

**APTAMER BAĞLI YÜZEYLERDE VEGF VE İNTERFERON- γ
PROTEİNLERİNİN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE MALDI-MS İLE
TAYİNLERİ**

**ENRICHMENT OF VEGF AND INTERFERON- γ PROTEINS ON
APTAMER ATTACHED SURFACES AND THEIR DETECTIONS
BY MALDI-MS**

CANAN HÖÇÜK

**PROF. DR. BEKİR SALİH
TEZ DANIŞMANI**

Hacettepe Üniversitesi

Lisans Üstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

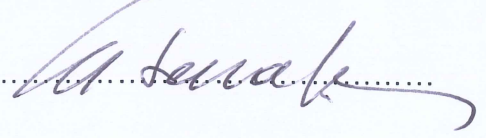
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

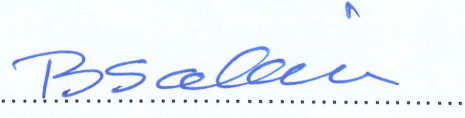
2017

CANAN HÖÇÜK' ün hazırladığı “**Aptamer Bağlı Yüzeylede VEGF ve İnterferon- γ Proteinlerinin Zenginleştirilmesi ve MALDI-MS ile Tayini**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

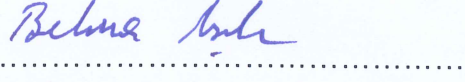
Prof. Dr. Mehmet SAÇAK
Başkan

.....


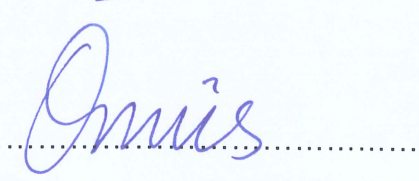
Prof. Dr. Bekir SALİH
Danışman

.....



Prof. Dr. Belma IŞIK
Üye

.....


Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK
Üye

.....


Yrd. Doç. Dr. Cengiz UZUN
Üye

.....


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

Prof. Dr. SALİH BÜLENT ALTEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Annem'e, Babam'a ve aileme...

ETİK

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

10/01/2017



CANAN HÖÇÜK

ÖZET

APTAMER BAĞLI YÜZEYLERDE VEGF VE İNTERFERON- γ PROTEİNLERİNİN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE MALDI-MS İLE TAYİNLERİ

CANAN HÖÇÜK

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Ocak 2017, 107 Sayfa

Aptamerler çeşitli sayıda nükleotitlerden oluşan DNA, RNA oligonükleotitleridir. Nükleotitler arasında oluşan hidrojen bağları, van der Waals bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler aptamerlerin üç boyutlu halini almasını sağlamaktadır. Bu özel üç boyutlu konformasyonu sayesinde hedef moleküle yüksek seçicilikte bağlanmaktadır. Hedef moleküle yüksek seçicilikte bağlanma özelliği bakımından antikora benzeyen aptamerler “kimyasal antikor” olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda çalışma koşulları ve özellikleri karşılaştırıldığında, aptamerler antikorlardan daha çok tercih edilmektedir. En önemli üstünlüğü in vitro olarak laboratuvar ortamında sentezlenebilmesidir. Çalışma koşullarının uygunluğu ve hedef moleküle yüksek özgünlükte bağlanma istendiğinden dolayı saflaştırma, hastalık tanısı, biyoteknoloji ve biyosensör gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Bu uygulama alanlarında en yaygın kullanım şekli aptamerin belirli bir yüzeye bağlanması ile hedef molekülle etkileştirilmesidir.

Aptamerler üstün özellikleri sayesinde yalnızca ilaçlar, peptitler gibi küçük yapılara değil proteinler, vitaminler ve bakteri sporları gibi büyük yapılara özgün olarak

bağlanabilirler. Aptamerlerin bu çeşitli hedef molekülleri arasında proteinle etkileşimi oldukça dikkat çekicidir. Tez kapsamında çeşitli derişimlerde İnterferon- γ (IFN- γ) ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) proteinlerinin kendilerine özgü aptamer yapıları kullanılarak zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle proteinler ve aptamerler için uygun MALDI matriksinin bulunması için farklı matrikslerle MALDI-MS analizleri yapılmıştır. Aptamerin çapraz bağlayıcıya bağlanmasının kontrolünün ardından proteinin aptamerle etkileşiminin kontrol çalışmaları yapılmıştır. Proteinlerin çözelti formlarına ait ve zenginleştirme sonrasına ait analizleri yapılarak aptamer etkisi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan IFN- γ proteini için 0.007 pmol/ μ L, VEGF proteini için 0.002 pmol/ μ L derişimlerinde zenginleştirme çalışmalarının başarılı olduğu görülmüştür. Polimerik yüzey miktarının etkisi, ortamda kullanılan tampon çözeltinin etkisi, yüzeyde peptit varlığı kontrolü gibi zenginleştirmenin daha iyi olmasını amaçlayan optimizasyon deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Daha sonra farklı proteinlerin bulunduğu ortamda aptamer yapılarının özgünlükleri kontrol edilerek aptamerlerin karmaşık ortamda hedef proteinlerin zenginleştirmesinde başarılı olduğu görülmüştür. Aptamerin sadece protein ortamlarında değil büyük-küçük birçok molekülün olduğu ticari olarak satın alınan gerçek kan plazmasında hedef yapıya özgünlüğü incelenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kanda miktarı düşük olan VEGF proteini için ek olarak ziptip işlemi (enzimatik parçalama sonrası ortamdaki DTT, IAA, tuz gibi kimyasalların uzaklaştırılmasını sağlayan işlem) uygulanmış ve bu işlemin peptit sinyal şiddetlerine etkisi incelenmiştir. MALDI-MS ile yapılan analizlerin sonuçlarına göre tez kapsamında kullanılan yöntem sayesinde IFN- γ ve VEGF proteinlerinin düşük derişimlerde zenginleştirilmesi başarılı ve çözelti ortamında aynı derişimlerde gözlemlenemeyen peptit sinyalleri gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aptamer, Kütle Spektrometrisi, MALDI, İnterferon- γ , VEGF, protein zenginleştirilmesi

ABSTRACT

ENRICHMENT OF VEGF AND INTERFERON- γ PROTEINS ON APTAMER ATTACHED SURFACES AND THEIR DETECTIONS BY MALDI-MS

CANAN HÖÇÜK

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. BEKİR SALİH

January 2017, 107 pages

Aptamers are DNA, RNA oligonucleotides that consist of various numbers of nucleotides. Non-covalent interactions of nucleotides such as hydrogen bond and van der Waals bond enable to consist three dimensional structure of aptamers. Thus, these special three dimensional structure of aptamers interact with target molecules with high specific selectivity. Aptamers are similar to antibodies in terms of their ability to interact high selectivity with the target molecules so aptamers are called “chemical antibodies”. When working conditions and features are compared, aptamers are much prefer than antibodies. The most important superior of aptamers can be synthesis in the laboratory as “in vitro”. Bonding their target molecules with high specificity in respect to suitable working conditions, aptamers have many applications fields such as purifications, diagnosis, treatment, biotechnology, and biosensor. The most common method of application is that aptamers are immobilized on a surface for intreaction with target molecule.

Aptamers show specificity not only to small molecules such as drugs, peptides but also to large molecules such as proteins, virus, vitamin, and bacteria spores. Although

aptamer interact with many molecules, aptamer and protein interactions are very noteworthy in these interactions. In the scope of this thesis, enrichment of various concentration of IFN- γ and VEGF were studied owing to aptamer structures. Firstly, aptamers and proteins in various matrix were analyzed by MALDI-MS, because suitable matrix choice is most important factor in MALDI-MS for aptamers and proteins. To examine whether aptamer bind on the surface or not, it was checked and then control studies carried out for aptamer-protein interactions. Before enrichment and after enrichment, analyses of proteins in the solutions were done. Analysis results show that lowest concentration of IFN- γ was succeed to be enriched and detected for 0.007 pmol/ μ L and this was found to be 0.002 pmol/ μ L for VEGF. It was noticed that study of enrichment are sucessful in this study for IFN- γ and VEGF. Optimization studies such as effect of polymeric surface area, effect of buffer solution using in the experiments and peptide presence on the surface were tested for the purpose of the best enrichment. Then specificity of aptamers to target protein was checked in the presence of other proteins and it was noticed that aptamers show high specificty to target protein that aptamers only interacted with target protein even if other proteins were exist in the mixture solutuions. Specificity of aptamers was investigated in the real World sample that have large or small molecule together such as commerical human blood plasma. In addition to these studies, ziptip procedure (this procedure enable to get rid of the chemicals used in protein digestion such as DTT, IAA or salt) was applied to very diluted VEGF solution and the procedure effect on peptide signal intensity was examined. According to MALDI-MS analysis results, using the method proposed in this thesis, enrichments of low concentration of IFN- γ and VEGF proteins were successfully done. Also undetectable peptide signals in rutin procedure could be observed very clearly compared to the signal of those peptide at the same concentration in the solution without preconcentration using MALDI-MS.

Keywords: Aptamer, Mass Spectrometry, MALDI, Interferon- γ , VEGF, protein enrichment

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımızı en iyi şekilde ilerletebilmem için laboratuvarında birçok imkân oluşturan, akademik ve hayat tecrübelerini bizimle paylaşarak yolumu aydınlatan, engin bilgisi ile farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, öğrencilerine gösterdiği sonsuz sabır ve sevgisiyle yardımını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam sayın **Prof. Dr. Bekir Salih**'e çok teşekkür ederim.

Cihazlar ve akademik anlamda sorduğum tüm soruları sıklımadan usanmadan cevaplayan, işi olsa bile bırakıp benim sorularıyla ilgilenen, güler yüzüyle zor zamanlarımda yanımda olan sevgili hocam **Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak**' a teşekkür ederim.

Olaylar karşısındaki çözüm odaklı yaklaşımına hayran olduğum, bilgi ve ilgisi ile öğrencilerine her koşulda vakit ayıran, özellikle bana karşı gösterdiği sonsuz sabır nedeniyle sevgili hocam **Doç. Dr. Gülay Ertaş**' a teşekkür ederim.

Yalnızca bir sene çalışma fırsatı bulabildiğim için kendimi şanssız saydığım, kendi yoğunluklarına rağmen tezimin bitmesinde gösterdikleri yardımseverlik ve özveri için hocalarım **Dr. Mehmet Atakay, Dr. H. Mehmet Kayılı**' a teşekkür ederim.

SAREG ekibine katılmamı sağlayan, sıcak ve samimi davranışları ile tezin her aşamasında yanımda olan hocam **Arş. Gör. Ülkü Güler Tokat**' a her türlü desteği için teşekkür ederim.

Laboratuvarında öğrendiğim birçok pratik bilgiyi bana öğreten güzellik **Hande Kabadayı**' ya ve desteklerini hep hissettiğim **Nazire Barlas, Funda Yıldırım Saçak** ve **bütün SAREG ekibine** teşekkür ederim.

Tezin son döneminde tanıştığım, yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen **Başak Dügencili, Sezin Atıcı Özdemir, Yeliz Akpınar, Pakizan Tasman, C-49 ve C-50 ekibine** teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin bitmesinde manevi desteğini hiç eksik etmeyen değerli arkadaşlarım **Yasin Akyol, Y. Tuğçe Yaman'** a teşekkür ederim.

Lisans hayatımın bana kazandırdığı, bütün başarılarımda emekleri olan, zor zamanlarımda uzak mesafeleri kısaltan ve artık ailemden olan **İpek Koçak, Hilal Dural, Özge İzgi, Damla Sefertaş, Şerife Gökmen, Görkem Erdoğan, Münire Ural ve Zeynep Şahin'e** teşekkür ederim.

