRuler (High Range) RNA marker; 1, 3, 5, nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1 (1:1000 sulandırma); 2, 4, 6, 8 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2



Hibridizasyon koşulları değiştirilen in vitro transkripsiyon ürünleri Şekil 4.6.'da görülmektedir. Transkripsiyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak RiboRuler RNA Ladder (High Range) (Şekil 3.5.) kullanılmıştır. Buna göre tüm fragmentlerin 200 bp bantının biraz aşağısındaki bölgede doğru olarak sentezlendiği görülmektedir. Ancak hibridizasyondan sonra fill-in yapılan tüm örneklerde silik ve spesifik olmayan bantlar görülmektedir. Fill-in yapılmayan örneklerde ise transkripsiyon daha etkin olarak gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, kalıp DNA molekülünün boyutunun kısa olması, ikincil yapısının enzimin aktivitesini engellememesi ve enzimin optimizasyon koşullarında yüksek aktiviteyle çalışıyor olmasıdır. Hibridizasyon için su banyosunun kullanıldığı, fill-in yapılmayan örneklerde de, az da olsa spesifik olmayan bantlar görüldüğü ve bu yöntem daha fazla zaman gerektirdiği için, bundan sonraki hibridizasyonların PCR cihazında yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.7. Başlangıç RNA kütüphanesi M: RiboRuler (High Range) RNA marker; 1, 2, 3, 4, nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1 (1:1000 sulandırma); 5, 6, 7, 8 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2

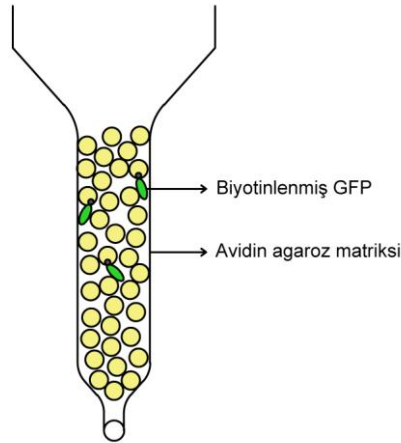
Yukarıda anlatıldığı şekilde optimize edilen in vitro transkripsiyon reaksiyonu ile rastgele ssDNA kalıp moleküllerinden başlangıç RNA kütüphanesi sentezlenmiştir (Şekil 4.7). İn vitro transkripsiyon, tek zincirli rastgele DNA kalıp moleküllerinin T7 promotor primeri ile PCR cihazında hibridizasyonu sonrasında, 37°C'de 4 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Farklı tüplerde paralel olarak gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon ürünü olan RNA kütüphaneleri kendi aralarında birleştirilerek,

RNA Clean & Concentrator™-25 RNA pürifikasyon kiti ile pürifiye edilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen su içerisinde toplanmıştır. Böylece RNA kütüphanesinin yoğunluğu artırılmış ve transkripsiyon reaksiyon bileşenlerinden arındırılmış olmaktadır.

## 4.2. SELEX

### 4.2.1. RNA Kütüphanesinin Hedef Molekül ile İnkübasyonu

Öncelikle hazırlanan avidin agaroz matrikse biyotinlenmiş GFP moleküllerinin bağlanması sağlanmıştır (Şekil 4.8.). Her iki kütüphane için kullanılmak üzere iki ayrı kolon hazırlanmıştır. Pürifikasyondan sonra elde edilen, in vitro transkripsiyon ürünü olan, RNA kütüphaneleri 1X DEPC-PBS (pH:7,4) çözeltisi ile 10 kat sulandırılmıştır. Daha sonra oluşturulan RNA kütüphaneleri, biyotinlenmiş GFP moleküllerinin bağlı olduğu avidin agaroz kolona alındıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.



Şekil 4.8. GFP moleküllerinin avidin agaroz kolona bağlanmasının şematik gösterimi

### 4.2.2. Hedef Moleküle Bağlanan RNA Moleküllerinin Seleksiyonu

Hedef moleküle bağlanan aptamer moleküllerinin seçilmesi ve bağlanmayan moleküllerin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla ticari olarak satılan bir biyotinyasyon kiti kullanılmıştır. Literatürde bu kitin, protein moleküllerinin biyotinyasyonu ve daha sonra geri kazanılması amacıyla kullanıldığı çeşitli

çalışmalar mevcuttur. Ancak daha önce SELEX prosedüründe kullanımına rastlanmamıştır. Her ne kadar SELEX prosedürünün seleksiyon basamağının afinite kolonlarıyla gerçekleştirildiği mevcut çalışmalarda da benzer prensipler kullanılmış olsa da, seleksiyon basamağında biyotinilasyon kitinin kullanılması yöntemi oldukça hızlı, güvenilir ve basit bir hale getirmiştir. Bu sayede çalışma grubumuz için ileriki SELEX çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir yöntem tanımlanmış olmaktadır. Bunun yanında, kullanılan kit herhangi bir protein molekülünün biyotinilasyonuna olanak sağladığı için, geliştirilen yöntem her molekül için uygulanabilir hale gelmektedir.

Hedef molekül olarak seçilen GFP, daha önce de bahsedildiği gibi oldukça kompakt bir yapıya sahiptir. Bu sayede GFP pek çok alanda yaygın olarak uygulama alanı bulmuştur. Dolayısıyla, bu proteinin yapısına biyotin eklenmesi molekülün aktivitesini etkilememektedir. Aptamer moleküllerinin bağlanabileceği aktif bir alanın biyotin tarafından kapatılması, GFP yapısına biyotin eklenmesinin SELEX prosedürü açısından getireceği tek dezavantaj olarak görülmektedir. Ancak, hedef molekülün immobilize edilerek gerçekleştirildiği SELEX çalışmalarında seleksiyonun görece daha başarılı olduğu görülmektedir. Bu sebeple, bu dezavantaj göz ardı edilerek seleksiyon basamağı bu şekilde gerçekleştirilmiştir.

Seleksiyon basamağında ilk olarak inkübasyon sonucu bağlanmayan oligonükleotidler basit bir santrifüj basamağıyla kolondan ayrılmıştır. Daha sonra bağlanan aptamer moleküllerinin hedef molekülden ayrılarak toplanmasını sağlamak amacıyla denatüre edici bir toplama tamponu (8 M urea and 5 mM EDTA) kullanılmıştır. Bu sayede aptamer moleküllerinin ikincil yapıları bozulmuş ve hedef moleküllerinden ayrılmıştır. Toplanan aptamer molekülleri, Sephadex-G25 kolon ile denatüre edici toplama tamponundan ayrılarak 2 ml nükleaz içermeyen su içerisinde tekrar toplanmıştır. Elde edilen hedef moleküle bağlanan diziler fenol/kloroform yöntemiyle saflaştırılarak bir sonraki döngüde kullanılmak üzere ters transkripsiyon ve PCR basamaklarına alınmıştır. Her basamakta yıkama amacıyla kullanılan PBS (pH:7.4), RNA moleküllerinin degradasyonunun önlenmesi amacıyla DEPC-su ile hazırlanmıştır.

Maddi imkanlar sebebiyle temin edilebilen GFP molekülü miktarının her döngüde yeni kolon oluşturmaya elverişli olmaması sebebiyle, hazırlanan GFP'li avidin agaroz kolonlar yıkanarak, bir sonraki döngüde tekrar kullanılmıştır. Son SELEX döngüsü de gerçekleştirildikten sonra GFP molekülleri kitin içerisinde bulunan 50mM DTT içeren PBS ile 1 saat karıştırılarak inkübe edildikten sonra, avidin agaroz matriksinden geri toplanmıştır. Bu işlem sonucunda biyotinyasyon ajanının içerdiği disülfid bağları kırılmış ve serbest sülfidril grupları içeren protein molekülleri tekrar kazanılmıştır. Bu işlemin sadece son döngüde yapılması sayesinde, biyotinin GFP'ye bağlandığı noktada yeni sülfidril grubunun oluşması SELEX prosedürünü etkilememiştir.

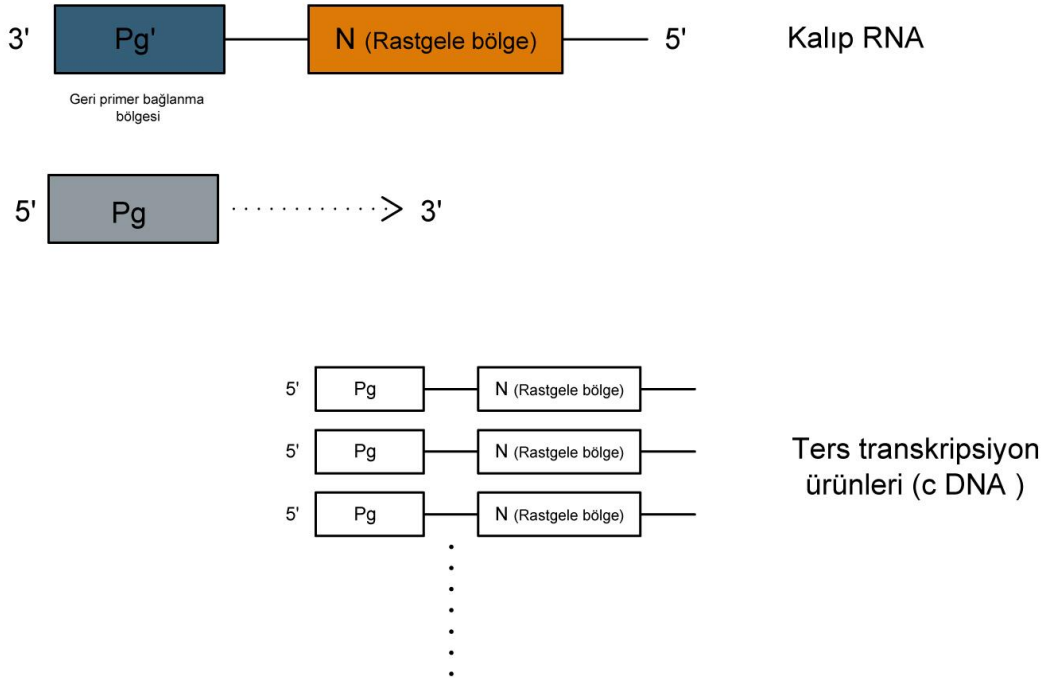
Hedef moleküle bağlanan aptamer moleküllerinin seçiminden sonra spektrofotometrik olarak kalite tayini yapmak oldukça zor olmuştur. Çünkü toplanan miktar oldukça küçüktür. Bu nedenle, bu aşamada geri kazanılan aptamer molekülleri ancak RT-PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jelde görülebilmektedir. Jelde kalite tayini yapılabildiğinden her döngüde RT-PCR ürünlerinin spektrofotometrik analizi yapılmamıştır. Sadece son olarak gerçekleştirilen döngüde spektrofotometrik ölçüm alınmıştır.

#### **4.2.3. RNA Kütüphanesinin Zenginleştirilmesi**

Seleksiyon basamağından sonra, toplanan RNA moleküllerinin konsantrasyonlarını artırabilmek amacıyla fenol/kloroform yöntemiyle pürifikasyon yapılmıştır. Pürifiye edilen RNA molekülleri ile başlangıç RNA miktarı ~1 µg olacak şekilde ters transkripsiyon reaksiyonu ve hemen ardından PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece RNA moleküllerinin öncelikle komplementer DNA (cDNA) dizisi sentezlenmiş, daha sonra çift zincirli DNA olarak sentezlenmiştir.

Transkripsiyondan sonra, sentezlenen RNA molekülleri T7 promotor dizisini içermemektedirler. Dolayısıyla, seleksiyondan sonra toplanan, hedef moleküle bağlanan RNA molekülleri T7 promotor dizisini içermemektedir. RNA moleküllerinin bir sonraki SELEX döngüsünde başlangıç kütüphanesi olarak kullanılabilmesi için çoğaltılması gerekmektedir.

## TERS TRANSKRİPSİYON

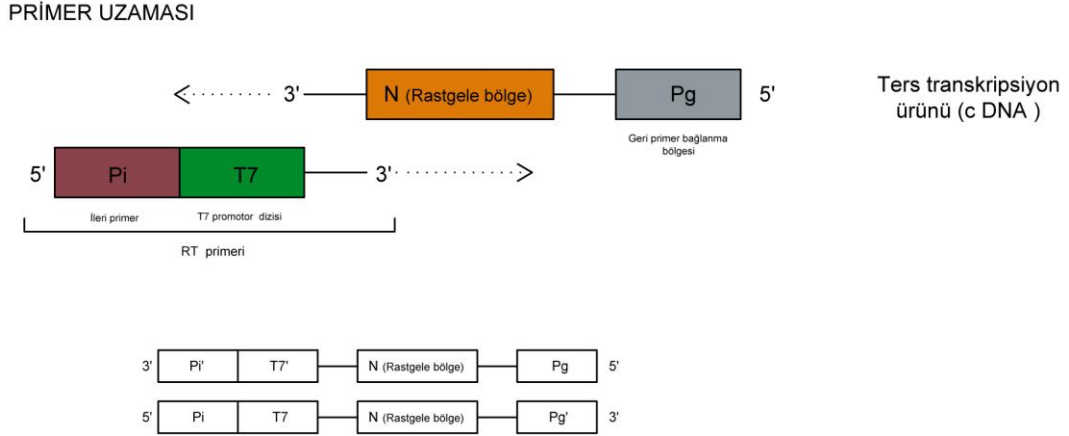


Şekil 4.9. Ters transkripsiyon reaksiyonunun şematik gösterimi

Bu amaçla RNA molekülleri öncelikle ters-transkripsiyon ile DNA komplementlerine sentezlenmiş (cDNA), primer uzaması ile T7 promotor dizisi eklenmiş ardından PCR ile çoğaltılmıştır. Öncelikle transkripsiyon ürünü olan RNA molekülleri ile ters transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. Son konsantrasyonu 5 pmol/µl olacak şekilde geri primer (100 pmol/µl) ve 1 µg RNA son hacim 12 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su içerisinde 94°C'de 3 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Daha sonra hemen buza alınan örnekler üzerine 5X Reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl -pH 8.3-, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 20u RiboLock RNase Inhibitor (40u/µl), 1 mM dNTP karışımı (10mM), 200u RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase eklenerek (200 u/µl) 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek; hibridizasyon, cDNA sentezi, enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon sonucu oluşan ürünler hem RNA hem DNA moleküllerini içermektedir. Ortamdaki RNA moleküllerinin PCR etkinliğini düşürmemesi veya reaksiyonu etkilememesi için ürünler, yukarıda detaylı olarak anlatıldığı şekilde RNaz H ile muamele edilmiştir. Daha sonra T7 promotor dizisinin komplementlerini içermeyen cDNA moleküllerine dizinin tekrar eklenmesi

amacıyla, 5' ucunda fazladan T7 promotor dizisi içeren RT-primer ile cDNA molekülleri hibridize edilmiş, ardından dizi uzaması gerçekleştirilmiştir.