112T784 numaralı 'Kütle Spektrometrik Proteomiks Analizleri İçin Seçiciliği Yüksek Aptamer Modifiye Katı Destek Yüzeylerin Geliştirilmesi Ve Optimizasyonu' proje ile maddi destek sağlayan **TÜBİTAK'**a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca attığım her adımda arkamda olan, sevgi ve desteklerini kelimelerle anlatamayacağım **değerli aileme** sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nükleik asitler.....	5
2.2. Aptamerler	6
2.2.1. Aptamerlerin Sentezi	7
2.2.2. Aptamerin Avantajları	10
2.2.3. Aptamerin Yapısal Özellikleri.....	12
2.2.3.1. Aptamer Modifikasyonu.....	14
2.2.4. Aptamerin uygulamaları.....	15
2.2.5. Aptamer –Hedef Ligand etkileşimi.....	19
2.2.5.1. Aptamerlerin küçük yapılara bağlanması	20
2.2.5.2. Aptamerlerin antibiyotikleri tanınması	20
2.2.5.3. Aptamerlerin aminoasitleri tanınması	21
2.2.5.4. Aptamerlerin oligosakkaritleri tanınması	21

2.2.5.5.	Aptamerlerin peptit ve proteinleri tanınması.....	22
2.2.5.5.1.	IFN- γ ve VEGF' in Biyofonksiyonları ve biyolojik ortamdaki işlevleri	23
2.3.	Kütle Spektrometrisi	27
2.3.1.	İyonlaştırma Teknikleri.....	29
2.3.1.1.	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma	31
2.3.1.2.	Elektrosprey İyonlaştırma.....	33
2.3.2.	Kütle ayırıcıları	36
2.3.2.1.	Kuadropol Kütle ayırıcısı (Q).....	37
2.3.2.2.	Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı (TOF)	37
2.3.3.	Biyomolekül çalışmalarında Kütle spektrometrisi	39
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	42
3.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.2.	Kullanılan Cihazlar	43
3.3.	MALDI matrikslerinin hazırlanışı	43
3.4.	IFN- γ proteini, IFN- γ aptameri, VEGF proteini ve VEGF aptamerinin MALDI-MS ile analizleri	44
3.5.	Deney ortamı ve pH ayarlanması.....	44
3.6.	Polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı bağlanması	44
3.7.	Aptamerin çapraz bağlayıcıya bağlanması	45
3.8.	Proteinlerin aptamer bağlı polimerik yüzeyler yardımı ile zenginleştirilmesi	46
3.9.	Bağlanan proteinlerin enzimatik parçalanması.....	46
3.10.	Proteinlerin çözelti ortamında enzimatik parçalanması	47
3.11.	Karışım ortamında IFN- γ ve VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi	47
3.12.	Kan plazma örneğinde IFN- γ ve VEGF protein zenginleştirilmesi	48

3.13.	Peptit sinyallerinin artması için ziptip işlemi uygulanması	48
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	49
4.1.	IFN- γ proteinin analizleri.....	49
4.1.1.	IFN- γ proteini ve IFN- γ aptamerinin MALDI-MS ile analizleri	49
4.1.2.	IFN- γ aptamerinin çapraz bağlayıcıya bağlanması	52
4.1.3.	IFN- γ proteinin yüzeye bağlanan aptamerle etkileşimi.....	54
4.1.4.	IFN- γ -aptamer kompleksinin MALDI-MS ile analizi.....	56
4.1.5.	Farklı derişimlerde IFN- γ protein çözeltilerinin enzimatik parçalanması ve aptamer bağlı yüzeylerde farklı derişimlerde IFN- γ proteini zenginleştirmesi	57
4.1.6.	IFN- γ proteinin yüzeye ve çapraz bağlayıcı ile etkileşiminin incelenmesi.....	61
4.1.7.	Enzimatik parçalama sonrası yüzeyde peptit varlığının kontrolü	63
4.1.8.	Enzimatik parçalamayı asit ile sonlandırmanın peptit sinyallerine etkisi.....	64
4.1.9.	Bağlanma ve enzimatik parçalama sürelerinin peptit sinyallerine etkisi.....	66
4.1.10.	Deney ortamına tampon çözeltinin etkisi	67
4.1.11.	Polimerik katı yüzey kütesinin IFN- γ proteinin zenginleştirmesine etkisi.....	69
4.1.12.	Protein ve onun özgün aptamerinin dış ortamda etkileştirilmesi sonrası yüzeye eklenmesi.....	72
4.1.13.	Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında IFN- γ proteinin zenginleştirilmesi.....	74
4.1.14.	Kan plazmasında IFN- γ zenginleştirilmesi	77
4.2.	VEGF proteinin analizleri	78
4.2.1.	VEGF ve VEGF aptamerinin MALDI-MS ile analizi	78

4.2.2.	VEGF-aptamer kompleksinin MALDI-MS ile analizi	81
4.2.3.	Farklı derişimlerde VEGF protein çözeltilerinin enzimatik parçalanması ve aptamer bağılı yüzeylerde farklı derişimlerde VEGF proteini zenginleştirilmesi.....	82
4.2.4.	Zenginleştirme sonrası elde edilen farklı derişimlerde VEGF peptitlerine ziptip işleminin uygulanması.....	86
4.2.5.	Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında VEGF proteinin zenginleştirilmesi.....	88
4.2.6.	Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında zenginleştirilen VEGF proteininin peptitlerine ziptip işleminin uygulanması	90
4.2.7.	Kan plazmasından VEGF zenginleştirilmesi.....	91
5.	SONUÇLAR.....	93
6.	KAYNAKLAR	98
	ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nükleik asitlerin yapıtaşları.	5
Şekil 2.2. SELEX işlem basamakları.	8
Şekil 2.3. Aptamer ikincil yapılarının şematik gösterimi. (A)Hairpin, (B) Pseudoknot, (C) g-quadruplex ve (D) aptamer-hedef yapı etkileşiminin üçboyutlu gösterimi.....	13
Şekil 2.4. Kütle Spektrometrisinin şematik gösterimi.	28
Şekil 2.5. Kütle Spektrometrisinin genel bileşenleri ve bu bileşenlerin çeşitli örnekleri	29
Şekil 2.6. MALDI cihazının genel görünümü ve iyonlaştırma basamağının şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.7. Elektrosprey iyonlaştırıcısında analitin iyonlaştırılmasının şematik gösterimi	35
Şekil 2.8. Kuadropol kütle ayırıcısının şematik gösterimi.....	37
Şekil 2.9. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısının şematik gösterimi (time of flight).....	38
Şekil 3.1. Çapraz bağlayıcı ve aptamerin polimerik yüzeye bağlanmasının şematik gösterimi.....	45
Şekil 4.1. IFN- γ protein çözeltilisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) SA matriksi ile, (B) ATT matriksi ile, (C) DHB matriksi ile, (D) 3HPA matriksi ile, (E) THAP matriksi ile ve (F) DHB 2 matriksi ile IFN- γ proteinin MALDI-TOF-MS analizi.	50
Şekil 4.2. IFN- γ aptamer çözeltilisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) THAP matriksi ile, (B) ATT matriksi ile, (C) SA matriksi ile, (D) DHB matriksi ile ve (E) 3HPA matriksi ile IFN aptamerinin MALDI-TOF-MS analizi.....	51

Şekil 4.3. (A)7.0 pmol/µL IFN-γ aptamer çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) Aptamer çözeltisi çapraz bağlayıcı yüzeye eklenip uygun bekleme süresinin ardından ortamdaki çözelti formunun DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Yıkamalar sonrası yıkama çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.....	53
Şekil 4.4. (A)7.0 pmol/µL IFN-γ protein çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) IFN-γ çözeltisinin aptamer bağlı yüzeye eklenip beklemesinin ardından ortamdaki çözelti formunun DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Yıkamalar sonrası yıkama çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.	55
Şekil 4.5. IFN-γ - aptamer kompleksinin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS ile analizi.	56
Şekil 4.6. (A)7.0 pmol/µL, (B) 0.7 pmol/µL ve (C) 0.07 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.....	58
Şekil 4.7. Aptamer bağlı yüzeyde IFN-γ proteinin zenginleştirilmesi. (A)7.0 pmol/µL, (B) 0.7 pmol/µL, (C) 0.07 pmol/µL ve (D) 0.007 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.	59
Şekil 4.8. (A) 0.07 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları, (B) 0.07 pmol/µL ve (C) 0.007 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.	60

Şekil 4.9. Polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı ve aptamer yokluğunda eklenen 7.0 pmol/µL protein çözeltisi yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Polimerik yüzeyde çapraz bağlayıcı ve 7.0 pmol/µL interferon aptamer varlığında yüzeye eklenen 7.0 pmol/µL IFN-γ proteinin yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.	61
Şekil 4.10. Polimerik yüzeyde çapraz bağlayıcı ekledikten sonra aptamer olmadan eklenen 7.0 pmol/µL protein çözeltisinin yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Polimerik yüzeye bağlanan çapraz bağlayıcı ve 7.0 pmol/µL IFN-γ aptameri ardından yüzeye bağlanan 7.0 pmol/µL IFN-γ proteinin enzimatik parçalanma sonrası pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.	62
Şekil 4.11. 7.0 pmol/µL IFN-γ proteini eklenen yüzeyde parçalanma işlemi bittikten sonra elüsyon çözeltisi (% 50 ACN, % 50 SU ve % 0.5 TFA) ile muamele edilen yüzeyin çözelti formuna ait pozitif iyon MALDI-TOF-MS spektrumu.	63
Şekil 4.12. 7.0 pmol/µL IFN-γ proteini eklenen yüzeyde parçalama işlemi bittikten sonra elüsyon çözeltisi (% 50 ACN, % 50 SU ve % 0.5 TFA) ile muamele edilen yüzey formuna ait pozitif iyon MALDI-TOF-MS spektrumu.	64
Şekil 4.13. 7.0 pmol/µL IFN-γ proteinin zenginleştirme sonrası (A) Durdurulmayan Enzimatik parçalanma çözeltisinin, (B) seyreltik TFA ile durdurulan enzimatik parçalanma çözeltisinin ve (C) 1 µL derişik TFA ile durdurulan enzimatik parçalama çözeltisinin elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.	65
Şekil 4.14. Bağlanma ve bekleme sürelerinin iki katına çıkarıldığı 7.0 pmol/µL IFN-γ proteinin zenginleştirme sonrası enzimatik parçalanma ürünlerinin pozitif iyon modunda alınan MALDI-MS spektrumu. (B) Bağlanma sürelerinin başta belirlenen koşullara göre olduğunda IFN-γ proteinin zenginleştirme sonrası enzimatik parçalanma ürünlerinin pozitif iyon modunda alınan MALDI-TOF-MS spektrumu. ...	66
Şekil 4.15. (A) 100 mM lık tris-HCl tamponunun sadece yıkama esnasında kullanıldığı deney işlemlerine ait kütle spektrumu, (B) Deneyin tamamının 100 mM lık tris-HCl tamponun içinde gerçekleştirildiği deney işlemlerine ait ve (C) Deneyin	

tamamının 100 mM lık fosfat tamponunun içinde gerçekleştirildiği deney işlemlerine ait pozitif iyon modunda alınan MALDI-TOF-MS spektrumları.....	68
Şekil 4.16. 7.0 pmol/μL derişiminde IFN-γ proteinin (A) 20 mg tartılan polimerik yüzey ile, (B) 10 mg tartılan polimerik yüzey ile ve (C) 5 mg tartılan polimerik yüzey ile zenginleştirmesi işleminin sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları.....	70
Şekil 4.17. 0.7 pmol/μL derişiminde IFN-γ proteinin (A) 20 mg tartılan polimerik yüzey ile, (B) 10 mg tartılan polimerik yüzey ile ve (C) 5 mg tartılan polimerik yüzey ile zenginleştirmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları	71
Şekil 4.18. (A) 2 mg tartılan polimerik yüzey ile yapılan 7.0 pmol/μL derişiminde ve (B) 2 mg tartılan polimerik yüzey ile yapılan 0.007 pmol/μL derişiminde IFN-γ proteinini zenginleştirmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları.....	72
Şekil 4.19. Aptamer ve IFN-γ proteinin kompleksi dışarıda oluşturulup yüzeye eklenmesinin ardından bağlanan proteinin enzimatik parçalamasından sonra pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.....	73
Şekil 4.20. (A) Aynı çözelti ortamında bulunan Lizozim, sitokrom C ve IFN-γ proteinlerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 5 pmol/μL derişimindeki IFN-γ proteinin zenginleştirilmesi sonucu pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Lizozim ve sitokrom C varlığında 3,5 pmol/μL derişimindeki IFN-γ proteinin zenginleştirilmesi sonucu pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu	76
Şekil 4.21. Kan plazmasında IFN-γ proteinini zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.....	77
Şekil 4.22. VEGF proteinin çeşitli matrikslerde pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) 3HPA matriksi ile, (B) ATT matriksi ile, (C) DHB matriksi ile, (D) SA matriksi ile, (E) THAP matriksi ile ve (F) DHB 2 matriksi ile VEGF proteinin MALDI-MS analizleri.	79

Şekil 4.23. VEGF aptamerinin çeşitli matrislerde pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) DHB matrisi ile, (B) 3HPA matrisi ile (C) ATT matrisi ile (D) THAP matrisi ile VEGF aptamerinin MALDI-TOF-MS analizleri.	80
Şekil 4.24. VEGF-aptamer kompleksinin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS ile analizi.	81
Şekil 4.25. (A)1.0 pmol/µL, (B) 0.2 pmol/µL, (C) 0.02 pmol/µL ve (D) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.	83
Şekil 4.26. Aptamer bağlı yüzeyde, (A)1.0 pmol/µL, (B) 0.2 pmol/µL, (C) 0.02 pmol/µL ve (D) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen peptit fragmentlerine ait pozitif mod MALDI-TOF-MS spektrumları.	84
Şekil 4.27. (A) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen peptitlerin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.	85
Şekil 4.28. Aptamer bağlı yüzeyde (A)1.0 pmol/µL, (B) 0.2 pmol/µL, (C) 0.02 pmol/µL ve (D) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesinin ardından ziptip uygulanması ile elde edilen peptitlerin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.	87
Şekil 4.29. (A) Aynı çözelti ortamında bulunan Lizozim, sitokrom C ve VEGF proteinlerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları, (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 1.0 pmol/µL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Lizozim ve sitokrom C proteinleri varlığında 0.002 pmol/µL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda elde edilmiş MALDI-TOF-MS spektrumu.	89