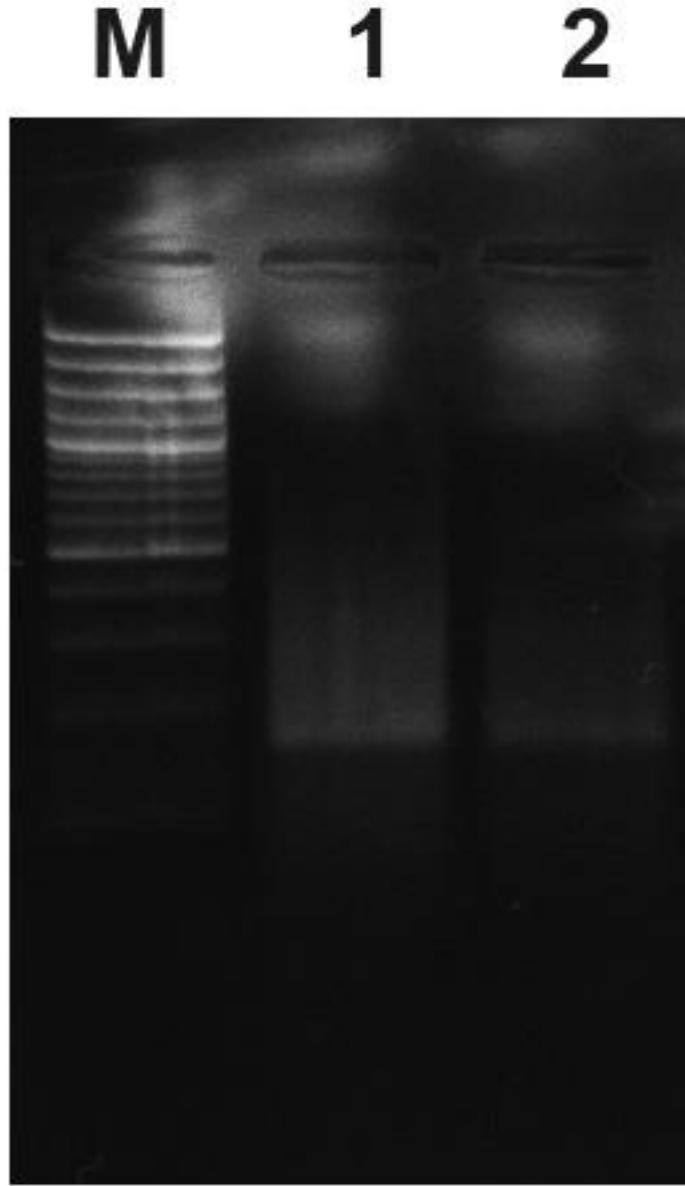
Dizi uzaması yapıldıktan sonra ileri ve geri primerler ile PCR gerçekleştirilmiştir. Ters- transkripsiyon reaksiyonunun etkinliği ancak daha sonra gerçekleştirilen PCR ile test edilebilmektedir.



Şekil 4.10. Ters transkripsiyon reaksiyonundan sonra gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonunun şematik gösterimi.

Ters-transkripsiyon PCR ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Bunun için 2 µl 6X DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA), 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yükleme karışımları hazırlanmıştır. Marker olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Şekil 3.4.) kullanılmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.11.'de ters-transkripsiyon PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı görülmektedir. Yukarıda anlatılan reaksiyon ilk seleksiyon döngüsünden sonra gerçekleştirilmiştir. Jeldeki bantla boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. Marker bantlarına göre PCR ürünlerinin boyutları değerlendirildiğinde bantların 200bp bandının biraz aşağısındaki bölgede bulunduğu, dolayısıyla PCR ile doğru olarak amplifikasyonun gerçekleştirilmiş olduğu görülmektedir. Bantların yoğunluğunun düşük olması ise gerçekleştirilen reaksiyonun seleksiyon döngüsünden sonra seçilen oligonükleotidlerle yapılmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.11. Ters-transkripsiyon PCR ürünleri. M: 50 bp DNA marker; 1 nolu kuyu: RNA kütüphanesi\_1 ; 2 nolu kuyu: RNA kütüphanesi\_2

Yani başlangıçta kullanılan kalıp oligonükleotid miktarı seleksiyon basamağından sonra sadece seçilmiş oligonükleotidleri içerdiği için başlangıç kütüphanesinin amplifikasyonuna göre daha az olmuştur.

Ters-transkripsiyon PCR ürünlerinden in vitro transkripsiyon ile bir sonraki SELEX döngüsünün başlangıç kütüphanesini oluşturacak RNA molekülleri sentezlenmiştir. PCR ürünleri ile transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirilirken aynı zamanda daha

sonraki basamaklarda başlangıçta kullanılacak uygun kalıp PCR ürünü miktarını belirlemek amacıyla bir optimizasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Kalıp PCR ürünü miktarı optimizasyon deney koşulları Çizelge 4.4.'de belirtilmektedir.

Çizelge 4.4. In vitro transkripsiyon için gerekli kalıp PCR ürünü miktarı optimizasyonu

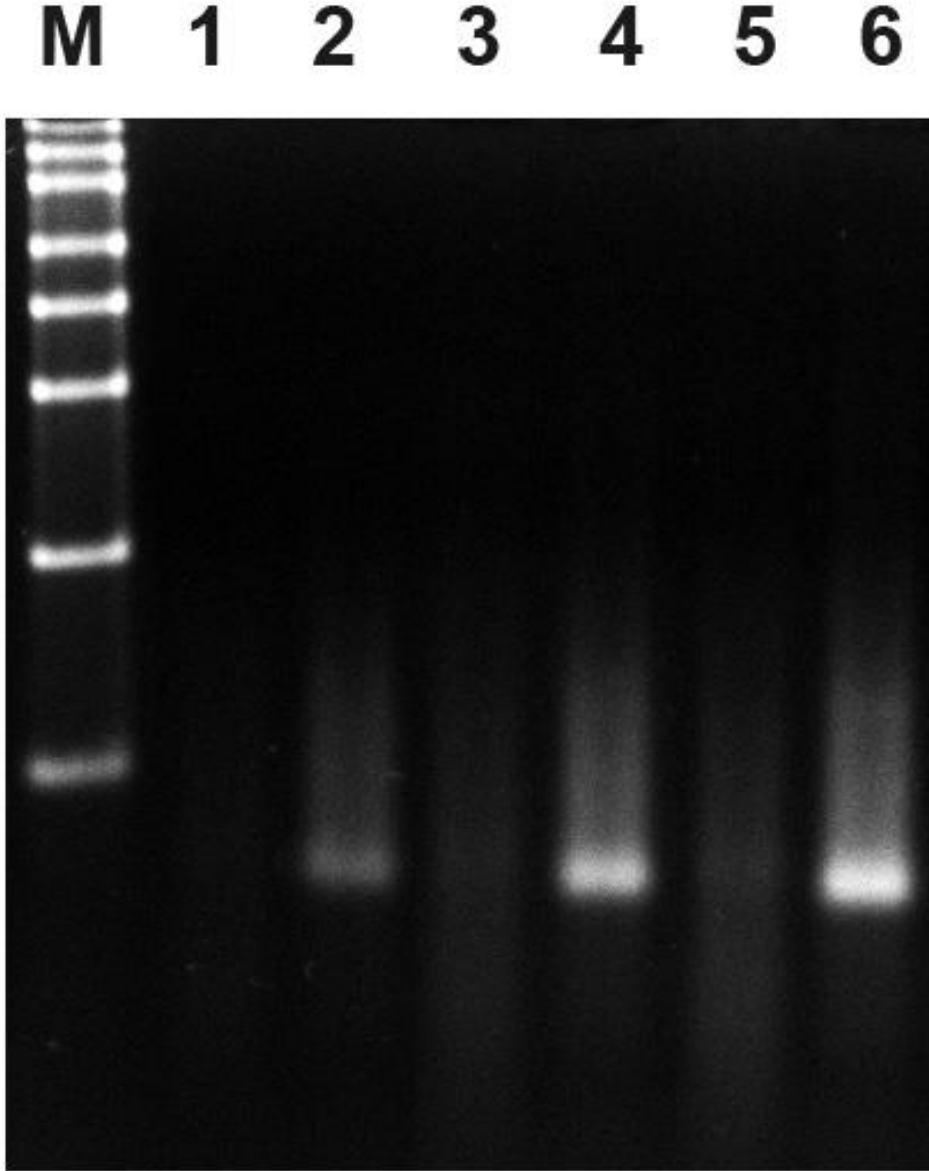
Miktar	Kalıp PCR ürünü
2,5 µl	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_2
5 µl	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_2
7,5 µl	RNA kütüphanesi_1 RNA kütüphanesi_2

PCR ürünlerinden transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirilirken, PCR ürünleri T7 promotor dizisini içerdiği için, promotor primeri ile hibridizasyon işleminin yapılması gerekmemektedir. Farklı miktarlardaki PCR ürünleri ile in vitro transkripsiyon, 5X Reaksiyon tamponu (200 mM Tris-HCl -pH 7.9, 25°C-, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM spermidine), 2 mM NTP karışımı (10mM), 30u T7 RNA Polymerase ve 50u RiboLock RNase Inhibitor ve nükleaz içermeyen su içerisinde son hacim 50 µl olacak şekilde 37°C'de 4 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon transkripsiyon ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %2,5'lik agaroz jele denatüre edilerek yüklenmiştir. Bunun için 4 µl 2X RNA Loading Dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% ethidium bromide, 0.5 mM EDTA), 4 µl transkripsiyon ürünü ile karıştırılmıştır. Örnek karışımları ve 4 µl kullanıma hazır RiboRuler RNA Ladder (High Range) (Şekil 3.5.) 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüpler hemen sonra buz üzerine alınarak denatüre edilmiş yapıların korunması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.12.'de farklı miktarlardaki ters-transkripsiyon PCR ürünleri ile gerçekleştirilen in vitro transkripsiyon reaksiyonu ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı görülmektedir. Bantların boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirme yapılmıştır. Buna göre RNA kütüphanesi\_1 transkriptlerinin 200 bp bandının biraz aşağısındaki bölgede olduğu ve doğru olarak sentezlendiği görülmektedir. Bununla birlikte ilk seleksiyon basamağından sonra RT-PCR ile elde edilen ve bir sonraki döngü için in vitro transkripsiyona sokulan RNA kütüphanesi\_2'de in vitro



transkripsiyon oldukça başarısız olmuş, hiç bir reaksiyonda anlamlı bir bant görülmemiştir.



Şekil 4.12. Kalıp olarak RT-PCR ürünlerinin kullanıldığı in vitro transkripsiyon optimizasyonu. M: RiboRuler (High Range) RNA marker; 1, 3, 5 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1; 2, 4, 6 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_2

Bu sebeple, RNA kütüphanesi\_2 için ilk seleksiyon basamağından sonra ikinci SELEX döngüsü gerçekleştirilememiştir. RNA kütüphanesi\_1 transkriptlerinin bant yoğunlukları karşılaştırıldığında ise en fazla transkripsiyonun 7,5 µl kalıp PCR

ürünü kullanılan reaksiyonda gerçekleştiği görülmektedir. Bu sebeple, bundan sonra gerçekleştirilecek in vitro transkripsiyon reaksiyonlarında 7,5 µl kalıp PCR ürünü kullanılmasına karar verilmiştir.

#### **4.2.4. SELEX Döngülerinin Tekrarlanması**

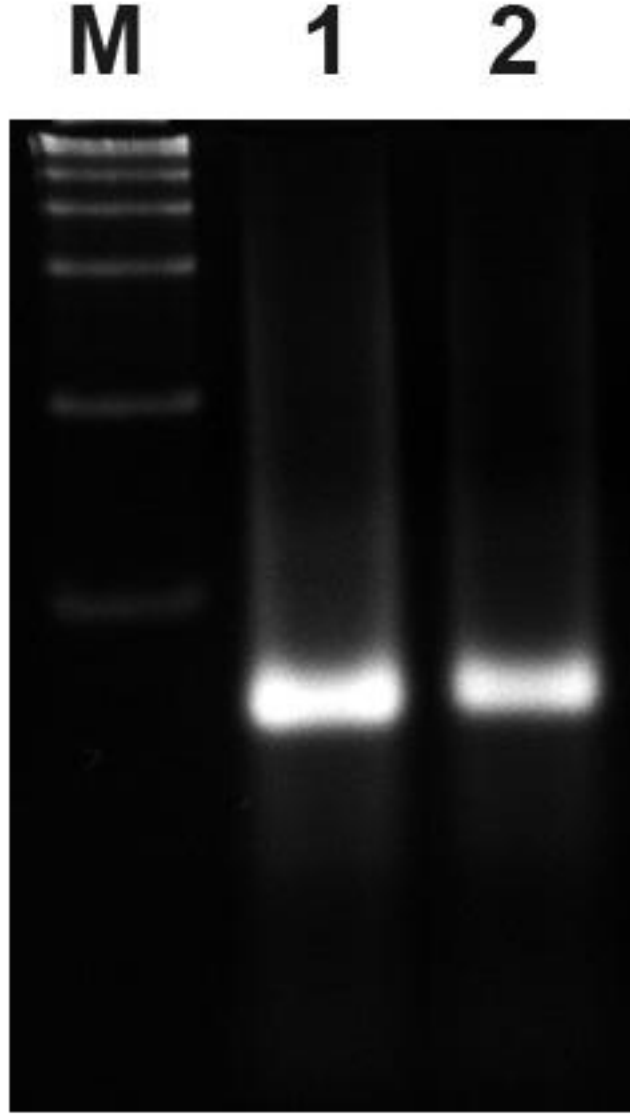
Tekrarlanması gereken SELEX döngü sayısına, her döngüde uygulanan koşulların şiddetine ve hedef molekül ile aptamer molekülleri arasındaki etkileşimin afinitesine bağlı olarak karar verilmektedir. Hedef moleküle yüksek afiniteyle bağlanan aptamer moleküllerinin populasyon üzerinde baskınlık kurabilmesi için genellikle 8-15 döngünün yeterli olduğu belirtilmektedir (Tombelli et al., 2005). Yapılan çalışmada maddi imkanlar ve süre çok döngülü bir SELEX prosedürünün uygulanması önünde engel oluşturmuştur. Aynı zamanda, SELEX prosedürünün daha az döngüyle gerçekleştirilmesi, prosedürün daha hızlı olmasını sağlayacaktır. Bu da ileriki uygulamalar için tercih edilen bir parametredir. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında literatürde yeterli olacağı söylenen minimum SELEX döngüsü sayısının gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Çalışma süresince sekiz SELEX döngüsü gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.5. Son SELEX Döngüsü**

Her SELEX döngüsünde olduğu gibi, bir önceki döngü sonunda elde edilen RNA moleküllerinin RT-PCR ürünleri ile transkripsiyon yapılarak son SELEX döngüsünün başlangıç RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Ancak bu aşamada kalıp moleküllerin gittikçe azalması beklendiği için ve bir sonraki aşamada DNA dizi analizi gerçekleştirileceği için son döngüdeki in vitro transkripsiyon TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit ile gerçekleştirilmiştir.

In vitro transkripsiyon ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %2,5'lik agaroz jele denatüre edilerek yüklenmiştir. Bunun için 4 µl 2X RNA Loading Dye (95% formamide, 0.025% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% ethidium bromide, 0.5 mM EDTA), 4 µl transkripsiyon ürünü ile karıştırılmıştır. Örnek karışımları ve 4 µl kullanıma hazır RiboRuler RNA Ladder (High Range) (Şekil 3.5.) 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüpler hemen sonra buz üzerine alınarak denatüre edilmiş yapıların

korunması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen in vitro transkripsiyon ürünleri Şekil 4.13.'de görülmektedir.



Şekil 4.13. Son SELEX döngüsü in vitro transkripsiyon ürünleri. M: RiboRuler (High Range) RNA marker; 1 ve 2 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1

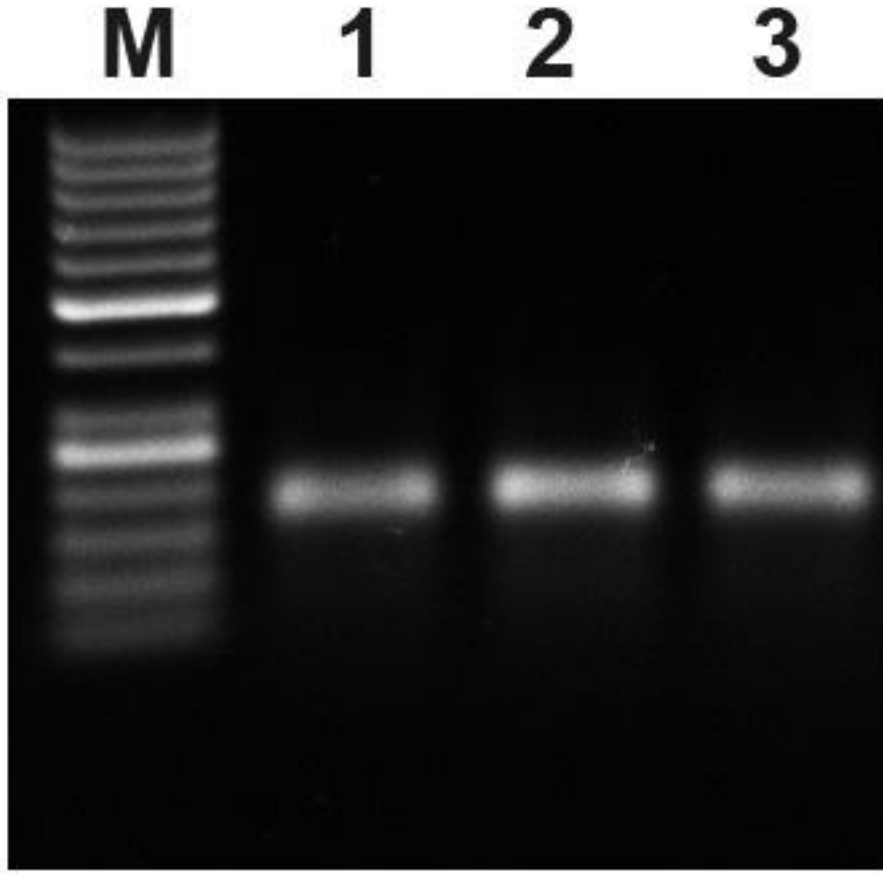
Şekil 4.13.'de son SELEX döngüsü için in vitro transkripsiyon ile elde edilen başlangıç RNA kütüphanesi ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı görülmektedir. Bantların boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirme yapılmıştır. Kütüphane transkript bantları 200b uzunluğundaki marker bandının biraz aşağısındaki bölgede doğru olarak sentezlenmiştir. Bantların yoğun olduğu görülmüş, bu

yoğunluğun TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit kullanımı nedeniyle olduğu düşünülmüştür.

Bu aşamada oluşturulan RNA kütüphanesi RNA Clean & Concentrator™-25 kit ile önceki döngülerde olduğu gibi pürifiye edilmiştir. Ancak son seleksiyon basamağına geçilmeden önce pürifiye edilen bu kütüphanenin spektrofotometrik ölçümü alınmış, konsantrasyonu 745 ng/µl, O.D.<sub>260/280</sub> değeri 2,05 ve O.D. <sub>260/230</sub> değeri 2,21 olarak kaydedilmiştir.

Daha sonra seleksiyon basamağına geçilmiş, 1:10 oranında DEPC-su ile sulandırılmış 500 µl transkripsiyon ürünü, biyotinlenmiş GFP moleküllerinin immobilize edildiği avidin agaroz kolonuna alınmış ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yukarıda detaylı olarak verilmiş protokolda anlatıldığı şekilde seleksiyon gerçekleştirilmiş, hedef moleküle bağlanan RNA molekülleri toplanmıştır. RNA molekülleri geri kazanıldıktan hemen sonra ters-transkripsiyon ve ardından PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ters-transkripsiyon yapılırken, daha sonra transkripsiyon yapılmayacağı için T7 promotor dizisinin eklenmesine gerek yoktur. Bu nedenle, RT-PCR ileri ve geri PCR primerleri ile yapılmıştır. Son SELEX döngüsünde gerçekleştirilen ters-transkripsiyon PCR ürünleri, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde %1'lik agaroz jele yüklenmiştir.

Agaroz jel elektroforezinden sonra PCR ürünleri agaroz jelden izole edilmiştir. İzolasyondan sonra ürün miktarının fazla olması amacıyla agaroz jele birkaç defa ve daha fazla hacimde örnek yüklenmiştir. Bunun için 5 µl 6X DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA), 25 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yükleme karışımları hazırlanmıştır. Marker olarak GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Şekil 3.4.) kullanılmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 4.14.'de görülmektedir. Şekilde tüm bantlar 150-200 bp arasındaki bölgede, 200bp bandına daha yakın bir konumda ve parlak olarak görülmektedir. Son SELEX döngüsünün ters-transkripsiyon PCR amplifikasyonu oldukça başarılı olmuştur.



Şekil 4.14. Son SELEX döngüsünde gerçekleştirilen ters-transkripsiyon PCR ürünleri. M: 50 bp DNA marker; 1, 2 ve 3 nolu kuyular: RNA kütüphanesi\_1

Şekil 4.14.'de görülen agaroz jeldeki bantlar jelden kesilerek, UltraClean™ GelSpin™ DNA Extraction Kit ile, yukarıda detaylı bir şekilde protokolünün anlatıldığı şekilde pürifiye edilmiştir. Daha sonra pürifiye edilen örnekler ile DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

#### **4.3. SELEX Sonucu Seçilen Aptamer Moleküllerinin DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Bu sebeple dizi analizi reaksiyonu için gerçekleştirilen doğrusal PCR, aracı firma bünyesinde yapılmıştır. Doğrusal PCR'da kullanılmak üzere ileri primer 5 pmol/µl konsantrasyonunda sulandırılarak, analizi yapılacak örneklerle birlikte aracı firmaya teslim edilmiştir. Dizi analizinde, ABI 310 DNA dizi analiz cihazı kullanılmıştır. DNA dizi analizi sonucu elde edilen sonuçlar Geneious R6 yazılımıyla analiz edilmiştir.

İlk SELEX döngüsü sonucu toplanan ve ters transkripsiyon PCR ile bir miktar amplifiye edilen ancak bunu takip eden transkripsiyon döngüsünde sentezlenemediği için ikinci SELEX döngüsüne giremeyen RNA kütüphanesi\_2 için de DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Burada sadece RT-PCR ile çoğaltılan moleküllerin RNA kütüphanesi\_2'de olması gerektiği gibi rastgele dizileri içerip içermediği kontrol edilmiştir. İlk SELEX döngüsü sonucunda toplanan RNA kütüphanesi\_2 moleküllerinin DNA dizi analizi kromatogramı Şekil 4.15. 'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi ikinci döngüye giremeyen bu RNA moleküllerinin dizileri tamamen rastgele çıkmıştır. Bu kütüphanenin daha sonraki SELEX döngülerinde kullanılamaması sebebinin başlangıç RNA kütüphanesi dizisinin tasarımından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu ise büyük olasılıkla, başlangıçta pratik sınırları aşacak büyüklükte tasarlanmış bu kütüphanedeki rastgele her molekülün, kütüphane içindeki miktarının oldukça düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

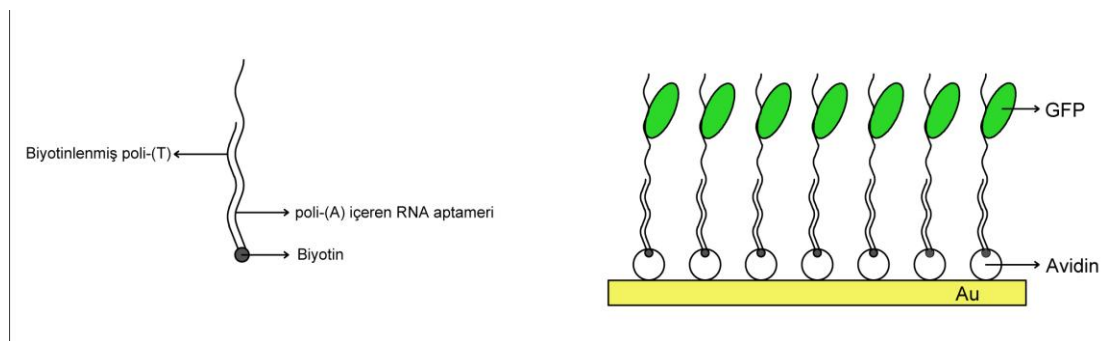
Önceden tanımlanmış bir dizinin belirli bölgelerinin kısmi olarak randomize edilmesiyle elde edilen RNA kütüphanesi\_1 ile son SELEX döngüsüne kadar çalışılmıştır. Son SELEX döngüsü sonucunda elde edilen hedef moleküle bağlanan RNA aptamer molekülleri, öncelikle DNA komplementerine sentezlenip PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen ve daha sonra agaroz jelden pürifiye edilen PCR ürünleri ile DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Analizi gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonuçları aşağıda Şekil 4.16. ve Şekil 4.17. 'de verilmiştir. Şekil 4.16'deki dizi görüntüsüne ve Şekil 4.17 'deki kromatograma bakılarak, dizilerin son SELEX döngüsüne kadar tüm in vitro basamaklardan başarıyla geçtiği ve seçildiği görülmektedir. Dizide olması gereken tüm sabit bölgelerin olması gereken konumlarda doğru dizi ile bulunduğu görülmektedir. T7 promotor dizisi de dizilerde bulunmakta fakat dizi analizi sonuçlarında görülmemektedir. Bunun nedeni, promotor dizinin primer bağlanma bölgesinde bulunmasıdır. DNA dizi analizi sonuçlarına bakılarak sabit bölgelerde cihazın üç adet bazı kalıp diziden farklı okuduğu görülmektedir. Ancak kromatograma bakıldığında bunun yalnız okuma olmadığı, sadece yazılımın yalnız bazı atamasından kaynaklandığı söylenebilmektedir. Rastgele bölgelerde ise cihaz tam olarak okuma yapamamıştır. Bu sonuçlar, sekiz SELEX döngüsü sonucunda tek bir diziyeye kadar

inilemediğini, hala seçilen moleküller arasında birbirinden farklı dizlerin bulunduğunu göstermektedir.