Şekil 4.30. (A) Lizozim ve sitokrom C varlığında 0.002 pmol/µL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi ve ziptip uygulanmasının ardından elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 1.0 pmol/µL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi ve ziptip uygulanmasının ardından elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu..... 91

Şekil 4.31. Kan plazmasında 1.0 pmol/µL derişiminde VEGF proteini zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu..... 92

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çeşitli SELEX yöntemlerin Özellikleri ve Uygulamaları.....	9
Çizelge 2.2. Farklı analitler için kullanılan çeşitli MALDI matriksleri ve bu matrikslerin kısaltılmaları	34
Çizelge 4.1. IFN- γ proteinine ait peptit fragment kütleleri ve tripsin enzimine ait otokataliz ürünlerin kütleleri	57
Çizelge 4.2. Tripsin ile parçalanmış Lizozim ve Sitokrom C proteinine ait peptit fragment kütleleri	75
Çizelge 4.3. Tripsin ile parçalanmış VEGF proteinine ait peptit fragmentlerinin kütleleri	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	derece santigrad
%	yüzde
µg	mikrogram
µL	mikrolitre
mL	mililitre
mm	milimetre
K _d	Ayrışma Sabiti

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (eksponansiyel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi)

PCR	Polymerase Chain Reactions (Polimer Zincir Reaksiyonları)
RT-PRC	Reverse transcription polymerase chain reaction (Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu)
UV	Ultraviolet
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
IFN- γ	İnterferon-gama
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
AMP	Amonyum mono fosfat
ELISA	Enzyme-linked immunabsorbent assay (Enzim bağlı immuno absorbent ölçüm)
MS	Kütle Spektrometrisi
EI	Elektron Bombardımanlı İyonlaştırma
CI	Kimyasal İyonlaştırma
FAB	Hızlı Atom Bombardımanı

API	Atmosphere Pressure Ionization (Atmosferik Basınç İyonlaştırma)
MALDI	Matrix Assited Laser Desorption/Ionization (Matriks yardımcı Lazer desorpsiyon/iyonizasyon)
ESI	Electrospey Ionization (elektrosprey iyonlaştırma)
TOF	Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
HMDA	Hekzametilendiamin
Sülfo-SMCC	Süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat
DTT	Ditiyotreitol
IAA	İyodoasetamid
ACN	Asetonitril
TFA	Trifloroasetikasit
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinamik asit

DHB	2-5 dihidroksibenzoik asit
SA	Sinapinik Asit
ATT	6-aza-2-tiyotiyamin
THAP	2',4',6'-Trihidroksiasetofenon monohidrat
3HPA	3-hidroksipikolinik asit

1. GİRİŞ

Canlı hücrelerde hücre çekirdeğinde bulunan DNA ve RNA' nın yapısının tekrar eden birimlerinde 5 karbonlu şeker, azotlu bir baz ve fosfat grubu bulunmaktadır. Bu üçlü tekrar eden birime “ nükleotit “ adı verilmiştir. Bir nükleotit birimindeki fosfat grubunun bir alt veya bir üstteki nükleotit birimi ile fosfodiester bağı oluşturarak tek zincir formu oluşturmaktadır. Protein sentezi işleminde bu tek zincir formuna sahip mRNA ve tRNA yapılarındaki üç adet nükleotit “kodon” oluşturmaktadır ve bu kodonla ribozomda aminoasit oluşumu sağlanmaktadır. Protein birincil yapısındaki aminoasitler ile tek zincirli nükleik asit yapıları arasındaki bu özel ilişki birçok araştırma grubunun ilgisini çekmiştir. Yapılan birçok çalışmada; bu özel ilişkinin tek zincirli nükleik asit sahip olduğu üçüncül yapıdaki nükleotitler ile proteinlerin aminoasitlerin hidrojen bağı, van der Waals, elektrostatik etkileşim gibi ikincil etkileşimler sayesinde olduğu bulunmuştur [1]. Ancak 1990 yılına kadar nükleik asitlerin laboratuvar ortamında sentezlenip saflaştırılması tam olarak başırlanamamıştır. 1990 yılında üç farklı grubun geliştirdiği yöntem sayesinde tek zincirli DNA, RNA oligonükleotitleri istenen dizilime göre sentezlenip saflaştırılabilmıştır. SELEX adı verilen bu yöntem sonucu hedef yapıya göre sentezlenen oligonükleotitlere eski dil de “uygun, adapte olmuş” anlamına gelen “aptamer” terimi kullanılmıştır [2]. Başlangıçta gelişigüzel dizilimlerde oluşturulan milyonlarca oligonükleotitin hedef yapı ile etkileşimi ve bağlanmayan oligonükleotitlerin ortamdaki uzaklaştırılma basamağı; en iyi etkileşen dizilim belirleninceye kadar ardı ardına tekrar edilmektedir. Bu tekrar eden döngülerin ardından belirlenen en iyi dizilim Polimer Zincir Reaksiyonları (PCR) gibi çeşitli teknikler ile çoğaltılmaktadır. Bu çoğaltım işleminin ardından sekanslama ile hedef yapı için en uygun, en iyi etkileşen dizilim belirlenmiş olmaktadır.

Aptamer ile hedef yapı arasındaki etkileşim; kovalent olmayan bağlara dayanmaktadır. Aptamerin üç boyutlu yapısında nükleotitler hedef yapıların sahip olduğu çeşitli kimyasal gruplarla (-OH, -SH, -COOH...) uygun ikincil etkileşime girmektedir. Aynı antikör-antijen etkileşimi gibi kovalent bağdan daha zayıf birçok kovalent olmayan bağı bir araya gelmesi ile aptamer –hedef yapı arasında çok güçlü ve özgün bir

etkileşim olmaktadır. Aptamer ile hedef yapı arasında; aptamerlerin ve hedef yapıların üç boyutlu formunun farklı olmasının getirdiği avantajla oldukça yüksek özgünlük sağlanmış olmaktadır. Bu özgünlük o kadar yüksektir ki; kimyasal formülleri açısından aralarında bir metil grubu fark olan kafein ve teofilin moleküllerinin bir metil grubu yüzünden üç boyutlu yapıları farklı olmakta ve teofilin için sentezlenen aptamer yapısı kafeine bağlanmamaktadır [3].

Hedef yapı ile etkileşim mekanizması antikorlarla benzer olan aptamerler birçok bakımdan antikorlardan üstündür. Laboratuvar ortamında sentezlenebilmesi, kolay temin edilebilmesi, sıcaklık gibi parametrelerden etkilenmeyerek kolay denatürasyona uğramaması, modifiye edilebilmesi ve raf ömrünün uzun olması gibi birçok bakımdan avantajlı olduğu için antikorların yerine kullanımı son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır.

Aptamerlerin, çalışma koşullarının uygunluğu ve hedef moleküle yüksek özgünlükte bağlanma özelliklerinden dolayı birçok uygulama alanı vardır. Hedef molekülün doğal formuna uygun olarak belirlenen diziliminden dolayı; hedef molekülde olan mutasyonları belirlemek, mutasyonlu yapıları doğal yapılardan ayırt etmek için saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadırlar. Bunun yanı sıra çeşitli boyalar ve floresans özelliği olan yapılarla kompleks haline getirilerek tanısal uygulamalarda kullanılırlar. Belirli bir yüzeye tutturularak biyosensör olarak kullanımları ise uygulama alanları içinde en yaygın olanıdır. Altın, silika ya da polimer gibi çeşitli yüzeylere değişik yöntemlerle bağlanıp immobilize edildikten sonra hedef molekülü yakalayıcı yüzey oluşturulabilmektedir.

Aptamerlerin teşhis, tedavi, biyosensör prob uygulamalarına ek olarak ilaç, ilaç taşıyım sistemleri gibi birçok alanda da uygulamaları mevcuttur. Aptamer-hedef yapı arasındaki etkileşim sebebiyle kanser, viral hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar için aptamer kullanımı birçok çalışmanın temelinde yatmaktadır. Bu alanda çalışmalar o kadar önem kazanmıştır ki; 2004 yılında gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration, FDA) Neovasküler yaşa bağlı dejenerasyon hastalığını tedavi etmek için bu hastalıkta önemli rol oynayan VEGF proteinin inaktif etmek için "Macugen" adı verilen aptamer yapısını ilaç olarak kabul etmiştir [4].

Tez kapsamında aptamer-protein etkileşimleri sayesinde zenginleştirilecek proteinler olarak İnterferon- γ (IFN- γ) ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) seçilmiştir.

İnterferon (IFN), vücut hücrelerinin birçoğu tarafından sentezlenen ve bakterilere, parazitlere, virüslere ve tümöre karşı etki gösteren bir proteindir. Glikoprotein sınıfına giren bu yapılar, vücudun en hızlı üretilen ve yabancı organizmalara karşı en önemli olan savunma ajanlarıdır. İnterferon- α , İnterferon- β , İnterferon- γ olmak üzere üç çeşit interferon bulunmaktadır.

İnterferon- γ (IFN- γ)' nın en önemli özelliği ortamda yabancı madde varlığında makrofaj denilen bağışıklık sisteminin hücrelerini aktif hale getirmesidir. Ayrıca yine ortamda bulunan yabancı madde varlığında çevredeki normal hücreleri uyararak patojenin sağlıklı hücre içine girmesini engellemektedir [5].

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ise endotel hücre denilen yassı ve düz kenarlı hücrelerin büyümesinden sorumlu protein olarak bilinmektedir. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, plasental büyüme faktörü şeklinde altı üyesi bulunmaktadır. Literatürde VEGF olarak belirtilen protein genellikle VEGF-A proteindir. Kemik oluşumu ve kemik hücresi oluşumunda etkin görev aldığı deneysel olarak kanıtlanan VEGF' in tümör büyümesinde ve kanserli hücrelerin büyümesinde etkili olduğu çeşitli çalışmalar sonucunda ortaya koyulmuştur [6].

Bu iki proteinin biyolojik aktivitesinden dolayı tayini oldukça önemlidir. Ancak biyolojik ortamın karmaşıklığından ve miktarlarının azlığından dolayı tayin işlemleri ELISA gibi klasik yöntemler ile oldukça zorlaşmaktadır. Hedef moleküle özgün bağlanma özelliği ve uygun çalışma koşulları olan aptamer yapıları sayesinde proteinlerin buldukları ortamdan seçimli olarak ayrılması ve zenginleştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla; çeşitli derişimlerdeki IFN- γ ve VEGF proteinlerinin polimerik mikroküreler üzerine bağlanan aptamer yapıları sayesinde zenginleştirilmesi yapılmıştır. Bu zenginleştirme sayesinde cihazın tayin sınırının altında olan çok düşük derişimlerdeki proteinler (IFN- γ proteini için 0.007 pmol/ μ L ve VEGF protein için 0.002 pmol/ μ L derişimindeki) analiz edilebilmiştir. Analiz edilebilme aralığına çekilen proteinler daha iyi gözlenme sağlanabilmesi için enzimatik parçalamaya uğratarak peptit fragmentleri analiz edilmiştir. Zenginleştirmenin daha iyi olmasını amaçlayan optimizasyon deneylerinin ardından aptamerin seçimliliğini kontrol amaçlı Lizozim ve

sitokrom C gibi başka proteinlerin ve kan plazmasında IFN- γ ve VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi yapılmıştır.

MALDI-TOF-MS cihazının biyomoleküllerin analizinde oldukça geniş uygulama alanı vardır. Yüksek kütle çözünürlüğü, yüksek hassasiyet ve yüksek hız ve basitlik cihaz için tercih sebebi olmaktadır [7]. Ayrıca MALDI-TOF-MS sistemi ELISA gibi klasik protein analiz yöntemlerine göre üstün özellikler göstermektedir. Bu üstünlükler sıralanırsa; MS ve MS/MS analizleri sayesinde antijenler bulunabilir, antijenik protein bölgelerinin çeşitli izoformları ve post transasyonel modifikasyonları MALDI-TOF-MS ile ayırt edilebilir, MS cihazı çoklu deney imkanı ve yüksek veri imkanı sayesinde yüzlerce molekülü aynı anda simule edilebilir.