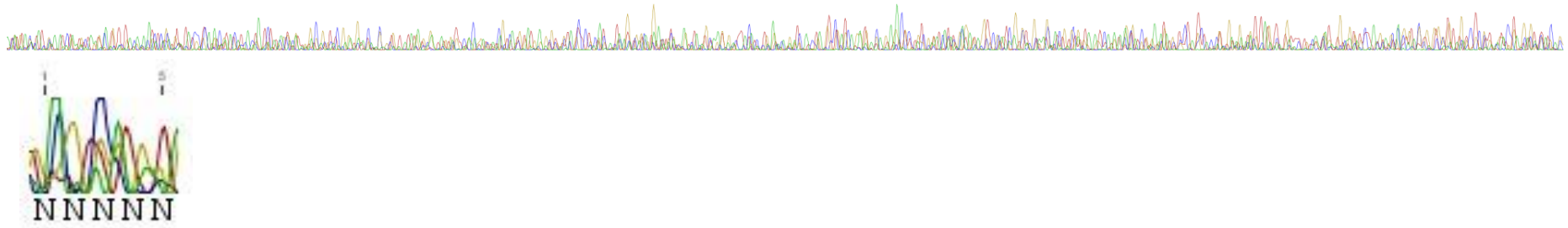
Alınan sonuçlara dayanılarak bunun bir deney başarısızlığı olmadığı açıkça söylenebilmektedir. Aksine hedef moleküle karşı daha önceden tanımlanmış dizinin varyantları oluşturulmuş ve SELEX döngüleri sonucu bazıları seçilmiştir. Ancak, tek bir dizi tanımlayabilmek için gerçekleştirilen SELEX döngüsü sayısı yetersiz kalmıştır. Hedef moleküle (GFP) bağlanan belirli bir dizi tanımlanamamıştır. Ancak, hedef moleküle bağlanan fakat dizisi tanımlanamayan, birbirinden farklı bir kaç dizinin oluşturduğu aptamer molekülleri seçilebilmiştir. Daha sonra bu moleküllerin altın yüzey üzerinde GFP ile etkileşimi gösterilmiştir.

#### 4.4. Yüzey İmmobilizasyon Çalışmaları

SELEX prosedürünün sonucunda elde edilen aptamer moleküllerinin DNA dizi analizi yapılmış ancak, SELEX döngü sayısının yetersiz kalması sebebiyle spesifik bir dizi tanımlanamamıştır. Aptamer molekülleri ile hedef molekül (GFP) arasındaki etkileşimin, biyosensör çalışmalarında model bir sistem olarak önerilebilirliğinin araştırılması için, altın yüzey üzerinde gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, altın yüzeyler üzerine tiyollenmiş avidin molekülleri immobilize edilmiştir. Daha sonra biyotinlenmiş poli-(T) dizisi ve ardından poli-(A) dizisi içeren seçilmiş aptamer dizileri yüzeye immobilize edilmiştir. Aptamer molekülleri bu şekilde yüzeye immobilize edildikten sonra hedef molekül (GFP) ile arasındaki etkileşim floresan mikroskop ile gösterilmiştir.

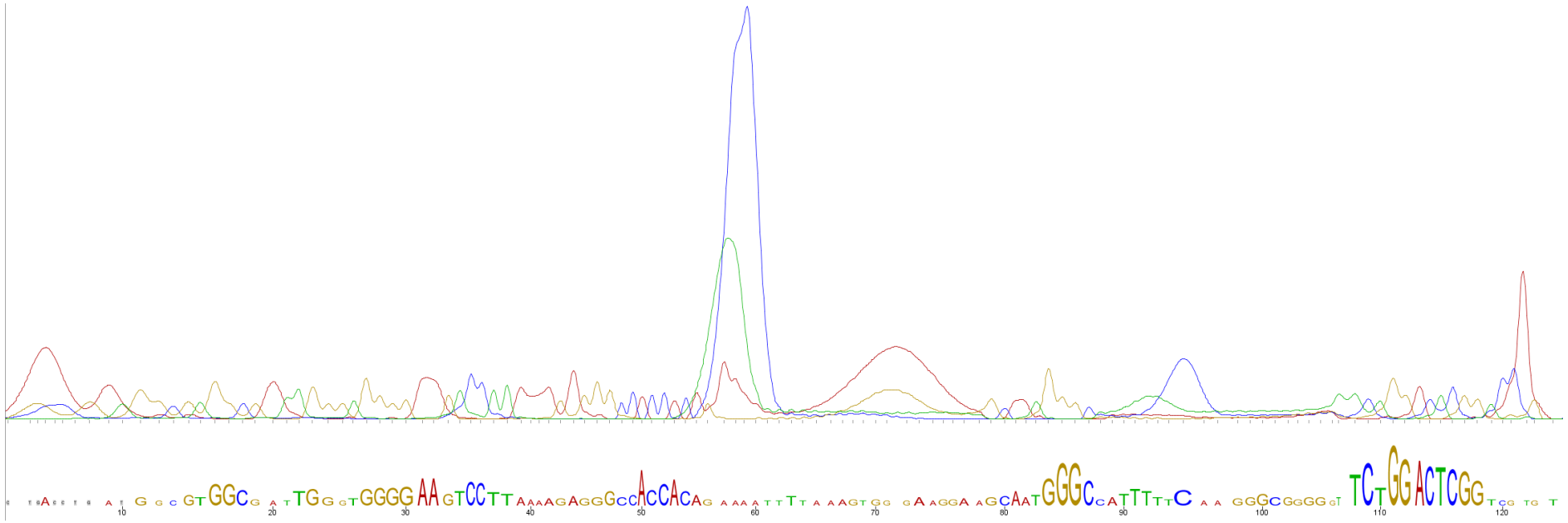


Şekil 4.18. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen yüzey immobilizasyon çalışmalarının şematik gösterimi

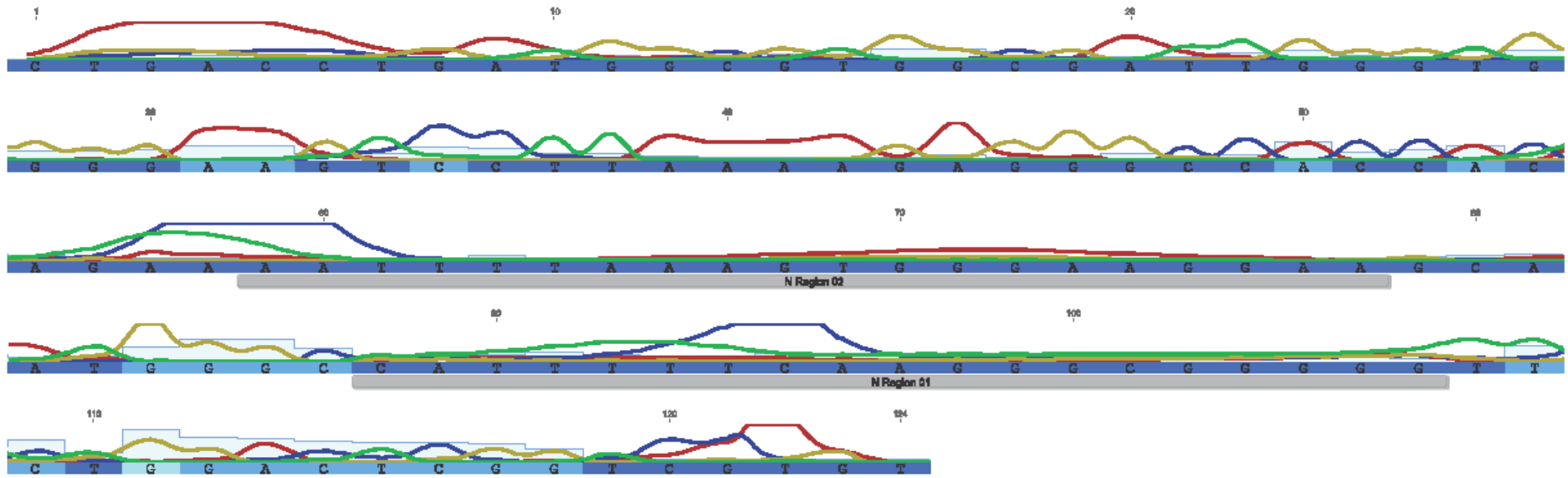


Şekil 4.15. RNA kütüphanesi\_2'den ilk SELEX döngüsü sonunda elde edilen aptamer molekülleri dizisi kromatogramı.





Şekil 4.16. RNA kütüphanesi\_1'den SELEX sonucu elde edilen aptamer molekülleri dizisi.



Şekil 4.17. RNA kütüphanesi\_1'den SELEX sonucu elde edilen aptamer molekülleri dizisi kromatogramı.

#### 4.4.1. Avidin Moleküllerinin Altın Yüzeğe İmmobilizasyonu

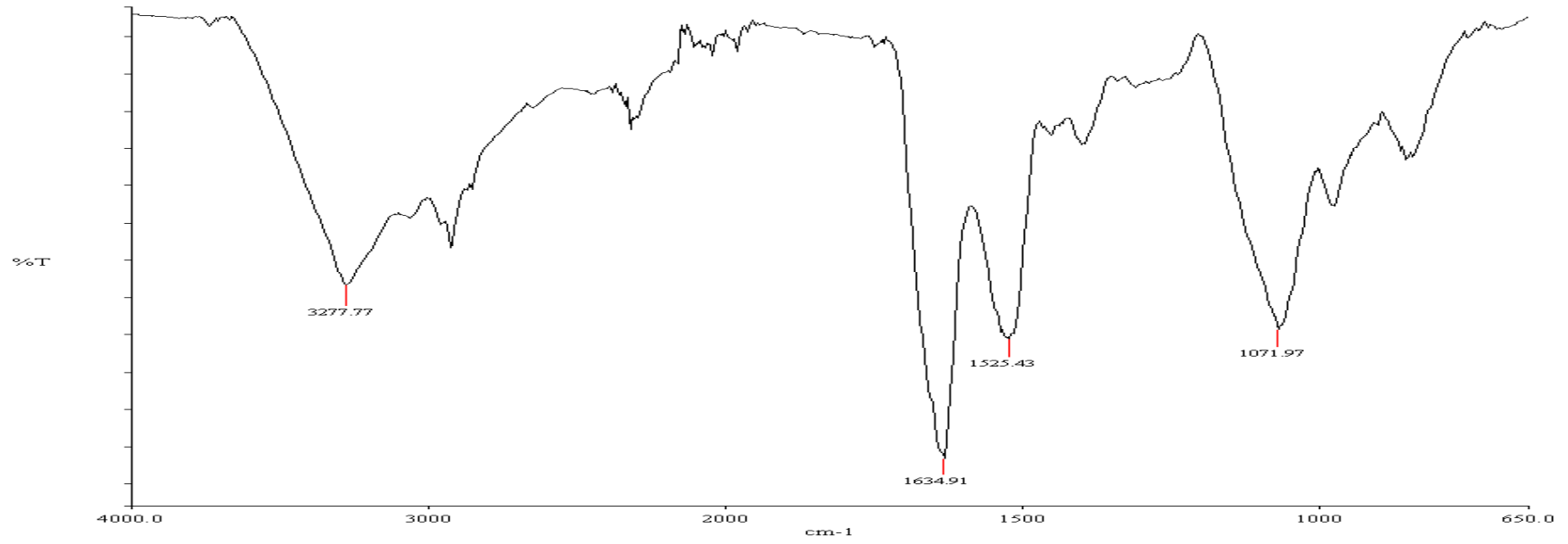
Tiyollenmiş avidin molekülleri konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde PBS (pH: 7,4) içinde çözülmüştür. Altın yüzeyler, yüzeyde var olabilecek organik kalıntıların uzaklaştırılması amacı ile saf etanol kullanılarak temizlenmiştir. Altın yüzeylerin kuruma esnasında kirlenmesi ve oksitlenmesini engellemek amacıyla, 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Altın yüzey üzerine 5 µl tiyollenmiş avidin çözeltisi damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Yüzeyler daha sonra PBS ile yıkanmış ve 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Altın yüzeye avidin moleküllerinin bağlandığının gösterilmesi amacıyla FTIR ölçümü alınmıştır.

#### 4.4.2. FTIR ile Yüzey Karakterizasyonu

Avidin immobilize edilmiş yüzeyin fark spektrumu Şekil 4.19.'de verilmiştir. Buna göre yaklaşık 3277 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki pik protein ve polipeptitlerin yapısında yer alan NH gerilme vibrasyonuna aittir. Yaklaşık 1634 ve 1525 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki iki pik proteinler için karakteristiktir. Bu pikler sırasıyla Amid I ve Amid II bantlarıdır. Amid I bandı, protein yapısındaki C=O gerilmesinin %80'ini içermektedir ve N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi vibrasyonlarını da içermektedir. Amid II bandı (1600-1500 cm<sup>-1</sup>), çoğunlukla protein yapısındaki N-H bükülme (%60) ve C-N gerilme (%40) vibrasyonlarından oluşmaktadır. Yaklaşık 1070 cm<sup>-1</sup>'deki pik ise C-C-N asimetrik gerilme vibrasyonuna aittir. Bu pikler yüzeyde protein yapısının olduğuna işaret etmektedir. FTIR-ATR sonuçlarına göre avidinin yüzeydeki varlığı doğrulanmaktadır.

#### 4.4.3. Aptamer Moleküllerinin Yüzeğe İmmobilizasyonu

SELEX prosedürüne başlamadan önce SELEX sonucunda tek bir dizi elde edilmesi ve elde edilen dizinin yüzeye immobilizasyonu için 3' ucuna poli-(A) dizisi eklenerek sipariş edilmesi planlanmıştır. Ancak, gerçekleştirilen çalışma sonucunda GFP molekülüne bağlanan tek bir dizi tanımlanamamıştır. Bununla birlikte, sekizinci SELEX döngüsü sonucunda GFP'ye bağlandığı bilinen farklı dizilerin seçimi başarılmıştır. Elde edilen moleküllerin dizisi Sanger yöntemiyle yapılan DNA dizi analizi ile tanımlanamadığı için tam olarak dizisi bilinmeyen dizilerin 3' ucuna primer uzaması yöntemiyle poli-(A) dizilerinin takılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.19. Avidin immobilize edilen altın yüzeyin FTIR fark spektrumu.

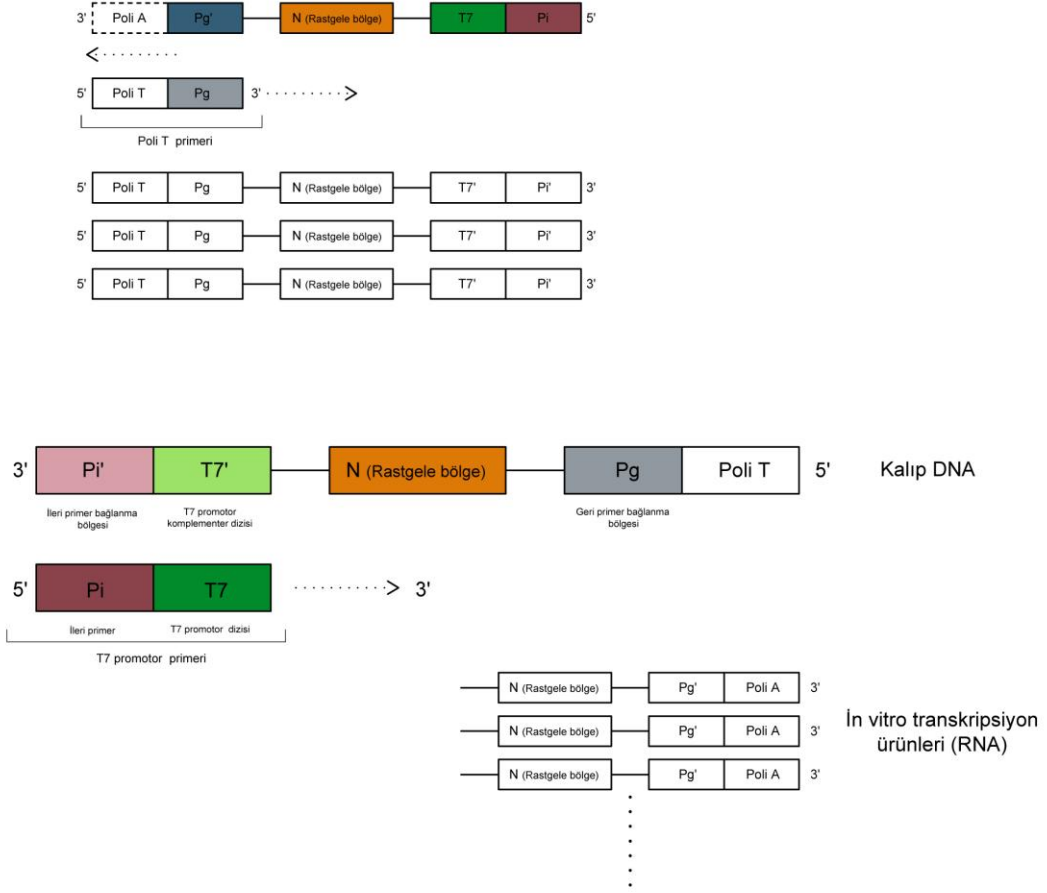
Bu amaçla yeni bir primer dizisi tasarlanarak yurt dışından temin edilmiştir (IDT, A.B.D.). Primer uzaması için kullanılacak primerin dizisi, 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACCGAGTCCAGAA-3', olarak tasarlanmıştır. Sentezlenen bu primere poli-(T) primeri adı verilmiştir. Böylece son SELEX döngüsü sonucunda elde edilen RNA moleküllerinin 3' uçlarına poli-(A) dizileri eklenmiştir.

Hedef moleküle yüksek afinite ile bağlanan, primer dizileri belirlenen aptamer dizilerinin, 3' uçlarına 20 baz uzunlukta poli-(A) dizileri eklenmiş formları, primer uzaması yöntemiyle sentezlendikten sonra, avidin immobilize edilmiş altın yüzeyler üzerine, 3' ucunda biyotin içeren 20 baz uzunluğundaki poli-(T) dizisinin 100 pmol/µl konsantrasyondaki çözeltisinden 10µl damlatılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon sonrasında yüzeyler PBS ile yıkanmış ve 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Böylece, avidin-biyotin etkileşimi ile poli-(T) dizileri yüzeye immobilize edilmiştir. Aptamer molekülleri ile gerçekleştirilen primer uzaması reaksiyonunun tamamı yüzeye damlatılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon sonrasında yüzeyler PBS ile yıkanmış ve 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Böylece, poli-(T) ve poli-(A) dizilerinin hibridizasyonu ile aptamer molekülleri yüzeye immobilize edilmiştir.

#### **4.4.4. Aptamer ile Hedef Molekül Arasındaki Etkileşimin Gösterilmesi**

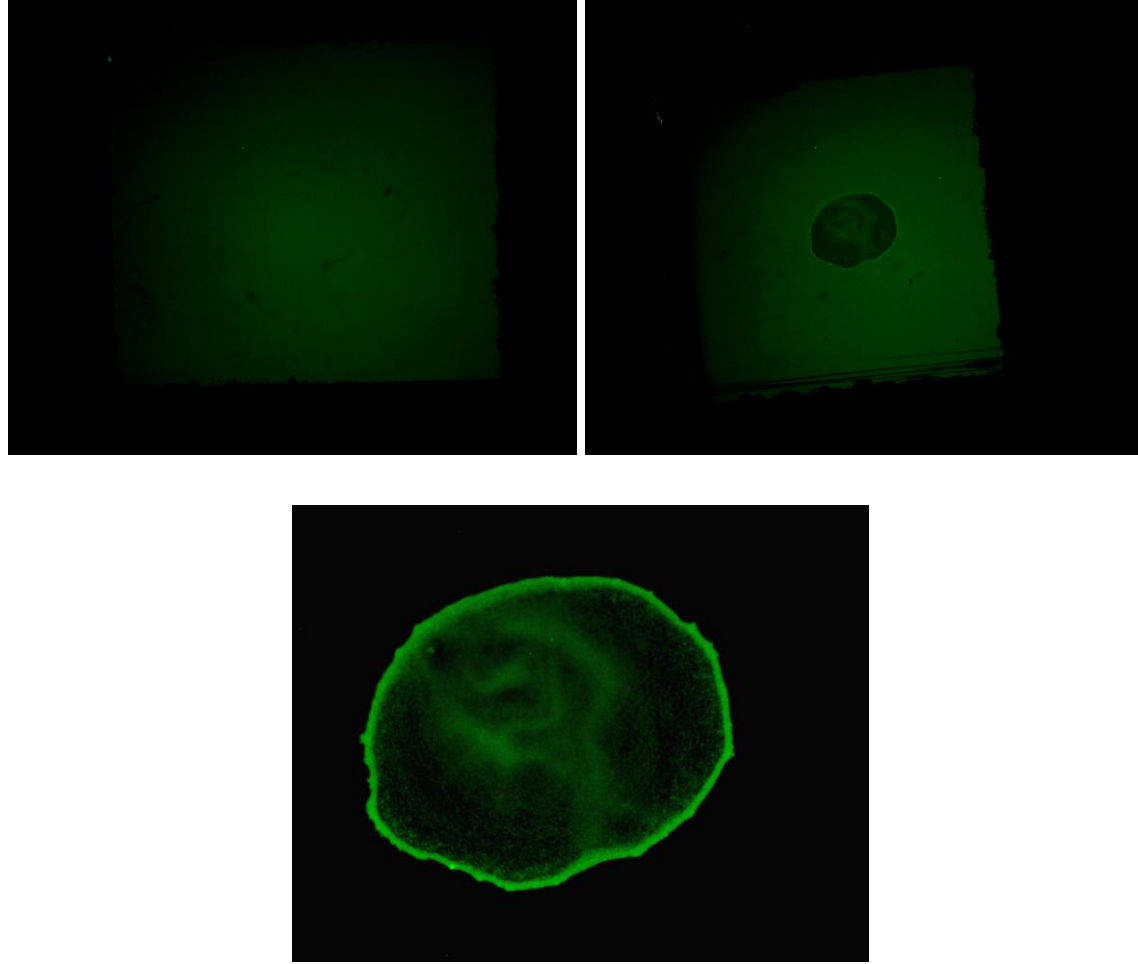
1 mg/ml konsantrasyonunda temin edilen PBS içinde çözülmüş GFP molekülleri, aptamer immobilize edilmiş altın yüzeyler üzerine 25 µl damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra DEPC-PBS (pH:7.4) içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Yüzeyler 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Altın yüzey üzerinde aptamer molekülleri ile GFP arasındaki etkileşim sonucu hedef molekül kaynaklı floresan sinyaller floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.21'de verilmiştir.

## PRİMER UZAMASI



Şekil 4.20. Son SELEX döngüsünde elde edilen aptamer moleküllerine primer uzaması reaksiyonuyla poli-(A) dizilerinin eklenmesinin şematik gösterimi.

Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi aptamer immobilize edilmiş altın yüzey üzerinde GFP molekülünden floresan sinyaller alınmıştır. Bu da yüzey üzerinde aptamer moleküllerine bağlanmış olan GFP moleküllerinin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.21. Altın yüzey üzerine immobilize edilmiş seçilen aptamer molekülleri ile hedef molekül GFP etkileşiminin floresan mikroskop görüntüleri. Boş altın yüzey (sol üst), altın yüzey üzerindeki etkileşim (1X objektif, 10 kat büyütme) (sağ üst), altın yüzey üzerindeki etkileşim (4X objektif, 40 kat büyütme) (alt).

## 5. TARTIŞMA

Pek çok farklı moleküle karşı seçilen çok sayıda aptamer molekülü bulunmasına karşın, aptamer tabanlı analitik uygulamalar üzerinde yapılan çalışmalar sadece birkaç aptamer etrafında yoğunlaşmaktadır (Yin, 2012). Bunlar arasından ise kullanımı en çok tercih edilen trombin aptameri olmuştur (Baird, 2010). Biyolojik tanıma tabanlı analitik uygulamalarda bugüne kadar oldukça iyi tanımlanmış model aptamer sistemlerinin kullanımı, uygulamaların validasyonu açısından araştırmacılara kolaylık sağlamaktadır. Ancak, biyolojik tanıma tabanlı analitik uygulamalarda, bu amaçla daha hızlı, kolay ve yaygın olarak kullanılabilir yeni model aptamer sistemlerinin tanımlanması gerekmektedir. Bu doğrultuda, uygulamada oldukça kolay ve hassas olan floresan tabanlı optik biyosensör uygulamalarında, model bir sistem olarak kullanılabilir bir hedef molekül-aptamer kompleksinin tanımlanması için, yeşil floresan proteine (GFP) karşı SELEX yöntemi ile aptamer üretilmesi ve bu aptamer moleküllerinin optik tanıma tabanlı biyosensör sistemlerine uygulanabilirliğinin araştırılmasını hedef alan bu çalışmada elde edilen kazanımlar aşağıda özetlenmiştir.

GFP'ye karşı geliştirilecek aptamer moleküllerinin SELEX prosedürü ile seçilmesi için ilk olarak başlangıç RNA kütüphaneleri tasarlanmıştır. Bu amaçla kullanılacak oligonükleotid kütüphaneleri tasarlanırken rastgele ve sabit bölgelerin oluşturulması üzerine çalışılmıştır. Bunun için yapılan literatür araştırması sonucu daha önceden tanımlanmış (Mallik et al., 2010) olan GFP aptamer dizisi baz alınarak GFP'ye bağlanmada aktif olmayan stem bölgeleri arasına rastgele diziler yerleştirilerek, kısmi olarak randomize edilmiş yeni bir oligonükleotid kütüphanesi oluşturulmuştur. Böylece tanımlanan diziden köken alan, daha fonksiyonel ikinci bir dizinin tanımlanması amaçlanmıştır. Bunun yanında, daha önceden tanımlanmış diziyile karşılaştırılmak üzere tamamen rastgele ikinci bir oligonükleotid kütüphanesi oluşturulmuştur.