MALDI-TOF-MS cihazının yukarıda bahsedilen birçok avantajı göz önüne alınarak tez kapsamında MALDI-TOF-MS cihazı kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile aptamer yapılarının proteinlerle olan özgün etkileşiminden faydalanılarak cihazın tayin sınırının oldukça altında olan derişimlerde protein analizi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hastalıkların teşhisinde önemli rol oynayan proteinlerin birçok farklı yapının bulunduğu karmaşık ortamda analizinin yapılabilmesi ve aptamer yapılarının proteinlerin denatürasyona uğramış haline bağlanmadıkları için proteinin denatürasyona uğradığının kontrolünün yapılabilmesi gibi birçok önemli alana katkı sağlanması planlanmıştır.

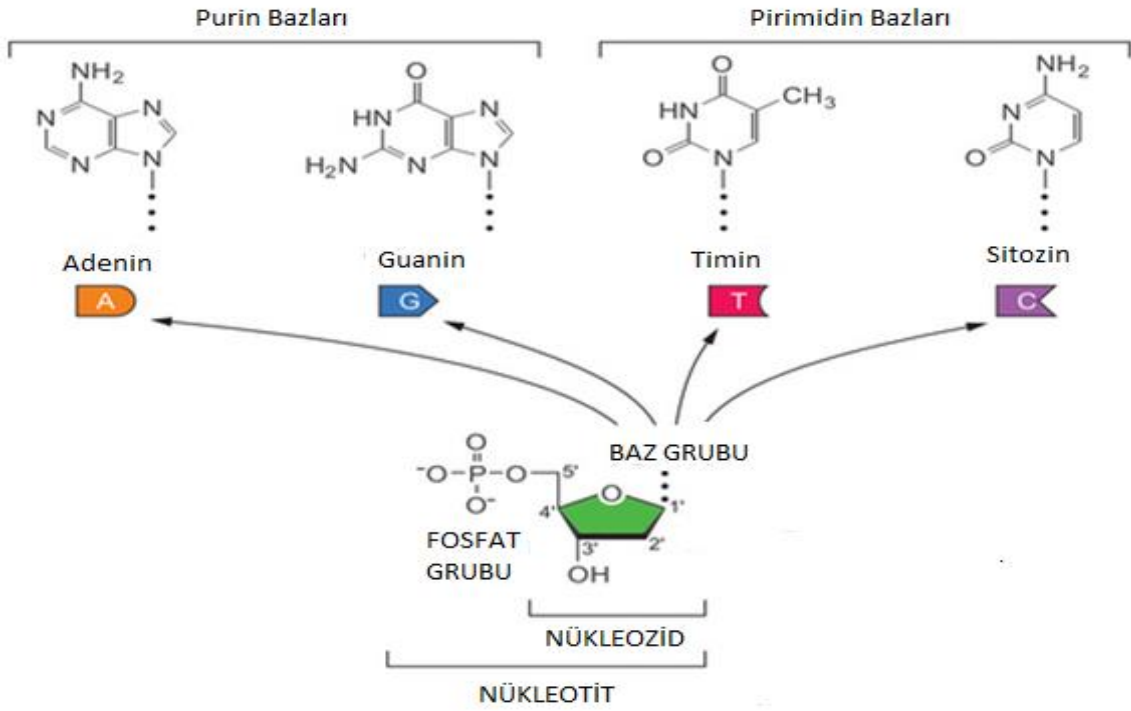
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nükleik asitler

Nükleik asitler canlı organizmalar için hayati öneme sahip olup RNA'nın taşınımı ve dönüşümü, DNA'nın paketlenmesi, genetik rekombinasyon, replikasyon ve DNA tamiri gibi biyolojik işlemler için oldukça önemlidir [8].

Azotlu bir baz, beş karbonlu bir şeker ve fosfat grubundan oluşan nükleotit monomerlerinin ardı ardına birleşmesiyle nükleik asit yapıları oluşur.

Nükleik asit yapıları, barındırdıkları riboz ya da deoksiriboz şeker gruplarına bağlı olarak DNA ya da RNA ismini alır. Translasyon, transkripsiyon gibi birçok önemli işlemde yer alan DNA ve RNA, nükleotit yapısında bulunan fosfat gruplarının fosfodiester bağı yaparak zincir oluşturması ile meydana gelirler. Nükleik asit yapılarında 5 çeşit baz mevcuttur; adenin, guanin, sitozin, timin(DNA) ve urasil(RNA). Bu temel bazların çeşitli dizilimleri sonucunda çok çeşitli ikincil yapılar meydana gelir [9].



Şekil 2.1. Nükleik asitlerin yapıtaşları.

Nükleik asitlerin keşiflerinden beri bu yapıların sadece proteinleri oluşturmak için genetik bilgi taşıdığı düşünülüyordu. Ancak nükleik asit dizileri hemen hemen bütün canlılarda bulunduğundan dolayı bu yapıların farklı fonksiyonları yerine getirebileceği bilinmiyordu. Genetiğin moleküler mekanizma alanı keşfedildikten sonra nükleik asitlerin ilave fonksiyonları olabileceği ihtimali üzerine araştırmalar yoğunlaştırıldı [10].

1980'li yılların başında RNA yapılarının sadece genetik bilgiyi taşıyan pasif bir yapı olmadığı aynı zamanda yaşayan hücrelerin direk katalizine katılan bir yapı olduğu anlaşılmıştır [11]. Araştırmalar sonucunda RNA'nın interaktif bir molekül olduğu ve özellikleri sayesinde hücre sistemi içindeki diğer yapılarla çok yüzeyli etkileşime girebildiği gösterilmiştir. RNA'nın fonksiyonel çeşitliliğine katkıda bulunacak çeşitli moleküllerle etkileşebilmek için modifiye edilebilir farklı yapılara sahip olmasının yanı sıra RNA yapılarının farklı koşullara kolaylıkla adapte olabildikleri çeşitli çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur [12].

2.2. Aptamerler

Nükleik asit yapılarının birçok fonksiyona sahip olduğunun anlaşılmasının ardından bu alanda yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. 1990 yılında birbirinden bağımsız üç grubun yaptığı çalışmalar ile bu alanda farklı bir dönem başlamıştır. Tuerk ve Gold yayınlarında T4 DNA polimeraz dizisi gereksinimlerini belirlemek için in vitro seçim işlemini tanımlamışlardır ki bu işleme daha sonra SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) adı verilmiştir [13]. T4 DNA polimerazla etkileşen RNA'nın sekiz adet baz bölgesi seçilmiştir. 65536 adet farklı türün olduğu havuzdan iki farklı dizilim olacak şekilde seçim işlemi yapılmıştır. Bu dizilimden birisi bakteriyofajların mRNA'sında bulunan dizilimdir, diğer dizilim ise bu doğal dizilimden SELEX yöntemi ile türetilmiştir. SELEX yöntemi sayesinde türetilen yapıların polimeraz enzimine bağlanma afinitesi mRNA yapılarının polimer enzimine bağlanma afinitesine oldukça benzemektedir [13].

Kısa süre sonra Ellington and Szostak özgü ligand bağlama özellikleri olan nükleik asitleri izole etmek için in vitro seçiminde kullanılacak ezber bozan deneyler yayınlamışlardır. Rastgele dizilime sahip 100 nükleotit birimi içeren moleküller oluşturulmaya başlanınca nükleik asit kütüphaneleri de oluşmaya başlamıştır.

Afinite kromatografisi kullanılarak RNA'nın izole edilmesiyle daha önceden nükleik asitlere bağlandığı bilinmeyen organik boyaların RNA'ya yüksek afiniteyle bağlandığı

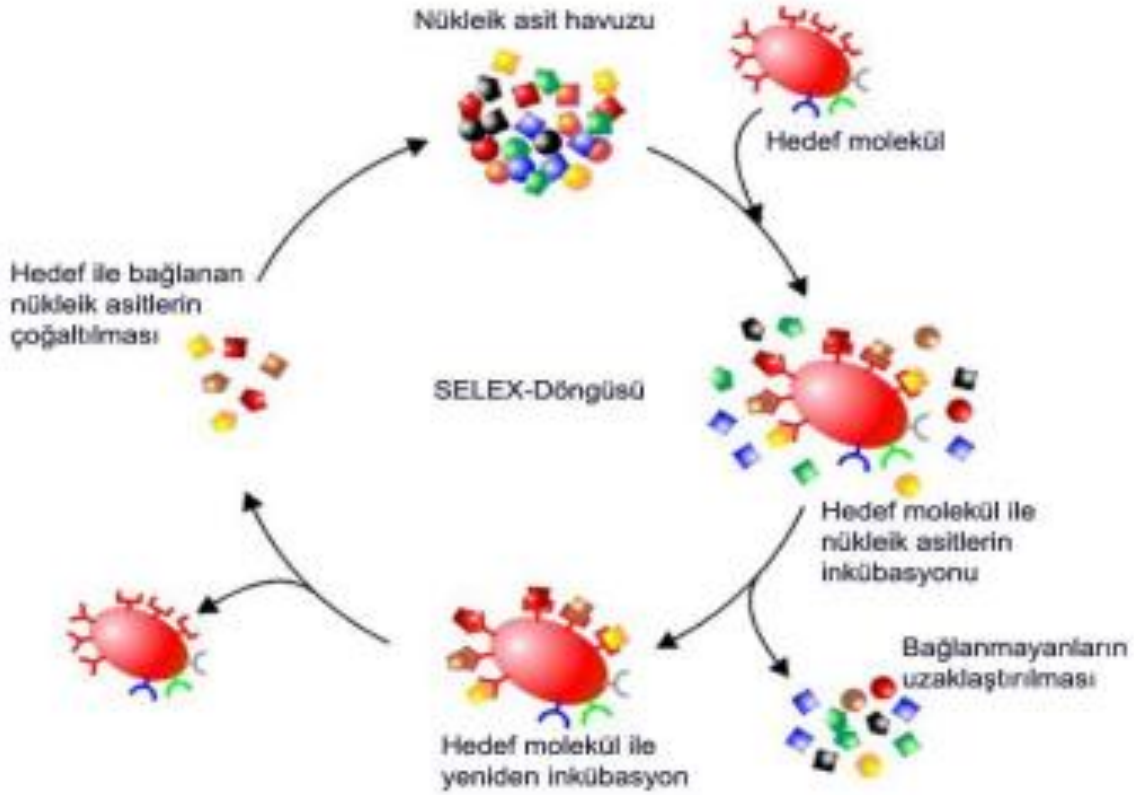
gösterilmiştir. Yaklaşık 10^{10} adet RNA molekülünün özgün boya ile etkileşen bağlanma bölgeleri oluşturmak için katlanıp üç boyutlu yapı oluşturduğu fark edilmiştir. Ellington ve Szostak, nükleik asit temelli bu yapılar için 'aptamer' terimini kullanmıştır. Eski Yunanca'da 'uygun' ve 'adapte olmuş' anlamına gelen aptamer kelimesi, modern bilim dünyasında hedef moleküle yüksek özgünlükte bağlanma için in vitro seleksiyon yöntemiyle seçilen DNA, RNA oligonüklotitleri anlamına gelmektedir [2]. Genellikle 15-40 nükleotit birimi uzunluğunda olan bu yapılar DNA, RNA ya da kimyasal modifiye ile şeker bağlanmış (2'-fluoro, 2'-O-metil, fosforotiyol gibi gruplar) nükleotitlerden oluşur.

Yapısındaki nükleotitlerin kısa heliks yapısında kollar ve tek sarmal looplar denilen uzaysal boşluklar oluşturması ile aptamerin ikincil yapısı oluşur. Kararlı tersiyer yapı bu ikincil yapının kombinasyonları ile oluşur. Oluşan bu tersiyer yapı, aptamerlerin van der Waals, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler yolu ile hedef yapıya bağlanmasına izin verir. Üç boyutlu yapıları sayesinde aptamerler hedeflerine yüksek seçicilik ve özgünlükte bağlanabilmektedirler [14]. Aptamerler metal iyonlarını, peptitleri, proteinleri, kofaktörleri, nükleotitleri ve türevlerini, aminoasitleri, karbonhidratları, antibiyotikleri yüksek seçicilikte hedef yapı olarak bağlayabilmektedir [15].

2.2.1. Aptamerlerin Sentezi

Genel olarak bakıldığında SELEX yönteminin 4 genel adımı vardır;

- 1) Hedef molekülün uygun koşullar altında bağlanabilmesi için nükleik asit kütüphanesinde inkübasyonu,
- 2) Seçici moleküle yüksek afiniteyle bağlanamayan nükleik asitlerin ortamdaki uzaklaştırılması,
- 3) Seçici moleküle bağlanan nükleik asidin seçici molekülden ayrılması,
- 4) Hedef molekül için uygun olduğu belirlenen nükleik asit diziliminin çoğaltılması [16].



Şekil 2.2. SELEX işlem basamakları [136].