Kalıp DNA moleküllerinin istenilen miktarda ve düşük bir maliyetle çoğaltılması amacıyla başlangıç RNA kütüphanesinin kalıp molekülleri olan tek zincirli DNA (ssDNA) molekülleri ilk olarak, PCR ile amplifiye edilmiştir. Maliyeti düşürmek amacıyla gerçekleştirilen bu basamak, literatürde hasara uğramış ve PCR ile çoğaltılamayacak ssDNA sentez ürünlerini elimine edebilmek amacıyla da tercih



edilmektedir (Marshall and Ellington, 2000). Bununla birlikte, kimyasal olarak sentezlenmiş DNA moleküllerinin polimeraz ile amplifikasyonunun farklı etkinlikte olması nedeniyle her PCR döngüsünde bazı dizilerin kaybedilebileceği varsayılmaktadır. Ancak tez çalışmasında kullanılan başlangıç RNA kütüphanesini oluşturan ssDNA dizilerinin rastgele bölge uzunluklarının pratik sınırları aşması sebebiyle, pratikte bu dizilerin bir kısmının SELEX döngüsüne başlamadan kaybedilmesi anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır. PCR’da kullanılan enzimin deoksiniükleotidil transferaz aktivitesi sebebiyle ssDNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler, T7 promotor dizisinin dışında kaldığı için elimine edilmiştir.

PCR ile amplifikasyondan önce ssDNA molekülleri, “fill-in” reaksiyonu ile çift zincirli hale getirilerek iki adet primer bağlanma bölgesi oluşturulmuştur. PCR ve in vitro transkripsiyon reaksiyonlarının etkinliğinin artırılması ve reaksiyon koşullarının test edilmesi amacıyla optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde, transkripsiyon reaksiyonunun hassasiyetini ve ürün kalitesini artırmak amacıyla, transkripsiyondan önce de “fill-in” reaksiyonu yapılması önerilmektedir (Liu et al., 2008). Ancak hibridizasyondan sonra fill-in yapılan tüm örneklerde silik ve spesifik olmayan bantlar görülmüştür. Fill-in yapılmayan örneklerde ise transkripsiyon daha etkin olarak gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, kalıp DNA molekülünün boyutunun kısa olması, ikincil yapısının enzimin aktivitesini engellememesi ve enzimin optimizasyon koşullarında yüksek aktiviteyle çalışıyor olmasıdır.

Gerekli optimizasyonlar yapıldıktan ve parametreler belirlendikten sonra, SELEX prosedürü için gerekli başlangıç RNA kütüphanesi in vitro transkripsiyon ile oluşturulmuştur. Daha sonra SELEX prosedürü gerçekleştirilmiş ve döngüler tekrar edilmiştir.

in vitro seçim prosedürünün oldukça önemli seleksiyon basamağında hedef moleküle bağlanan aptamer moleküllerinin seçilmesi ve bağlanmayan moleküllerin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla ticari olarak satılan bir biyotininilasyon kiti kullanılmıştır. Literatürde bu kitin, protein moleküllerinin biyotinlenmesi ve daha sonra geri kazanılması amacıyla kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (Aulisa et al., 1998). Ancak daha önce SELEX prosedüründe kullanımına rastlanmamıştır. Her ne kadar SELEX prosedürünün seleksiyon basamağının afinite kolonlarıyla gerçekleştirildiği mevcut çalışmalarda da benzer prensipler kullanılmış olsa da

(Gopinath, 2007) seleksiyon basamağında biyotinitilasyon kitinin kullanılması, yöntemi oldukça hızlı, güvenilir ve basit bir hale getirmiştir. Bu sayede çalışma grubumuz için ileriki SELEX çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir yöntem tanımlanmış olmaktadır. Bunun yanında, kullanılan kit herhangi bir protein molekülünün biyotinitilasyonuna olanak sağladığı için, geliştirilen yöntem her protein molekülü için uygulanabilir hale gelmektedir.

Hedef molekül olarak seçilen GFP, daha önce de bahsedildiği gibi oldukça kompakt bir yapıya sahiptir. Bu sayede GFP pek çok alanda yaygın olarak uygulama alanı bulmuştur. Dolayısıyla, bu proteinin yapısına biyotin eklenmesi molekülün aktivitesini etkilememektedir. Aptamer moleküllerinin bağlanabileceği aktif bir alanın biyotin tarafından kapatılması, GFP yapısına biyotin eklenmesinin SELEX prosedürü açısından getireceği tek dezavantaj olarak görülmektedir. Ancak, hedef molekülün immobilize edilerek gerçekleştirildiği SELEX çalışmalarında seleksiyonun görece daha başarılı olduğu görülmektedir (Gopinath, 2007). Bu sebeple, bu dezavantaj göz ardı edilerek seleksiyon basamağı bu şekilde gerçekleştirilmiştir.

Son SELEX döngüsü gerçekleştirildikten sonra, biyotinitilasyon ajanının içerdiği disülfid bağları kırılarak serbest sülfidril grupları içeren protein molekülleri avidin agaroz matriksinden tekrar kazanılmıştır. Bu işlemin sadece son döngüde yapılması sayesinde, biyotinin GFP'ye bağlandığı noktada yeni sülfidril grubunun oluşması SELEX prosedürünü etkilememiştir.

Bir sonraki SELEX döngüsünde başlangıç kütüphanesi olarak kullanılacak RNA molekülleri çoğaltılmıştır. Bu amaçla RNA moleküllerinin öncelikle ters-transkripsiyon ile DNA komplementeri sentezlenmiş (cDNA), primer uzaması ile T7 promotor dizisi eklenmiş, ardından PCR ile çoğaltılmıştır.

İlk seleksiyon döngüsünden sonra gerçekleştirilen RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez bantları, boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirildiğinde seleksiyon sonrası geri kazanılan RNA moleküllerinin PCR ile doğru olarak, düşük yoğunlukta amplifiye olduğu görülmüştür. RNA kütüphanesi\_2'nin RNA kütüphanesi\_1'e göre çok daha az yoğunlukta amplifikasyon bandına sahip olması dikkat çekmiştir. Bunun sebebinin gerçekleştirilen reaksiyonun seleksiyon döngüsünden sonra

seçilen oligonükleotidlerle yapılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Yani başlangıçta kullanılan kalıp oligonükleotid miktarı seleksiyon basamağından sonra sadece seçilmiş oligonükleotidleri içerdiği için başlangıç kütüphanesinin amplifikasyonuna göre daha az olmuştur. Bu ürünlerin bir sonraki SELEX döngüsünde başlangıç RNA kütüphanesi olarak kullanılması için in vitro transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada RNA kütüphanesi\_1 doğru olarak sentezlenirken, RNA kütüphanesi\_2'de in vitro transkripsiyon oldukça başarısız olmuş, hiç bir reaksiyonda anlamlı bir bant görülmemiştir. Bu sebeple, RNA kütüphanesi\_2 için ilk seleksiyon basamağından sonra ikinci SELEX döngüsü gerçekleştirilememiştir.

Optimizasyonlar yapıldıktan ve gerekli parametreler belirlendikten sonra sekiz SELEX döngüsü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra SELEX sonucunda elde edilen zenginleştirilmiş aptamer moleküllerinin primer dizilerinin belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

İkinci SELEX döngüsüne giremeyen RNA kütüphanesi\_2 için de DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sadece RT-PCR ile çoğaltılan moleküllerin RNA kütüphanesi\_2'de olması gerektiği gibi rastgele dizileri içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla yapılmıştır. İkinci döngüye giremeyen bu RNA moleküllerinin dizileri tamamen rastgele çıkmıştır. Bu kütüphanenin daha sonraki SELEX döngülerinde kullanılamaması sebebinin başlangıç RNA kütüphanesi dizisinin tasarımından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu ise büyük olasılıkla, başlangıçta pratik sınırları aşacak büyüklükte tasarlanmış bu kütüphanedeki rastgele her molekülün, kütüphane içindeki miktarının oldukça düşük olmasından kaynaklanmaktadır. İkinci bir olasılık ise, bu kütüphaneyi oluşturacak kalıp ssDNA molekülleri tasarlanırken 5' ucuna sabit primer bağlanma bölgesinin yerleştirilmemesi olabilir.

Önceden tanımlanmış bir dizinin belirli bölgelerinin kısmi olarak randomize edilmesiyle elde edilen RNA kütüphanesi\_1 ile son SELEX döngüsüne kadar çalışılmıştır. Dizi görüntüsüne ve kromatograma bakılarak, dizilerin son SELEX döngüsüne kadar tüm in vitro basamaklardan başarıyla geçtiği ve seçildiği görülmüştür. Dizide olması gereken tüm sabit bölgeler, olması gereken konumlarda doğru dizi ile bulunmaktadır. T7 promotor dizisi dizilerde bulunduğu

halde dizi analizi sonuçlarında görülmemiştir. Bunun nedeni, promotor dizinin primer bağlanma bölgesinde bulunmasıdır. DNA dizi analizi sonuçlarına bakılarak sabit bölgelerde üç adet bazın kalıp diziden farklı olduğu görülmüştür. Ancak kromatograma bakıldığında bunun yalnız okuma olmadığı, sadece yazılımın yalnız baz atamasından kaynaklandığı söylenebilmektedir. Rastgele bölgelerde ise cihaz tam olarak okuma yapamamıştır. Bu sonuçlar, sekiz SELEX döngüsü sonucunda tek bir diziye kadar inilemediğini, hala seçilen moleküller arasında birbirinden farklı dizilerin bulunduğunu göstermiştir.

Alınan sonuçlara dayanılarak bunun bir deney başarısızlığı olmadığı açıkça söylenebilir. Aksine hedef moleküle karşı daha önceden tanımlanmış dizinin varyantları oluşturulmuş ve SELEX döngüleri sonucu bazıları seçilmiştir. Ancak, tek bir dizi tanımlayabilmek için gerçekleştirilen SELEX döngüsü sayısı yetersiz kalmıştır. Hedef moleküle (GFP) bağlanan belirli bir dizi tanımlanamamıştır. Ancak, hedef moleküle bağlanan fakat dizisi tanımlanamayan, birbirinden farklı bir kaç dizinin oluşturduğu aptamer molekülleri seçilebilmiştir.

Hedef molekül ile aptamer molekülleri arasındaki etkileşimin gösterilmesi amacıyla, seçilen aptamer moleküllerinin altın yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada tiyollenmiş avidin molekülleri altın-tiyol arasında kendiliğinden oluşan bağ ile altın yüzeyler üzerine immobilize edilmiştir. Avidin moleküllerinin altın yüzey üzerindeki varlığını doğrulamak amacıyla FTIR ölçümü alınmış, yaklaşık 1634 ve 1525  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda alınan iki pikin proteinler için karakteristik olan Amid I ve Amid II bantları olduğu belirlenmiştir. Böylece avidin moleküllerinin altın yüzey üzerine immobilize olduğu gösterilmiştir. Bu aşamada yüzeyde tiyol grupları oluşturulmayarak, tiyollenmiş bir proteinin kullanımı immobilizasyon prosedürünü oldukça kolay uygulanabilir hale getirmiştir.

Daha sonra biyotinlenmiş poli-(T) dizileri yüzeye immobilize edilerek, ucunda poli-(A) dizileri oluşturulmuş seçilmiş aptamer molekülleri havuzu poli-(A)-poli-(T) etkileşimi ile yüzeye immobilize edilmiştir. Son olarak, modifiye edilmiş altın yüzeylerin hedef molekül (GFP) ile inkübasyonu sonucunda, aptamer ile hedef molekülün bağlanması floresan mikroskop ile gösterilmiştir. Grubumuzda daha önce gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında yüzey üzerine damlatma yöntemi kullanıldığı için (Selvi, 2009), bu çalışmada da aynı yöntemle

immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskop fotoğraflarında, yüzeye damlatılarak uygulanmış örneklerin periferinde görülen parlak floresan ışımının yüzey geriliminden dolayı, damlanın periferinde yoğunlaşan GFP moleküllerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yüzeye immobilize edilen örneğin orta kısımlarından alınan floresan ışımaya ise aptamer molekülleri ve GFP arasındaki etkileşimi göstermek açısından başarılı olmuştur.

Bu çalışma sonucunda, SELEX prosedürünün basit laboratuvar koşullarında gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda, grubumuz için ileriki SELEX çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir yöntem tanımlanmış olmaktadır. Çalışma kapsamında seleksiyon basamağı için, bilinen en güçlü kovalent olmayan biyolojik etkileşim olan avidin-biyotin bağlanmasını (Marimuthu et al., 2012) temel alarak ticarileştirilmiş bir kitin kullanılması SELEX prosedürünü kolay uygulanabilir ve daha ucuz bir yöntem haline getirmiştir.

Bununla birlikte in vitro ortamda oligonükleotid molekülleri üzerinde pek çok manipülasyonun doğru olarak yapılabildiği gösterilmiş ve in vitro seçim teknikleri ile ilgili tecrübe kazanılmıştır. Grubumuz içerisinde ilk defa yapılan DNA dizi analizi sürecinde bazı güçlüklerle karşılaşmıştır. Karşılaşılan en büyük güçlük, SELEX sonucu seçilen aptamer moleküllerinin DNA dizi analizi sonucu spesifik bir dizinin belirlenememiş olmasıdır.

Bulgularımız literatür ile karşılaştırıldığında aynı amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda benzer güçlüklerle karşılaşıldığı görülmüştür (Stanlis and McIntosh, 2003). GFP molekülü floresan olarak kolayca tespit edilebildiği için tercih edilmiştir. Ancak çok kompakt bir yapıya sahip olması nedeniyle bu moleküle karşı aptamer geliştirilmesi oldukça zordur. Bu sebeple gerçekleştirilen sekiz SELEX döngüsü GFP molekülüne karşı aptamer seçiminde yetersiz kalmıştır. Literatürde GFP moleküllerine karşı aptamer dizilerinin geliştirildiği bir çalışmada 15 SELEX döngüsü gerçekleştirilerek başarılı sonuç alınmıştır (Shui et al., 2011). İleriki çalışmalarda döngü sayısı artırılarak bu problemin aşılacağı düşünülmektedir.

Tüm bunlara ek olarak, en son SELEX döngüsünden elde edilen farklı dizilere sahip aptamer moleküllerinin DNA dizi analizlerinin, Ion Torrent veya Roche 454 gibi yeni nesil sekans cihazlarıyla gerçekleştirilmesi mümkündür. Yeni nesil

sekanslama yöntemiyle farklı diziyeye sahip her aptamer molekülünün dizisi belirlenebilir. Ancak, sahip olunan imkanlar dahilinde DNA dizi analizi Sanger yöntemini temel alan DNA dizi analizi ile gerçekleştirilebilmiştir. İleriki çalışmalarda yeni nesil sekans cihazlarının SELEX prosedüründe kullanılmasının daha verimli sonuçlar elde etmek için etkin olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasının sonucunda, çalışmanın temel amacı olan GFP molekülünün biyosensör ve aptamer sistemlerinde uygulanabilirliği başarıyla gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen güçlüklerin aşılması ile çalışmanın pratikte daha etkin olarak kullanılmasının mümkün olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahn, J., Kim, E., Ryu, J., Kim, S., 2009, Selection of aptamers in SELEX process, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 1, 1, 1-7.
- Akdoğan, E., Çökeller, D., Marcinauskas, L., Valatkevicius, P., Valincius, V., Mutlu, M., 2006, A new method for immunosensor preparation: Atmospheric plasma torch, *Surface and Coatings Technology*, 201, 6, 2540-2546.
- Alkaabi, K.M., Yafea, A., Ashraf, S.S., 2005, Effect of pH on thermal- and chemical-induced denaturation of GFP, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 126, 149-156.
- Allen, P., Collins, B., Brown, D., Hostomsky, Z., Gold, L., 1996, A specific RNA structural motif mediates high affinity binding by the HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7), *Virology*, 225, 306-315.
- Andreola, M.L., Calmels, C., Michel, J., Toulme, J.J., Litvak, S., 2000, Towards the selection of phosphorothioate aptamers-optimizing in vitro selection steps with phosphorothioate nucleotides, *Eur. J. Biochem.*, 267, 5032-5040.
- Aquino-Jarquín, G., Toscano-Garibay, J.D., 2011, RNA aptamer evolution: two decades of SELECTION, *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 9155-9171.
- Aulisa, L., Tamburrelli, F., Lupporelli, S., Tartarone, M., Padua, R., 1998, Immunohistochemical investigation on type III and VI collagen organization in human intervertebral discs in the neonatal period, *Child's Nerv. Syst.*, 14, 104-108.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S.A., Spivak, D.A., 2008, Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1009-1021.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S.A., McCarley, R.L., Spivak, D.A., 2006, Designing Highly Specific Biosensing Surfaces Using Aptamer Monolayers on Gold, *Langmuir*, 22, 6446-6453.
- Bass, B. L., Cech, T. R., 1984, Specific interaction between the self-splicing RNA of Tetrahymena and its guanosine substrate: implications for biological catalysis by RNA, *Nature*, 308, 820-826.
- Beaucage, S.L. and Iyer, R.P., 1993, The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications, *Tetrahedron*, 49, 28, 6123-6194.
- Beckert, B., Masquida, B., 2011, Synthesis of RNA by in vitro transcription, *Methods Mol. Biol.*, 703, 29-41.
- Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M.G., Reyes, G.B., Gonzalez, S.C., Santa-Coloma, T.A., 2001, Specific oligobodies against ERK-2 that

- recognize both the native and the denatured state of the protein, *J. Immunol. Methods*, 252, 191-197.
- Birch, J.R.; Racher, A.J. Antibody production. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006, 58, 671–685.
- Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Verma, E.H., Toole, J.J., 1992, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355, 564-566.
- Bowser M.T., 2005, SELEX: just another separation?, *Analyst*, 130, 128-130.
- Brejck, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormo, M., Remington, S.J., 1997, Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 2306-2311.
- Bunka, D.H., Stockey, P.G., 2006, Aptamers come of age - at last, *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 588-596.
- Burmeister, P.E., Lewis, S.D., Silva, R.F., Preiss, J.R., Horwitz, L.R., Pendergrast, P.S., McCauley, T.G., Kurz, J.C., Epstein, D.M., Wilson, C., Keefe, A.D., 2005, Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF, *Chem. Biol.*, 12, 25-33.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, 263, 802-805.
- Cho, E.J., Lee, J.W., Ellington, A.D., 2009, Applications of aptamers as sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2, 241-264.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2005, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *Trends Biotechnol.*, 23, 605-613.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2010, Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.*, 90, 3, 1103-1163.
- Ciesiolka, J., Gorski, J., Yarus, M., 1995, Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>2+</sup>, *RNA*, 1, 5, 538-550.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W., 1993, Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32, 1212.
- Conrad, R.C., Baskerville, S., Ellington, A.D., 1995, In vitro selection methodologies to probe RNA function and structure, *Mol. Div.*, 1, 69-78.
- Cormack, B., Valdivia, R., and Falkow, S., 1996, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.



- Craggs, T.D., 2009, Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation, *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2865-2875.
- Cullen, B.R., Greene, W.C., 1989, Regulatory pathways governing HIV-1 replication, *Cell*, 58, 423-426.
- Darfeuille, F., Hansen, J.B., Orum, H., Primo, C.D., Toulme, J.J., 2004, LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1, *Nucleic Acids Res.*, 32, 3101-3107.
- Davis, J.H., Szostak, J.W., 2002. Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 11616-11621.
- Djordjevic, M., 2007, SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways, *Biomol. Eng.*, 24, 179-189.
- Dougan, H., Lyster, D.M., Vo, C.V., Stafford, A., Weitz, J.I., Hobbs, J.B., 2000, Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood, *Nucl. Med. Biol.*, 27, 289-297.
- Dua, P., Kim, S., Lee, D.K., 2011, Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins, *Methods*, 54, 215-225.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346, 818-822.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1992, Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures, *Nature*, 355, 850-852.
- Eulberg, D., Klussmann, S., 2003, Spiegelmers: biostable aptamers, *ChemBiochemistry*, 4, 979-983.
- Eyetechn Study Group, 2002, Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration, *Retina*, 22, 143-52.
- Eyetechn Study Group, 2003, Antivascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results, *Ophthalmology*, 110, 979-986.
- Famulok, M., Hartig, J.S., Mayer, G., 2007, Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy, *Chem. Rev.*, 107, 3715-3743.
- Famulok, M., Hüttenhofer, A., 1996, In vitro selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the 16S rRNA decoding region, *Biochemistry*, 35, 14, 4265-4270.
- Fang, X., Tan, W., 2010, Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach, *Acc. Chem. Res.*, 43, 48-57.

- Feng, L.Y., Chen, Y., Ren, J.S., Qu, X.G., 2011, A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells, *Biomaterials*, 32, 2930-2937.
- Ferapontova, E.E., Olsen, E.M., Gothelf, K.V., 2008, An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 4256-4258.
- Ferreira, C.S.M., Missailidis, S., 2007, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 63-76.
- Geiger, A., Burgstaller, P., Von der Eltz, H., Roeder, A., Famulok, M., 1996, RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acids Res.*, 24, 1029-1036.
- Giepmans, B.N., Adams, S.R., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., 2006, The fluorescent toolbox for assessing protein location and function, *Science*, 312, 217-224.
- Gooding, J.J., 2006, Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends, *Anal. Chim. Acta*, 559, 137-151.
- Gopinath, S.C., 2007, Methods developed for SELEX, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 171-182.
- Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M., Janjic, N., 1995, Nuclease-resistant nucleic-acid ligands to vascular-permeability factor vascular endothelial growth-factor, *Chem. Biol.*, 2, 683-695.
- Green, L.S., Jellinek, D., Jenison, R., Ostman, A., Heldin, C.H., Janjic, N., 1996, Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain, *Biochemistry*, 35, 14413-14424.
- Green, R.J., Frazier, R.A., Shakesheff, K.M., Davies, M.C.R.C.J., Tendler, S.J.B., 2000, Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials, *Biomaterials*, 21, 1823-1835.
- Guerniou, V., Gasparutto, D., Douki, T., Cadet, J., Sauvaigo, S., 2005, Enhancement of the in vitro transcription by T7 RNA polymerase of short DNA templates containing oxidative thymine lesions, *C. R. Biologies*, 328, 794-801.
- Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y., 1995, Improved green fluorescence, *Nature*, 373, 663-664.
- Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y., 1994, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 12501-12504.
- Hermann, T., Patel, D.J., 2000, Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science*, 287, 820-825.

- Homann, M., Göringer, H.U., 1999, Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes, *Nucleic Acids Res.*, 27, 2006-2014.
- Homola, J., 2006, *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer, Berlin
- Huang, C.C., Cao, Z., Chang, H.T., Tan, W., 2004, Protein-protein interaction studies based on molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 76, 6973-6981.
- Huy, G.D., Jin, N., Yin, B.C., Ye, B.C., 2011, A novel separation and enrichment method of 17 $\beta$ -estradiol using aptamer-anchored microbeads, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 34, 189-195.
- Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M., Funatsu, T., 2011, Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins, *Anal. Biochem.*, 414, 173-178.
- Iliuk, A.B., Hu, L., Tao, W.A., 2011, Aptamer in bioanalytical applications, *Anal. Chem.*, 83, 4440-4452.
- Ireson, C.R., Kelland, L.R., 2006, Discovery and development of anticancer aptamers, *Mol. Cancer Ther.*, 5, 2957–2962.
- James, W., 2001, Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1, 540-546.
- James, W., 2000, Aptamers, In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Chichester, 4848–4871.
- Jayasena, S.D., 1999, Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clin. Chem.*, 45, 1628-1650.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., 1994, High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, 263, 1425-1429.
- Jhaveri, S., Olwin, B., Ellington, A.D., 1998, In vitro selection of phosphorothiolate aptamers, *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2285-2290.
- Karamollaoğlu, İ., Öktem, H.A., Mutlu, M., 2009, QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs), *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142-150.
- Karlsson, R., 2004, SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas, *J. Mol. Recognit.*, 17, 151-161.
- Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A., 2010, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 9, 537-550.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T., Nishikawa, S., 2003, RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region, *J. Biochem.*, 133, 263-270.

- Kim, Y.J., Kim, Y.S., Niazi, J.H., Gu, M.B., 2010, Electrochemical aptasensor for tetracycline detection, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33, 31-37.
- King, D.J., Bassett, S.E., Li, X., Fennewald, S.A., Herzog, N.K., Luxon, B.A., Shope, R., Gorenstein, D.G., 2002, Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF-kappa B RelA(p65) and p50, *Biochemistry*, 41, 9696-9706.
- Klussmann, S., 2006, *The Aptamer Handbook*, WILEY-VCH, Weinheim.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A., Furste, J.P., 1996, Mirrorimage RNA that binds D-adenosine, *Nat. Biotechnol.*, 14, 1112-1115.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A. S., 1998, Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator, *Biophys. J.*, 74, 1591-1599.
- Kopylov, A.M., Spiridonova, V.A., 2000, Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX, *Mol. Biol.*, 34, 940-954.
- Kotia, R.B., Li, L., McGown, L.B., 2000, Separation of nontarget compounds by DNA aptamers, *Anal. Chem.*, 72, 827-831.
- Kraus, E., James, W., Barclay, A.N., 1998, Cutting edge: novel RNA ligands able to bind CD4 antigen and inhibit CD4+ T lymphocyte function, *J. Immunol.* 160, 11, 5209-5212.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R., 1982, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymen, *Cell*, 31, 147-157.
- Kusser, W., 2000, Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *J. Biotechnol.*, 74, 27-38.
- Lee, J.O., So, H.M., Jeon, E.K., Chang, H., Won, K., Kim, Y.H., 2008, Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors, *Ana. Bioanal. Chem.*, 390, 1023-32.
- Leva, S., Lichte, A., Burmeister, J., Muhn, P., Jahnke, B., Fesser, D., Erfurth, J., Burgstaller, P., Klussmann, S., 2002, GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism, *Chem. Biol.*, 9, 351-359.
- Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A.F., Wang, A.Z., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2008, Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery, *Trends. Biotechnol.*, 26, 442-449.
- Lim, C.R., Kimata, K., Oka, M., Nomaguchi, K., Kohno, K., 1995, Thermosensitivity of a green fluorescent protein utilized to reveal novel nuclear-like compartments, *J. Biochem.*, 118, 13-17.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. and Prohaska, E., 2002, An aptamer-based quartz crystal protein biosensor, *Anal Chem.*, 74, 4488-4495.