SELEX yöntemi, yaklaşık 10^{13} ile 10^{15} adet farklı dizilime ve modifikasyona sahip DNA kütüphanesinin kimyasal olarak sentezlenerek hazırlanması ile başlamaktadır. Eğer amaç DNA aptameri elde etmek ise, oluşturulan bu kütüphane hiçbir değişime gerek kalmadan kullanılabilir ancak amaç RNA aptameri elde etmek ise, oluşturulan DNA kütüphanesi RNA kütüphanesine dönüştürülmelidir [17]. Bu basamakta hedef yapıya uygun olan üçboyutlu dizimler hedefe bağlanırken uygun olmayanlar bağlanamayacak ya da zayıf bağlanacaktır. Hedefe bağlanan oligonükleotitler bağlanmayan nükleotitlerden ayrılıp çoğaltılma işlemine tabi tutulmaktadır. Bu işlem, DNA aptameri için PCR yöntemi ile RNA aptameri için ise RT-PCR yöntemi ile yürütülmektedir [17]. Hedefe yüksek afinitede bağlanan yapıları bulmak için ard arda yapılan seçim ve çoğaltma işlemleri ile başlangıçtaki zengin kütüphanenin içeriği sadeleştirilmektedir. PCR tekniği ile oluşturulan bu klonlar tek tek sekanslanır ve dizimler; en uygun aptamer dizilimini bulmak için analiz edilir [14].

Ancak yeni sekanslama teknolojileri ile klonlama basamakları ortadan kaldırılabilir ve özgün aptamer kullanılarak havuz içeriğinden doğrudan sekanslama yapılabilir. Son olarak seçilen aptamere, immobilizasyon, kararlılığı artırma, bağlanmayı artırma gibi çeşitli özellikler için bazı post-SELEX modifikasyonları gerçekleştirilebilir (Çizelge 2.1.). Örneğin Toggle SELEX yöntemi çeşitli protein hedefleri için aptamer seçiminde kullanılmaktadır. Tailored-SELEX yöntemi ise amplifikasyon aşaması öncesi ve sonrası birincil bölgelerde bağlanma ve bölünmeye izin verdiği için kimyasal olarak sentezlenen kısa aptamer dizilerinin izolasyonunda kullanılmaktadır. Photo-SELEX yönteminde UV-içeren çapraz bağlayıcı aptamerler için kullanıldığından dolayı ışığa duyarlı nükleotitler hedeflerine yüksek bağlanma afinitesi göstermektedirler [18].

SELEX Yöntemi	Yöntemin Özellikleri	Uygulamaları
Genomic SELEX	Temel genomik dizilim kütüphaneleri kullanılır.	Farklı moleküller tarafından doğal dizilim tanıma çalışmalarında
Tailored SELEX	Serbest karışık dizilim kütüphaneleri kullanılır.	Aptamer boyutunu küçültme çalışmalarında
Mirror-image SELEX	Doğal bileşenlerin enantiyomerleri seçimde kullanılır	Nükleaz ataklarına karşı dirençli aptamer hazırlanmasında
Covalent SELEX	Protein hedefi ile kovalent çapraz bağlı oligonükleotit seçimlerinde kullanılır.	Fotoaptamer oluşumunda ve mikroçip çalışmalarında
Toggle SELEX	Seçim basamağında çeşitli protein hedef değişiminde	Çeşitli seviyelerde aptamer özgünlüğü oluşturma çalışmalarında
Blended SELEX	Protein hedeflerinin belirli ligandlarına kovalent olarak bağlanan oligonükleotit kütüphaneleri kullanılır	Protein hedeflerinin belirli bir bölgeden seçilimi çalışmalarında
Conditional SELEX	Düzenleyici molekül varlığında seçimde kullanılır.	hedefe bağlanan sinyal aptamerlerinin düzenleyici moleküllere bağlı olarak bağlanma özelliğinin düzenlenmesi

Çizelge 2.1. Çeşitli SELEX yöntemlerin Özellikleri ve Uygulamaları.

2.2.2. Aptamerin Avantajları

Moleküler tanımlama özelliklerinden dolayı aptamerler 'kimyasal antikolar' olarak adlandırılırlar [19]. Antikoların moleküler tanımlamada geniş aralıktaki uygulama alanlarına birçok katkısı mevcuttur. Antikor kullanımı oldukça pratik olduğundan dolayı, monoklonal antikor (sadece bir tek antijen belirleme fonksiyonel grubu bulunduran antikor) teknolojisi, ilk keşiften sonra, oldukça popüler olmuştur ve dünyanın her köşesinden araştırmacılar tarafından ilgilenilen bir konu haline gelmiştir. Monoklonal antikoların birçok avantajı olmasına rağmen çalışmalarda bazı sınırlandırmaları şu şekilde sıralanabilir [20]:

- Antikor belirleme işlemi hayvanlarla başlayan bir işlem zinciridir. Hayvanlar üzerindeki toksik etkileri nedeniyle üretim işlemleri oldukça zor basamaklardan oluşmaktadır.
- Özellikle antikolara bağlanma afinitesi düşük olan antijen yapılarının monoklonal antikor yapıları ile belirlenmesi zorlaşmaktadır.
- Genel olarak 'hibridoma' olarak bilinen antikor oluşturan hücrelerin üretiminin sıçanlar ve farelerle sınırlı olması, tedavi uygulamalarında antikor kullanımında sınırlamalar getirir.
- Monoklonal antikoların laboratuvar ortamında üretilmesi ve belirlenmesi hem iş gücü açısından hem de maliyet açısından oldukça güçtür.
- Antikor üreten hücrelerin kazara kayıplarının ve hücre ölümlerinin üstesinden gelmek için çoklu olarak saklanmaları gerekmektedir.
- Aynı antikoların performansı çeşitlilik gösterebilir. Her bir yeni antikor bağışıklık denemeleri (immunoassay) ile yeniden optimize edilmelidir.
- Antikor üretiminde hücre içi (in vivo) çeşitlilikler olmasına rağmen, antikoların belirlenmesi in vivo parametreler yüzünden sınırlanmaktadır. Diğer bir deyişle, antikoların belirli hedefler için belirli fizyolojik koşullar dışında belirlenebilmesi çok mümkün değildir.
- Antikor-hedef etkileşiminin kinetik parametreleri, talebe göre değiştirilememektedir.

- Antikorlar sıcaklığa karşı hassas olup, yüksek sıcaklıkta tersinmez denatürasyona uğramaktadırlar.
- Antikorların raf ömrü sınırlıdır.

Antikorların bu sınırlandırmalarını engellemek için çeşitli yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda fazlarda peptit kütüphanesi oluşturmak [21], ribozom [22], antikor mühendisliği [23], in vitro immobilizasyon yaklaşımları yürütülmektedir.

Antikora alternatif olarak aptamerlerin kullanılmasıyla bu sınırlamaların üstesinden gelinebilmektedir. Aptamer kullanımının avantajları incelenecek olursa;

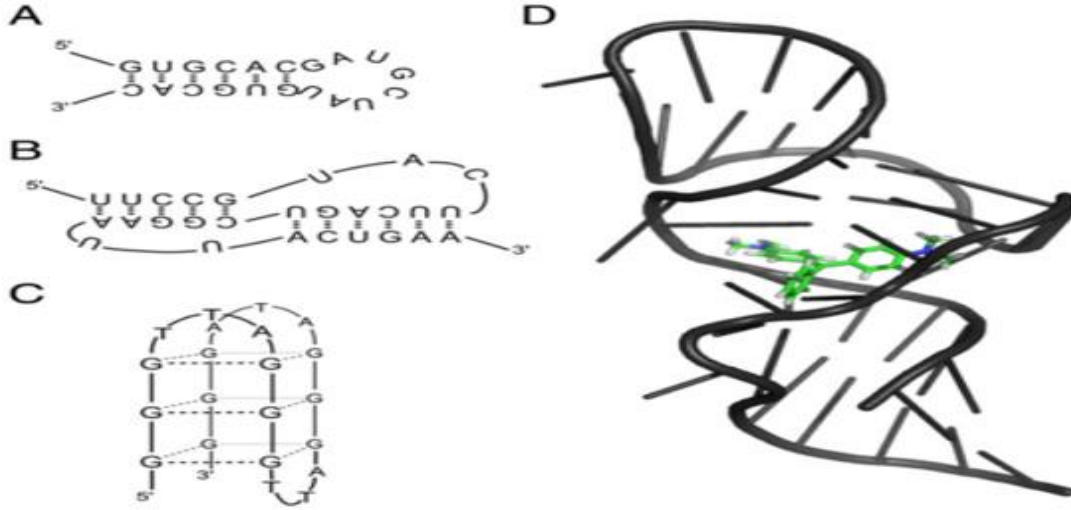
- Aptamerler herhangi bir in vivo ortama gerek kalmadan in vitro işlemlerle belirlenip sentezlenebilir.
- Seçim koşulları, in vitro teşhisi için arzu edilen özelliklere sahip aptamer elde etmek için manipüle edilebilir. Örneğin aptamerler hedef yapılarına fizyolojik olmayan tamponlarda bağlanabilir ve fizyolojik olmayan sıcaklıklarda kullanılabilir.
- Hayvanlarda veya hücrelerde toksit etkisi olmadığı için güzel immün cevabı olmayan molekküllerin belirlenmesi için kullanılmaktadır
- Aptamerler yüksek kesinlik ve yeniden üretilebilirlikde kolaylık gibi özellikleri ile istenilen dizilimde kimyasal olarak üretilirler [19]. Yüksek saflıkta ve kimyasal olarak sentezlenebildikleri için antikorlardaki gibi performans değişikliği gözlenmemektedir.
- Biotin, floresein gibi raporcu molekküller aptamere bağlanarak, aptamerler pratik olarak tanı ajanı olarak kullanılabilir. Fonksiyonel gruplar ya da raporcu molekküller aptamer üretimi sırasında ya da sonrasında yapıya bağlanabilmektedirler.
- Aptamerler de denatürasyona maruz kalırlar ancak bu denatürasyon tersinirdir. Denatüre olduktan sonra fonksiyonel gruplar yapıya kolaylıkla tekrar takılabilmektedirler.
- Aptamerler uzun raf ömürlerine sahiptirler ve istenilen sıcaklıkta taşınabilirler [19].

- Aptamerler sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi fiziksel faktörlere daha dayanıklıdır.
- Aptamerler doğal oligonukleotit yapısında olduklarından fazla miktarda alınsa bile toksik etki yaratmamaktadırlar [24].

Aptamerin üstün özelliklerine ve antikorlara karşı üstünlüklerine örnek olarak Teofilin yapısı ile etkileşimleri incelenebilir. Doğal bir alkaloid olan teofilinin akut ve kronik astım semptomları için potansiyel tedavi edici ajan olabileceği düşünülmektedir. Ancak yüksek derişimlerdeki teofilinin canlılarda ciddi toksik etkileri olduğu için serumdaki derişimini öğrenmek oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra teofilin alkaloid sınıfındaki kafein ve teobromin'e yapıca oldukça benzemektedir ve bu yapılarında serumda bulunması teofilin tayinini zorlaştırmaktadır. Hassas bir teofilin teşhisi için, kullanılan ajanların teofiline hassasiyet göstermesi ancak diğer iki yapıya göstermemesi gerekmektedir. Teşhis amaçlı kullanılan monoklonal antikorlar teofiline özgünlük göstermenin yanında kafeine ve teobromine de özgünlük gösterdiği için teofilin sinyallerini % 0.2-0.3 arasında arttırmaktadır. SELEX işlemi uygulanarak teofiline özgü sentezlenen RNA aptameri kullanıldığında ise teofilin bağlayan RNA yapısının kafeini 10^4 kat daha az bağladığı deneylerle kanıtlanmıştır ve deney sonuçları teofilin hedef yapısı için aptamerlerin antikorlardan daha özgün çalıştığını göstermektedir [25].

2.2.3. Aptamerin Yapısal Özellikleri

Aptamerlerin diğer çift sarmal nükleik asit yapılarından farklı olmasını sağlayan temel özellik; hedef yapıya tam anlamıyla bağlayıcı olmak için sahip oldukları özgün üç boyutlu yapıları ve bu yapılarda bulunan 'stem loop' adı verilen cep'lerdir [20]. Stem looplar; tek sarmal yapının uzaysal yönlenmesi ile uç kısmının tek sarmalın karşısına gelmesi ve sarmalda bulunan bazların karşına gelen baz ile eşleşmesi sonucu meydana gelen çifte sarmal ve bu sarmalın ucunda eşleşmemiş bir ilmikten oluşur. Aptamerler bu özgün üç boyutlu yapılarını sulu çözeltilerde korumaktadırlar ve hairpin, pseudoknot ya da G-quadruplex gibi çeşitli aptamer motifleri [10] genel olarak ya X ışınları kromatografisi [26] ya da NMR' da [27] belirlenmektedir. Aptamerin bu üç boyutlu yapısı ve ligand içeren konformasyonel değişiklikleri divalent katyonlara bağlıdır.



Şekil 2.3. Aptamer ikincil yapılarının şematik gösterimi. (A) Hairpin, (B) Pseudoknot, (C) g-quadruplex ve (D) aptamer-hedef yapı etkileşiminin üçboyutlu gösterimi [10].

Aptamerlerin genel olarak sahip oldukları yapısal motifler aşağıda belirlenmiştir;

- 1) Hairpinler: RNA ve DNA aptamerlerinde en yaygın olarak görülen ikincil yapılardan birisidir. Nükleik asit dizilimi uzun bir yol izleyip bir bölgede boğum oluşturduktan sonra tekrar çizgi halinde bir yapı aldığı için üç boyutlu görünüm olarak saç tokasına benzediği için bu şekilde isimlendirilmiştir (Şekil 2.3.A)
- 2) Pseudoknotlar: Bu yapı hairpin loop dizilimi ile sağ ya da sol taraftaki hairpinlerin birleşmesi ile oluşmaktadır. (Şekil 2.3.B) Bu yapı RNA aptamerlerinde oldukça sık karşımıza çıkmasına rağmen DNA aptamerlerinde çok fazla görülmemektedir [28].
- 3) Dört zincirli yapı (Kuadrupleks, quadruplexes): Kural gereği bu yapı guanin nükleotitlerinin karşılıklı olarak gelerek aynı düzlemde bulunması ile oluşan yapıdır (Şekil 2.3.C). G-quadrupleks' deki herbir guanin bazı komşusu olan iki bazla hidrojen bağı yapmaktadır. Genellikle bu yapı 2 ya da 3 guanin bazının aynı düzlemde olması ile başarılı olmaktadır. Bu yapı basit yapısal motiflerle karşılaştırıldığında oldukça karardır. Buna ek olarak iki quadrupleks yapısı arasında konan K^+ iyonu yapıya ekstra kararlılık katmaktadır. Kuadrupleks yapısı genel olarak DNA aptamerlerinde gözlenmesine rağmen bazen RNA ligandı olarak da gözlenebilmektedir [29]. Bu durumlar kuadrupleks yapısının aptamerin temel motiflerinden biri olduğunu göstermektedir.

Aptamerlerin bu yapısal motiflerinin hedef yapı ile van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşim gibi ikincil etkileşimlerine bağlı olarak hedef molekül ile aptamer arasındaki ayrışma sabitleri pikomolar seviyeden nanomolar seviyelere kadar hedef proteine bağlı değişmektedir. Küçük organik yapıların ayrışma sabiti genellikle mikromolar seviyelerine kadar çıkabilmektedir. Hedef yapı protein gibi makromoleküler yapı olduğunda bile ayrışma sabiti 2.0 nM gibi çok düşük miktarlardır [13].

2.2.3.1. Aptamer Modifikasyonu

Aptamerler hücre dışı seçim işlemi ile üretilmelerine rağmen, canlı hücrelerdeki proteinleri yüksek afinite ile bağlamada oldukça başarılıdırlar. Bu yapıların hücre içi kararlılığını sağlamak için ayna görüntüsü analogu, şeker fosfat yapılarında modifikasyonlar ve uç grup modifikasyonları uygulanmaktadır. Uç grup modifikasyonunda aptamerlerin biyolojik sıvılar içerisinde daha uzun bozunmadan kalması için 2'-NH₂ ve 2'-F fonsiyonel gruplarla pridin modifiyesi yapılmaktadır [20]. Örneğin aptamer uç gruplarının 2'-aminopyrimidine modifikasyonuna uğratılıp vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) olan proteine bağlanmasına dair çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmada; Pürin yapılarında 2'-OH yapılarına rastlandığı için çeşitli kimyasal yöntemlerle pürin yapısının 2' ucu metoksi grubu ile modifiye edildikten sonra modifiye edilen yapıların VEGF in bağlanmasını arttırdığı gözlemlenmiştir [30]. Başka bir modifikasyon çeşidi olan 2' metoksi grupları aptameri alkali hidrolizine karşı korumaktadır. Yapılan başka bir çalışmada ise 24 oligomerli aptamer yapısının 13 oligomeri modifiye edilmiştir. Bu modifiye edilen birimlerden 4 oligomer değişmemesine rağmen 9 birimde gerçekleşen değişimin pürin yapısının bağlanma afinitesinde değişikliğe sebep olduğu gözlenmiştir. Çalışmadaki sonuçlar modifiye edilmiş aptamerin afinitesinin ayrışma sabiti 0.14 nM civarında olduğunu ve ayrışma sabiti oldukça düşük olan bu aptamerin VEGF proteinine oldukça yüksek miktarda bağlandığını ve bunun sonucunda özellikle insan göbek bağı vasküler endotel büyüme faktörünün reseptörlere bağlanmasını bloke ettiğini göstermiştir [31].

Başka bir çalışmada ise biyokararlılığı sağlamak için T7 RNA polimeraz 2'amino modifiye ve 2' floro modifiye edilen primidin ile birleştirilmiştir [32]. Çok yakın geçmişte yapılan bir başka çalışmada 2'metil-primidin bağlanan RNA polimeraz yapısının daha etkili olduğu bulunup sonuçlarda biyokararlılığın arttığı gözlemlenmiştir [33]. 4'-tiyol primidinler de RNA nükleotit yapıların kararlılığını arttırmak için kullanılmaktadırlar [34]. Aptamer yapıların uç grup modifikasyonunun yanı sıra yapısındaki şeker gruplarının

L- ve D- formunu kullanarak daha özgün bir ayırma sağlamaktır. Bu çalışmalar arasındaki en başarılı yaklaşımlardan biri de L-riboz bazlı nukleotitler kullanılarak oluşturulan “Spiegelmers” adlı biyokararlı yapılardır. Bu yapılar biyolojik hedefi enantiyomerine karşı oluşturulan D-riboz dizilimleridir [18]. Ayrıca yaygın olarak henüz kullanılamamasına rağmen; 3'-3'- dinükleotit yapılar, daireleştirme ve disülfid çapraz bağlayıcıda aptamer stabilitesini arttırmak için kullanılan yapılar arasında gösterilebilmektedirler.

2.2.4. Aptamerin uygulamaları

Aptamerin hedef molekülü ile yüksek özgünlükte etkileşmesinde rol oynayan yapısının dikkat çekmesinin ardından nükleik asit aptamerlerinin, teşhis ve tedavi edici potansiyel biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek eşsiz yapılar olabileceğini gösteren çalışmaların geliştirilmesi hız kazanmıştır.

- **Saflaştırma ve biyoteknoloji;**

Yüksek özgünlüğe sahip, yeniden kullanılabilir moleküllerin en yaygın kullanım alanlarından biri afinite saflaştırma basamağıdır. Aptamerlerin avantajlarından biri de katı yüzey üzerinde türetilebilmeleri sayesinde hedef proteini birkaç adımda saflaştırmayı sağlamaktır. Bu özellikleri sayesinde birbirine benzeyen ligandlar birbirinden ayrılabilirlerdir. Bu yaklaşımın örneklerinden birisi, anti-selektin aptamerinin bir yüzeye tutturulması ile Çin hamsterinin yumurtalık hücrelerindeki selektin-reseptör globülünün saflaştırılması çalışmasıdır [35]. Bu füzyon proteininin saflaştırılmasında 15000 kat saflaştırılma sağlanmış olup tek basamakta %85 geri dönüşüm rapor edilmiştir.

Aptamerler saflaştırma uygulamaları olarak o kadar başarılıdır ki; molekül formülleri aynı olan kiral moleküllerin farklı fiziksel özellikteki enantiyomerlerinin birbirinden ayrılarak saflaşmasını sağlamaktadırlar [36]. Yapılan birçok yayında D-aminoasitlerin protein temelli bozunma işlemi ile birlikte potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Oligopeptitlerin kiral yapılarının birbirinden ayrılmasının son derece önemli olduğunu düşünen Michaoud ve arkadaşları aptamer yapıları kullanarak bir antidiüretik hormon olan vasopress hormonunun D enantiyomerini yüksek saflıkta L enantiyomerinden ayırmayı başarmışlardır [36].

Aptamerler aynı zamanda 'kapiler elektroforez' yönteminde durgun faz olarak kullanılmaktadırlar [37]. Aptamer yapılarının bu alanda kullanılmasıyla Tirozin ve Triptofan amino asitlerinin ayrılması sağlanmıştır.

Aptamerler hedef moleküllerin üç boyutlu yapıları ile etkileştikleri için proteinlerin doğal yapılarını denatüre yapılarından ayırmayı da sağlamaktadırlar. Denatüre olan proteinin kapalı üç boyutlu yapısı bozulup fonksiyonunu yerine getiremez hale gelmektedir. Proteinin temel fonksiyonlarını yerine getirmesi için; denatüre olan proteinlerin denatüre olamamış proteinlerden ayrılması önemlidir. Aptamerler bu noktada doğal proteini denatüre proteinden ayırma çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Birçok kanser çalışmalarında hücrelerin anormal olduğunu işaret eden belirteç moleküller proteinlerdir. Bu çalışmalar sırasında proteinlerin doğal formunun değiştiği ve mutasyona uğrayarak fonksiyonunu kaybettiği görülmüştür. Fonksiyonlarını kaybeden protein yapılarını belirlemek ve ayırmak için aptamer yapıları kullanılmaktadır [38].

- **Teşhis ve biyosensör;**

Yüksek afinite ve özgünlükteki aptamerler ideal teşhis araçlarıdır. Aptamerlerin teşhis amaçlı olan birçok uygulaması; ligand bağlandığında aptamerde oluşan konformasyonel değişikliklere dayanmaktadır. Bu konformasyonel değişiklikler, aptamere bağlanan çeşitli boyalar, floresans, fosforesans özelliği olan yapılar sayesinde belirlenebilir. Birçok alanda 'aptamer beacons' olarak adlandırılan bu yapılar çevre kirliliği belirlemeden kandaki ilaç seviyesini belirlemeye kadar birçok alanda kullanılırlar [18].

Birçok araştırma grubu molekülleri veya hücreleri daha ucuz, daha hızlı, daha hassas yöntemlerle tayin edebilmenin yolunu aramışlardır. Medikal uygulamalar için mükemmel bir biyosensör yüksek özgünlükte, yüksek hassaslıkta, tekrarlayabilen, hızlı ve kolay okunabilen özelliklere sahip olmalıdır. Aptamer yapıları da bu gerekliliklerin birçoğunu sağlamaktadır. Vücut sıvısındaki birçok toksin, ilaç ve metabolit çok düşük derişimlerde olmamak şartıyla aptamerin hedef çeşitliliğinin oldukça geniş bir aralıkta olması sayesinde analiz edilebilmektedir. Nicel değerlendirmenin dışında bazı tümör hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan aptamer temelli problemler sayesinde kanser tedavisinde umut vadeden çalışmalar mevcuttur [10].

Çok çeşitli DNA aptamerleri üretilmesi ile küçük hücreli akciğer kanseri, küçük olmayan hücreli akciğer kanseri (NSCLC), akut miyeloid lösemi (AML), karaciğer ve kolon kanseri, aynı zamanda, virüs ile enfekte olmuş hücreler gibi çok sayıda kanser hücresi rapor edilmiştir [38][40,41]. Benzer stratejiler kullanılarak; mezenkimal kök hücreleri adı verilen hücrelerin bağ dokularında bulunan, erişkin haldeki kök hücreleri [42] ve canlı bakteri hücreleri [43] çalışmalarında kullanılan aptamerler son yıllarda rapor edilmiştir. Üstün hedef yakalama performansı ile bu yapılar, anti-enfektif maddeler [44], antikoagülasyon, anti-inflamatuar [45], anti-anjiyogenez [46], anti-çoğalma [47] ve bağışıklık tedavisi [48] gibi alanlarda temel moleküler tanımlama aracı olarak kullanılmaktadırlar.

Aptamerin teşhis alanındaki uygulamalarına örnek olan başka ilginç bir çalışma, aptamerin altın nanoparçacıklara bağlanması ve ligandlarıyla etkileşiminin incelenmesidir [49]. İncelenilen bu çalışmada altın yüzey üzerindeki aptamere ligandın bağlanması ile aptamerde konformasyonel değişiklikler meydana gelir ve bu durum aptamerin altın yüzeyinden kopmasına ve altın yüzeyin agrage olmasına sebep olmaktadır. Bu kopma etkisi nanoparçacığın absorbans özelliğidir ve bunu sonucunda yapıda renk değişimi olur. Bu renk değişimi sayesinde aptamerin hedef yapıyla etkileştiği anlaşılır ve dolayısı ile hedef yapının teşhisi sağlanmaktadır.