- Liu, C.L., Bernstein, B.E., Schreiber, S.L., 2008, Whole Genome Amplification by T7-Based Linear Amplification of DNA (TLAD), *CSH Protocols*, 3, 5, 1-8.
- Liu, J.J., Stormo, G.D., 2005, Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein–DNA interactions, *Nucleic Acids Res.*, 33, 141.
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M., 2003, New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 11, 810-818.
- Mairal, T., Özalp, V.C., Lozano Sánchez, P., Mir, M., Katakis, I., O'Sullivan, C.K., 2008, Aptamers: molecular tools for analytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 989-1007.
- Mallik, P.K., Nishikawa, K., Millis, A.J.T, Shi, H., 2010, Commandeering a biological pathway using aptamer-derived molecular adaptors *Nucleic Acids Research*, 38, 7, 1-9.
- Malo, G.D., Pouwels, L.J., Wang, M., Weichsel, A., Montfort, W.R., Rizzo, M.A., Piston, D.W., Wachter, R.M., 2007, X-ray structure of Cerulean GFP: a tryptophan-based chromophore useful for fluorescence lifetime imaging, *Biochemistry*, 46, 9865-9873.
- Mandal, M., Breaker, R. R., Gene regulation by riboswitches. 2004, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 451–463.
- March, J.C., Rao, G., Bentley, W.E., 2003, Biotechnological applications of green fluorescent protein, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 4, 303-315.
- Marciniak, R. A., Garcia-Blanco, M. A. and Sharp, P.A. (1990) Identification and characterization of a HeLa nuclear protein that specifically binds to the trans-activation-response (TAR)element of human immunodeficiency virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 3624-3628.
- Marimuthu, C., Tang, T., Tominaga, J., Tanc, S., Gopinath, S.C.B., 2011, Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation, *Analyst*, 21,137, 1307-1315.
- Marro, M.L., Daniels, D.A., McNamee, A., Andrew, D.P., Chapman, T.D., Jiang, M.S., Wu, Z.N., Smith, J.L., Patel, K.K., Gearing, K.L., 2005, Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN gamma-inducible CXCL10 chemokine, *Biochemistry*, 44, 8449-8460.
- Marshall, K.A. and Ellington, A.D., 2000, In vitro selection of RNA aptamers, *Methods. Enzymol.*, 318, 193-214.
- Martin, J.A., Phillips, J.A., Parekh, P., Sefah, K., Tan, W., 2011, Capturing cancer cells using aptamer-immobilized square capillary channels, *Mol. BioSyst.*, 7, 1720-1727.

- Mascini, M., 2009, *Aptamers in Bioanalysis*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA, 313p.
- Mascini, M., Palchetti, I., Tombelli, S., 2012, Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 1316-1332.
- Mascini, M., Papamichael, K., Mevola, I., Pravda, M., Guilbault, G.G., 2007, Ghrelin Detection Using Spiegelmer-Capture Molecules, *Anal. Lett.*, 40, 403-430.
- McKeague, M., Bradley, C.R., De Girolamo, A., Visconti, A., DavidMiller, J., DeRosa, M.C., Screening and initial binding assessment of fumonisin B1 aptamers, 2010, *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 12, 4864-4881.
- McKeague, M., Derosa, M.C., 2012, Challenges and opportunities for small molecule aptamer development, *J. Nucleic. Acids.*, 748-913.
- Mendonsa, S.D. and Bowser, M.T., 2004, In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 20-21.
- Min, K., Jo, H., Song, K.M., Cho, M., Chun, Y.S., Jon, S., Kim, W.J., Ban, C., 2011, Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers, *Biomaterial*, 32, 2124-2132.
- Misono, T.S., Kumar, P.K.R., 2005, Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.*, 342, 312-317
- Morin, J.G., Hastings, J.W., 1971, Energy transfer in a bioluminescent system, *Journal of Cellular Physiology*, 77, 313.
- Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M., Doyle, S.A., 2003, An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification, *Nucleic Acids Res.*, 31, 110.
- Mutlu, S., Çökeliler, D., Shard, A., Goktas, H., Ozansoy, B., Mutlu, M., 2008, Preparation and characterization of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal surfaces for a biosensor, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1249-1255.
- Mutlu, S., Saber, R., Koçum, C., Piskin, E., 1999, An immunosensor: immobilization of anti-hbs antibody on glow-discharge treated piezoelectric quartz crystal for hbs-ag detection, *Analytical Letters*, 32, 2, 317-334.
- Nagy, A., Malnasi-Csizmadia, A., Somogyi, B., and Lorinczy, D., 2004, Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP), A preliminary study, *Thermochimica Acta*, 410, 161-163.
- Nguyen, T., Hilton, J.P., Lin, Q., 2009, Emerging applications of aptamers to micro- and nanoscale biosensing, *Microfluid. Nanofluid.*, 6, 347-362.

- Nimjee, S.M., Rusconi, C.P. and Sullenger, B.A., 2005, Aptamers: an emerging class of therapeutics, *Annu. Rev. Med.*, 56, 555-583.
- Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, VA., Fürste, JP., 1996, Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1116-1119.
- Nutiu, R., Li, Y.F., 2005. In vitro selection of structure-switching signaling aptamers, *Angew. Chem. -Int. Edit.*, 44, 1061-1065.
- O'Malley, R.P., Mariano, T.M., Siekierka, J. and Mathews, M. B., 1986, A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI, *Cell*, 44, 391-400.
- O'Sullivan, C.K., 2002, Aptasensors - the future of biosensing?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, 44-48.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J., 1996, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, 273, 1392-1395.
- Pakhomov, A.A., Martynov, V.I., 2008, GFP family: structural insights into spectral tuning, *Chem. Biol.*, 15, 755-764.
- Pal, S., Das, M., Dasgupta, D., 2012, Structural studies of arginine induced enhancement in the activity of T7 RNA polymerase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 421, 1, 27-32.
- Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., Stauber, R., Pavlakis, G.N., Wlodawer, A., 1997, The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein, *Nat. Struct. Biol.*, 4, 361-365.
- Patel, D.J., 1997, Structural analysis of nucleic acid aptamers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1, 32-46.
- Patel, D.J., Suri, A.K., Jiang, F., Jiang, L.C., Fan, P., Kumar, R.A., Nonin, S., 1997, Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes, *J. Mol. Biol.*, 272, 645-664.
- Penna, T.C., Ishii, M., Junior, A.P., Cholewa, O., 2004, Thermal stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) at various pH values, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113–116, 469–483.
- Petersen, M., Wengel, J., 2003, LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics, *Trends Biotechnol.*, 21, 74-81.
- Peyrin, E., 2009, Nucleic acid aptamer molecular recognition principles and application in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.*, 32, 1531-1536.
- Phillips, J.A., Lopez-Colon, D., Zhu, Z., Xu, Y., Tan, W., 2008, Applications of aptamers in cancer cell biology, *Anal. Chim. Acta*, 621, 2, 101-108.

- Phillips, K.S., Cheng, Q., 2007, Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1831-1840.
- Pleiss, J.A., Derrick, M.L., Uhlenbeck, O.C., 1998, T7 RNA polymerase produces 5' end heterogeneity during in vitro transcription from certain templates, *RNA*, 4, 10, 1313-1317.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., 1992, Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Gene*, 111, 229-233.
- Ravelet, C., Peyrin, E., 2009, Functional nucleic acids for analytical applications, *Integrated Analytical Systems*, 10, 271-286.
- Remington, S.J., 2006, Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Curr Opin Struct Biol.* 16, 714-721.
- Rhodes, A., Deakin, A., Spaul, J., Coomber, B., Aitken, A., Life, P., Rees, S., 2000, The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin, *M. J. Biol. Chem.*, 275, 28555-28561.
- Rimmele, M., 2003, Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments, *Chembiochemistry*, 4, 963-971.
- Robertson, D.L., Joyce G.F., 1990, Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*, 344, 467-468.
- Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L., Janjic, N., 1998, 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF(165))-inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain, *J. Biol. Chem.*, 273, 20556-20567.
- Sampson, T., 2003, Aptamers and SELEX: the technology, *World Patent Information*, 25, 123-129.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D., 2011, Optical detection systems using immobilized aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3725-3736.
- Schmidt, K.S., Borkowski, S., Kurreck, J., Stephens, A.W., Bald, R., Hecht, M., Friebe, M., Dinkelborg, L., Erdmann, V.A., 2004, Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function, *Nucleic Acids Res.*, 32, 5757-5765.
- Selvi, O., 2009, Etiketsiz aptamer immobilizasyonu için yeni bir yöntemin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 90s.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., Davidson, M.W., 2007, Advances in fluorescent protein technology, *J. Cell Sci.*, 120, 4247-4260.



- Shimomura, O., Johnson, F.H., 1969, Properties of bioluminescent protein aequorin, *Biochemistry*, 8, 3991.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell Comp. Physiol.*, 59, 223-239.
- Shui, B., Ozer, A., Zipfel, W., Sahu, N., Singh, A., Lis, J.T., Shi, H., Kotlikoff, M.I., 2011, RNA aptamers that functionally interact with green fluorescent protein and its derivatives, *Nucleic Acids Research*, 1-11.
- Song, K.M., Lee, S., Ban, C., 2012, Aptamers and their biological applications, *Sensors*, 12, 612-631.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., Zhao, J., 2008, Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 108-117.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., Zhao, J., 2008, Aptamer-based biosensors, *Trends Anal. Chem.*, 27, 108-117.
- Sooter, L.J., Ellington, A.D., 2002, Reflections on a novel therapeutic candidate, *Chem. Biol.*, 9, 857-858.
- Stanlis, K.K., McIntosh, J.R., 2003, Single-strand DNA aptamers as probes for protein localization in cells, *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 6, 797-808.
- Stepanenko, O.V., Verkhusa, V.V., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Turoverov, K.K., 2008, Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 9, 338-369.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B., 2007, SELEX - a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomol. Eng.*, 24, 381-403.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., 2005, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 83-91.
- Tombelli, S., Minunni, A., Luzi, E., Mascini, M., 2005a, Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry*, 67, 135-141.
- Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M., 2005, Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, 20, 2424-2234.
- Tucker, B.J., Breaker, R.R., 2005, Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 342-348.
- Tuerk, C., Gold, L., 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249, 505-510.

- Vaught, J.D., Dewey, T., Eaton, B.E., 2004, T7 RNA polymerase transcription with 5-position modified UTP derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 11231-11237.
- Wachter, R.M., 2007, Chromogenic cross-link formation in green fluorescent protein, *Acc. Chem. Res.*, 40, 120-127.
- Wang, Y., Shyy, J.Y., Chien, S., 2008, Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10, 1-38.
- Ward, W.W., 1998, *Green Fluorescent Protein*, (Chalife, S. and Kain, S., eds.), Wiley-Liss, New York, 45-75.
- Williams, K.P., Liu, X.H., Schumacher, T.N., Lin, H.Y., Ausiello, D.A., Kim, P.S., Bartel, D.P., 1997, Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 11285-11290.
- Wilson, C., Szostak, J.W., 1998, Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity, *Chem. Biol.*, 5, 609-617.
- Wilson, D.S. and Szostak, J.W., 1999, In vitro selection of functional nucleic acids, *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 611-647.
- Xu, Y., Cheng, G., He, P., Fang, Y., 2009, A review: Electrochemical aptasensors with various detection strategies, *Electroanalysis*, 21, 11, 1251-1259.
- Yang, F., Moss, L.G., Phillips Jr., G.N., 1996, The molecular structure of green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*, 14, 1246-1251.
- Yang, Q., Goldstein, I.J., Mei, H.Y., Engelke, D.R., 1998, DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 10, 5462-5467.
- Yang, X.B., Li, X., Prow, T.W., Reece, L.M., Bassett, S.E., Luxon, B.A., Tsai, R.Y.L., Reed, R.R., 1998, Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6447-6456.
- Yang, Y., Yang, D., Schluesener, H. J., Zhang, Z., 2007, Advances in SELEX and application of aptamers in the central nervous system, *Biomolecular Engineering*, 24, 583-592.
- Yin, X. B., 2012, Functional nucleic acids for electrochemical and electrochemiluminescent sensing applications, *Trends Anal. Chem.*, 33, 81-94.
- You, K.M., Lee, S.H., Im, A., Lee, S.B., 2003, Aptamers as functional nucleic acids: in vitro selection and biotechnological applications, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, 8, 64-75.

- You, M., Chen, Y., Peng, L., Han D., Yin, B., Ye, B., Tan, W., 2011, Engineering DNA aptamers for novel analytical and biomedical applications, *Chemical Science*, 2, 1003-1010.
- Zhao, Q., Li, X.F., Le, X.C., 2008, Aptamer-modified monolithic capillary chromatography for protein separation and detection, *Anal. Chem.*, 80,3915-3920.
- Zhou, J., Battig, M.R., Wang, Y., 2010, Aptamer-based molecular recognition for biosensor development, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 2471-2480.
- Zuker, M., 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.*, 31, 3406-3415.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilber Ece Sezgin

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 10.03.1988

Medeni Hali : Bekâr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 2002-2005 Milli Piyango Anadolu Lisesi

Lisans 2005-2010 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2010-2013 Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik A.B.D.

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

Şubat 2011- Mart 2012: Ar-Ge personeli, RNA ART

Mart 2012 – Eylül 2012: Biyolog, Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik A.B.D.