Zelada-Guillen ve arkadaşları ise biyoreseptör olarak aptamer ve iletken olarak karbon nanotüp kullanmışlardır. Bu sayede 'Salmonella Typhi' adı verilen bakteriyi tespit edebilecek bir biyosensör geliştirmişlerdir [50]. Araştırmacılar geliştirdikleri biyosensör ile 5 mL' lik sıvı içerisindeki yaşayan bakteriyi yüksek duyarlılıkta ve özgünlükte tespit edebilmişlerdir. Kantitatif ölçüm de yapabilme kapasitesine sahip bu biyosensör; aptamer ve bakteri arasındaki bağlanmayı 60 saniyeden kısa sürede gösterebilmektedir. Diğer bir çalışmada; serumda Hepatit C virüsünün (HCV) NS5 kor antijenini, RNA aptameri ile yüksek özgüllükte tespit edilebilmiştir [51].

▪ **Terapi (Tedavi) ;**

Nükleik asitleri tedavi ajanı olarak kullanma fikri yeni değildir. 1990 yılında yapılan çalışmada 'RNA decoys' adı verilen yapılar kullanılarak HIV'in (Human Immunodeficiency Virus /İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) çoğalmasını önlemeyi başarmışlardır [52].

Buna rağmen aptamer teknolojisi ancak 15 yıl sonra klinik uygulamalarda kullanılmıştır. Teşhis amaçlı birçok çalışmada kullanılan aptamer, tedavi amaçlı kullanımda da yüksek potansiyele sahiptir.

Potansiyel tedavi hedefleri iki sınıfa ayrılmaktadır; transkripsiyon faktörü gibi intraselüler hedefler, virüsler gibi ekstraselüler hedefler. Ekstraselüler hedeflere karşı aptamerler damar içi ya da deri altından uygulanabilirler. İnsanlardaki farmokokinetik çalışmalarda bu yolla uygulanan RNA'nın vücut boyunca kolayca dağıldığı ve hücreler tarafından kolayca alındığı görülmüştür [53]. Bu basit yaklaşımın birçok avantajı vardır. En büyük avantajı; aptamerlerin kolayca fonksiyonel durumunun hazırlanıp hastaya direk enjekte edilebilir olmasıdır. Buna rağmen; RNA'nın bozunması ve bölünmesi kaçınılmaz olduğu için tedavi tamamlanana kadar tekrarlanan uygulama devam etmelidir.

Aptamerlerin intraselüler hedeflere ulaşımı; intramer denilen hücre içinde de aktif olan aptamer kompleksleri ile sağlanmaktadır. Bu tarz 'intramer' ler aptamerin dönüştürücü hücreler ile kodlanması ile oluşturulur. Hücrelerin transfekte (Ökaryotik hücrelere genetik materyalin viral olmayan yöntemlerle aktarılması işlemi) olmasının ardından aptamer oluşumu olur. Bu da teoride uzun zamanlı tedavi sağlar. İntramer denilen yapıları oluşturmak için en genel yaklaşım; aptamer ve lipoprotein ya da polietilen-glikol [54,55], kolesterol, biyotin-streptavidin [56] gibi büyük yapıları aptamere tutturaktır. Bu yapılar 3' ya da 5' ucundan aptamere takılmaktadır. Yapılan çalışmaların sonucunda bu yapıların aptamerin böbrekler yoluyla atılmasını azalttığı ve bu sayede plazmadaki yarı ömrünü attırdığı görülmüştür. İntramer yapılarının yanında aptamer yapılarının uç gruplarının modifikasyonu ile biyokararlılık sağlanarak aptamerlerin in vitro hedeflerde kullanılabilmesi sağlanmaktadır.

Bilinen en ünlü tedavi edici aptamer olan Macugen ya da Pegaptanib, vasküler endotel büyüme faktörüne (VEGF) bağlanmaktadır. 2004 yılında İlaç ve Gıda birliği; aptamer uygulamalarında bir dönüm noktası olan, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (gözdeki sarı noktadaki bir alanın bozulması) için tedavi amaçlı kullanılan Eyetech/Pfizer's aptamer (Macugen)' i onaylamıştır. VEGF seviyesi, yaşa bağlı olarak gerçekleşen makula dejenerasyonu ve diyabetik retinopatri ile değişerek düzensiz hale gelir. Hastalarda yaşa bağlı makula dejenerasyonu (**A**ge-related **D**egeneration **M**acular -

ADM) ya da diabetik retinopati görme kaybına neden olur. Bu nedenle VEGF' i inhibe ederek hücre sel ya da dokusal dejenerasyonu engellemek gerekir. Macugen yapısı hücre içindeki VEGF' e bağlanarak bu proteinin aktifliğini yok eder ve hücrenin büyümesini engeller [24].

Macugen' in ilaç olarak kabul edilmesinden sonra aptamerin tedavi amaçlı kullanımı büyük bir araştırma konusu olmuştur. Örneğin; çeşitli gruplar Alzheimer hastalığı ile ilişkisi olan A β -peptid gibi amyloidogenik proteinlerine karşı aptamerlerle tedaviyi amaçlayan çalışmalar yürütmektedirler [57].

▪ **Enfeksiyonlarla savaşılan ajanlar;**

Aptamerler aynı zamanda anti-enfeksiyon ajanlarıdır. Eğer önemli bakteriyel proteinler ya da bozuk hücre membran formları hedef yapı olarak seçilirse DNA' lar da antibiyotik fonksiyonları gösterebilirler. Aptamerler aynı zamanda özellikle patojenler için antibiyotik ajanların bağlanması ve taşınımı konusunda ' hedefleme sistemi' olarak kullanılırlar. Aptamerlerin enfeksiyon alanından inhibitör olarak kullanılmasına örnek olarak kronik viral HIV virüsüne bağlanan aptamer çalışması gösterilebilir [58]. Bu çalışmada aptamer yapıları HIV virüsünün yüzeyindeki protein yapılarına bağlanarak özgün tanıma sağlanmaktadır. Birden fazla aptamer bu protein yapılarına bağlanarak virüsü etkisiz hale getirmektedir

2.2.5. Aptamer –Hedef Ligand etkileşimi

Bu güne kadar yüksek afiniteli aptamerlerin belirleyebildiği hedef çeşidinde bir sınırlama olmamıştır. Metal iyonları, organik boyalar, ilaçlar, aminoasitler, kofaktörler, amino glikozitler, antibiyotikler, nükleotit baz analogları, nükleotitler, peptitler bunlardan sadece birkaçıdır. Aptamerler küçük moleküler hedeflere bağlanabilmesinin yanında; proteinler, enzimler, büyüme faktörleri, antikolar, gen düzenleme faktörleri, hücre adezyon molekülleri, lektinler, bütün haldeki viral partiküller ve patojenik bakteriler ile de yüksek afinite de kompleks oluşturabilmektedirler.

Aptamer kompleksinde hedef ligandın nükleik asit tarafından özgün olarak tanınması; ligandın büyük bir bölümünün sarılması ile olur. Ligandın etrafındaki katlanmış yapıdaki nükleik asit; intramoleküler etkileşimler sayesinde yüksek derecede ayırma sağlamaktadır. Liganda bağlı olarak ayırma çeşitli şekillerde olabilir. Bir örnek olarak Amonyum mono fosfat (AMP) ile aptamerine bakılacak olursa AMP molekülü ile aptameri arasında özgün hidrojen bağı oluşarak seçici bağlanma olur [59]. Aminoasit-

aptamer komplekslerinde de hidrojen bağları etkin rol oynar [60]. Aminoglikozid antibiyotikleri ile aptamerleri arasındaki elektrostatik ve hidrojen bağları gibi ikincil etkileşimler sayesinde bağlanmada üç boyutlu bütünlük sağlanır [61]. Ligandlar daha karmaşık olduğu zaman, yani peptit-aptamer ve protein-aptamer gibi komplekslerde; katlanma tamamlanması, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı gibi belirleyici karşılıklı etkileşimler sayesinde özgün tanınma sağlanır [62].

2.2.5.1. Aptamerlerin küçük yapılara bağlanması

İlk olarak aptamerlerin hücre yüzeyindeki oligosakkaritlere bağlanmasına bakılacak olursa, Yang ve arkadaşları selülozun tekrarlanan birimi olan dissakkarite selobioz yapılarını aptamer sayesinde belirlemeyi başarmışlardır [63]. Bu yöntem oldukça basit ama bir o kadar da etkilidir. DNA havuzu selobioz yapısı ile inkübe edilip bağlanmayan dizilimler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Bağlanmış aptamer yapısı selobioz ile tekrar inkübe edilerek en iyi bağlanan aptamer bulunmaya çalışılmıştır. Dikkate değer bir şekilde, aptamerler, selobioz, yapılarını ayrışma sabiti Kd değeri 0,1 ile 10 µM arasında olacak şekilde bağlanarak tanımaktadırlar ve aynı çözelti içindeki bu yapıya benzeyen laktoz, maltoz gibi yapılarına bağlanmamaktadırlar.

2.2.5.2. Aptamerlerin antibiyotikleri tanınması

RNA molekülünün birçok biyolojik aktivitesi aminoasit, peptit, pseudoantibiyotik gibi çeşitli küçük kimyasal moleküllerle etkileşim içinde olduğunu göstermektedir [64]. Bu etkileşim; ribozom yarıma reaksiyonlarına ve ribozomal protein sentezinin inhibe olması gibi RNA fonksiyonlarının engellenmesine sebep olabilir. Bu antibiyotiklerin birçoğu RNA fonksiyonlarını inhibe etmesinin yanında belirli koşullar altında RNA fonksiyonlarını simüle edebilirler.

Antibiyotik bağlayan aptamerlerin hücre dışı (in vitro) sentezi RNA' nın bu yapılarla etkileşimini anlamak açısından oldukça önemlidir. Wallis ve arkadaşları bir antibiyotik türü olan viomicin yapısını bağlayan RNA yapısının 74 nükleotit içeren RNA kütüphanesinden hücre dışı seçim yöntemi ile izole etmeyi başarmışlardır [65]. Wilson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda aptamerlerin yüksek ayırıcılığı ile önemli bir antibiyotik türü olan streptomisini türevlerinden ayırmayı başarmışlardır [66]. Yadav ve arkadaşları ise bir başka antibiyotik türü olan kloramfenicol yapısını aptamer-polimer temelli elektrosensör sayesinde belirlemeye çalışmışlardır [67].

2.2.5.3. Aptamerlerin aminoasitleri tanınması

Aptamerler hedef yapı olarak aminoasit yapıları seçildiğinde de oldukça yüksek özgünlük ile bağlanmaktadır. Öyle ki, in vitro ortamda, hedef yapısı aminoasit olan aptamerler ortamda hedef yapıya oldukça benzeyen başka aminoasit yapılarının olmasına rağmen sadece hedef aminoaside bağlandığı çeşitli deneylerle kanıtlanmıştır. Örneğin Arjinin yapısı; kendisine çok benzeyen L- Sitrülin yapısından aptamer yapıları sayesinde ayrılabilir. Sitrülin yapısı arjinindeki bir amino grubu yerine bir keto grubuna sahiptir. Bu durumda Arginindeki 'guanidine' adı verilen üçlü amino grubu yapısını pozitif yüklü olmasına rağmen sitrülin yapısındaki üre grubu nötraldir ve bu elektrostatik fark dolayısı ile aptamer yapısı L- Sitrülin yerine Arjinine bağlanmaktadır. Arjinin bağlanmakta kullanılan RNA motifleri genellikle 6-10 nukleotit içerir. Bütün üyeler benzer ikincil yapıya sahip olup eşleşmemiş yapılarında iki stem loop bulunur. Bu yapıların Kd değeri L- sitrülin yapısı için 65 μ M olup arjinin için bu değer 56 μ M' dır . Bu değer aptamer yapılarının arjinine daha yüksek seçicilikle bağlandığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar arjinin aptamerinin L- sitrülin yapısının enantiyomeri olan D- sitrülin yapısına düşük afinite gösterdiğini ortaya koymuştur [25].

Bazı oligonükleotit-protein etkileşimlerinde hidrofobik yan zincirler önemli bir etkidir. Bu tarz hidrofobik etkileşimlerde oligonükleotit yapısının hedef yapıyı tanıyabilmesi için metil grubuna sahip timin yapılarına ihtiyaç vardır. Bu sebepten dolayı modifiye edilmemiş RNA yapısı kullanılamaz. Yarus and Majerfeld valin bağlayabilmek için RNA yapısı seçmişlerdir [25]. RNA yapısının agaroz içinde L-valinamide yapısı ile ayrışması gerekmektedir. Yüksek afiniteye bağlanan valin için sentezlenen RNA yapıların tahmin edilen ikincil yapıları iki G-U çifti içeren burgulu looper bulunduran yapılardır. Bu yapılar D-valin yapısı karşısında L-valin yapısına 15 kat daha fazla seçicilik olmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu yapı valindeki metil grubu yerine oksijen bulunduran treonin yapısına da yapısal benzerlik göstermesine rağmen bağlanmamaktadır. Bu yapı hidrofobik yan zincirleri olan losin ve izolosinin gibi yapılardan ve kendinden daha küçük boyutta olan alenin gibi yapılardan kolaylıkla ayrılmasını sağlamaktadır.

2.2.5.4. Aptamerlerin oligosakkaritleri tanınması

Oligosakkaritler çeşitli pozitif yüklü amonyum grupları sayesinde bakterilerin ribozomal RNA'sına özgün olarak bağlanırlar. Hepatit delta virüs, hammerhead ribozim, gibi bazı katalitik RNAs yapıları hedef aminoglikozitlere bağlanırlar. Aminoglikozid aptamerleri

hücre içi fonksiyon gösterirler. Ökaryotik mesajcı RNAs 'lar çevirim/ dönüşüm olmayan ucuna ilaç bağlanarak gen ifade kontrolünde kullanılır. Aminoglikosakkarit aptamerlerinin ikincil yapıları farklı olmasına rağmen ligand-RNA etkileşimi temelde aynıdır. RNA aptamerinin katlı yapısındaki negatif yükler bir bağlanma bölgesi oluştururlar. Öbür taraftan da oligonükleotitin uç boyutlu yapısındaki pozitif yüklü amonyum grupları aptamerin bağlanma bölgesindeki negatif yüklerle elektrostatik etkileşime girerek bağlanma sağlarlar [60].

2.2.5.5. Aptamerlerin peptit ve proteinleri tanınması

Aptamerlerin proteinleri tanınmasındaki üstünlük aslında bu makromoleküllerin doğal yapısından kaynaklanmaktadır. Proteinlerdeki 20 farklı aminoasit ve bunların farklı sıralarda dizilimi bağlanma bölgesinde çoklu etkileşime neden olarak üç boyutlu yapı bütünlüğü sağlamaktadır. Nükleotit içeren aptamerler yapısal olarak daha üniform oldukları için rastgele ligand bağlanma olasılığını düşürürler. Moleküller arası hidrojen bağları ve genel asit-baz etkileşimleri proteinler ile aptamerler arasında olurken protein-aptamer etkileşimi esas aptamerin kendi içindeki nükleotit dizimine bağlı olarak oluşan katlanmalara ve bükülmelere bağlıdır [60].

Peptit RNA aptamerinin stem loop denilen boşluğuna yerleşerek baz çiftleri arasında etkileşime girmektedir. Buna ilaveten peptitteki arjinin aminoasidindeki guanidinium grupları ile RNA' daki fosfat grupları arasında intermoleküler etkileşim olarak aptamer-peptit kompleksi stabilize olur. Aptamerdeki 'stem loop' denilen uzaysal boşluk guanin bazı ile peptitteki arjininin guanidinium grupları arasında hidrojen bağı oluşarak özgün bağlanma sağlanır. DNA aptamerinin çözelti içerisinde ve insan trombin proteinine bağlanmış üç boyutlu hali çalışmalarla açıklanmıştır [2]. HIV-1 protein ifadesini düzenleyen 17 peptitli proteine (HIV-1 rev) bağlanan 2 farklı RNA aptameri bulunmuştur [68]. İnsan T hücreci lösemi virüsün tekrarlanmasında görev alan TAX ve REX adı verilen 16 birimlik peptite bağlanarak virüs üretimini engelleyen RNA aptameri çalışmaları da oldukça dikkat çekmiştir [69]. Bir başka örnek olarak; Rev proteininin alfa heliks yapısı ile aptamerdeki stem looplar arasındaki non-kovanlent etkileşimler sayesinde bağlanma olduğunu gösteren çalışmalar gösterilebilir [70].

Birçok protein-RNA kompleksinde; baz çiftleri protein tanımada önemli rol oynar. Bazların bir kısmının yan yana gelmesi ile aptamerin stem looplarının liganda bağlanacağı eşsiz hidrojen bağı bölgeleri oluşur. Rev peptiti ile bakteriofaj yapısında

da triptofan amino asidi ile primidin bazları arasında stem looplara sayesinde özgün hidrojen bağları oluşur. Buna ilaveten RRE peptit yapısındaki asparjin ile pürin baz çiftleri arasında ve triptofan aminoasidi ile primidin baz çifti arasında da yine bir özgün etkileşim söz konusudur [60]. Ayrıca aptamerdeki sitozin bazları triozin aminoasitlerle etkileşime girerler. Bu intermoleküler etkileşim eşleşmemiş bazların loop dışı konformasyonundaki değişikliklere sebep olmaktadır. Aptamer yapısının kompleks oluşumu ile konformasyonel değişikliğe uğramasına örnek olarak; peptit kompleksleri ve proteinle kaplı MS2 bakteriofajlarının aptamere bağlanmasının incelendiği çalışmada kompleks formunun uyumunda çarpıcı farklar ortaya çıkmaktadır [71]. Rev peptidinden farklı olarak protein kaplı MS2 bakteriofajın RNA'ya bağlanması için 'doğal' bağlanma bölgeleri mevcuttur. Aslında proteinin bağlanması ile aptamerin konformasyonunda değişiklikler olmaktadır ve kompleks yapısına geçildiğinde aptamer- protein arasında uyum sağlandığı görülmektedir.

2.2.5.5.1 IFN- γ ve VEGF 'in Biyofonksiyonları ve biyolojik ortamdaki işlevleri

Aptamerin hassiyet ve ayırıcılıktaki başarısı sayesinde aptamer- protein çalışmaları son yıllarda oldukça popüler olmuştur. Özellikle birçok hastalık için belirteç olan proteinlerin aptamer yapıları ile daha hızlı ve hassas şekilde analiz edilebilme imkanı bulunmuştur.

Tez kapsamında, aptamer yapıları sayesinde analiz edilecek iki önemli protein; interferon-gama (IFN- γ) ve vasküler endotel büyüme faktörüdür (VEGF).

Virüs bağılı İnterferonlar (IFN- α/β , tip 1 interferonlar) 1957 yılında ilk defa Isaacs ve Lindenmann tarafından gözlenmişlerdir [72]. Wheelock ve arkadaşları insan lökositlerinde interferon aktivitelerine benzer aktivite gösteren yapılar belirlemişlerdir. Ancak bu yapılar, ne genetik olarak ne de protein seviyesi olarak tip 1 İnterferonlarına benzememektedir. Ayrıca bu yapı virüslere bağılı değildir ve düşük pH' larda aktif değildir. 30 yılı aşan çalışmalar sonunda Tip II İnterferonun çok önemli bir immunoregulator olduğu anlaşılmıştır [72]. Tip II interferon, gama interferon veya immün IFN diye de anılır. Molekül ağırlığı 20000-25000 olan tek aktif IFN- γ türü vardır. IFN- γ tek bir gene bağılı olarak sentezlenir ve diğer interferonlar ile benzerlik göstermemektedir [73].

IFN- γ proteini antiviral (virüs enfeksiyonlarına karşı), antiprolaktive (prolaktin hormonu engelleyici), immuno-düzenleyici özelliklere sahip önemli bir sitokindir. Bu sitokin T-helper (CD4) ve sitotoksik T hücreleri olan immün hücreleri tarafından üretilirler. IFN- γ miktarının belirlenmesi ve tayin edilmesi; hücrelerin immün cevabın neresinde yer aldığının belirlenmesi ve nasıl cevap verdiğinin açıklanması için oldukça önemlidir [74].

IFN- γ 'nın immünodüzenleyici (immünoregülatör) mekanizmadaki görevleri şöyle sayılabilir:

1. Antijen sunumunun artırılması,
2. Fagositlerdeki reaktif oksidan üretiminde kullanılan çeşitli enzimlerin sentezini artırarak hücre içindeki yabancı maddelerin öldürülmesi,
3. İnfektif ajanların (hastalık yapıcı ajanlar) yok edilme kapasitesinin artırılması,
4. Makrofaj aktivitesinin artırılması ve intraselüler antimikrobiyal (hücre içi mikropları öldürücü ajanlar) derişiminin artırılması,
5. Antijen sunan hücrelerin üzerindeki Klas-1 ve 2 MHC molekülerinin sunumunun artırılması,
6. T hücrelerinin farklı hücrelere dönüşerek hücre çoğalmasını engellemesi,
7. Nötrofillerin aktive edilmesi ve doğal öldürücü (Natural Killer, NK) adı verilen immün sistemdeki öldürücü hücrelerin sitolitik aktivitesinin artırılması şeklinde sıralanabilir.

IFN- γ salgılanması ile sonuçlanan T hücre yanıtının tüberküloz enfeksiyonu için özgün belirteç olabileceği düşünülmüştür ve son yıllarda antijen özgün T hücre yanıtını ölçen iki test kullanıma girmiştir. Hızlı "Laboratuvar koşullarında 'Enzim bağlı immuno absorbent ölçüm (In Vitro Enzyme-Linked Immunospot" (ELISpot)), 1990'lı yılların sonuna doğru Lalvani ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Bu test antijen özgün T hücrelerinin sayılması esasına dayanmaktadır. Mikrobakteri tüberküloz enfeksiyonuna sahip bireylerin T hücreleri ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine karşı in vivo olarak duyarlılık kazanmaktadır. ELISpot testinde, periferik kan mononükleer hücreleri tam kandan ayrıştırıldıktan sonra, in vitro ortamda bu antijenlerle bir gece inkübe edilmektedir. Böylece özgün antijenlerle tekrar karşılaşan T hücreleri IFN- γ salgılamaktadırlar. Ertesi sabah koyu spot veren IFN- γ salgılayan T hücreleri büyütücü lens ya da otomatik okuyucuyla sayılıp test değerlendirilmektedir [73].

Diğer bir yöntem, tam kan 'Enzim bağlı immuno absorbent ölçüm (enzyme-linked immunabsorbent assay) (ELISA))' dir. Bu testin ilk versiyonu Quantiferon-TB testinde tam kan in vitro olarak inkübe edilmekteyken, daha sonra geliştirilen Quantiferon-TB Gold testinde, özgün antijenler olan ESAT-6 ve CFP-10 ile inkübe edilen tam kan süpernatantında, 24 saat sonra, T hücrelerinin salgıladığı IFN- γ derişimi ölçülmektedir [73].

Ancak üretimleri, kararlılıkları, modifikasyon olanakları ve fiyatları bu sistemlerin kullanımını kısıtlamaktadır [75]. Ayrıca çoğaltma tekniğine dayalı olan bu sistemler örnekteki protein miktarını tam olarak vermeyip çoğaltılma sonucu oluşan miktarı hakkında yardımcı olmaktadır. Yani direk bir analiz söz konusu değildir.

Ancak kullanılan yöntemin etkinliğine bağlı olarak aptamer yapıları üstün özellikleri sayesinde bu dezavantajları elimine ederek daha hassas ölçüm sağlamaktadır. Örneğin DNA yapısı kullanılarak zeptomolar konsantrasyonundaki protein dedekte edilerek ELISA yönteminden 1000 kat daha hassas bir ölçüm yapılmıştır [76]. Aptamerin, IFN- γ yapısına 74.5 nM gibi çok düşük ayrılma sabiti olan kompleksler oluşturarak yüksek seçicilik ile bağlandığı çeşitli çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır [77].

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri sınıfının bir birimi olan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ailesi, endotel hücreleri için özgündür ve önemli etkileri vardır. Vücutta hem fizyolojik olaylarda, hem de tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik birçok hastalığın etiolojisinde yer almaktadır. Bu yüzden 1980'lerde keşfedildiği zamanlardan günümüze kadar gittikçe artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü olmak üzere altı çeşidi vardır. VEGF-A üyesi en yaygın olanıdır ve İnsan-VEGF'i olarak da isimlendirilir. Hatta bazı yayınlarda VEGF olarak da adlandırılmaktadır. VEGF, endotel hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktadır ve kan damarlarının geçirgenliğini arttırmaktadır. VEGF, dişi yumurtalık (ovaryum follikülleri), akciğer alveolar, böbreğin bir bölümündeki (renal glomerül visseral epitel hücreleri ve böbrek proksimal tübül hücreleri), adrenal korteks aktive makrofaj arteriollerini çevreleyen fibroblast, akciğerlerin bir kısmındaki (bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri), hepatosit hücrelerinde sentezlenir. VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir [78]. VEGF endotel hücreleri için önemli rol oynayan heparin bağlayan anjiyogenik büyüme faktörü olarak karakterize edilmiştir [79]. Bu büyüme faktörü,

özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da yer aldığı görülmüştür. Fizyolojik ve fizyopatolojik birçok olaylarda (Embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıklar vb.) VEGF' in etkin rol oynadığı belirlenmiştir. Faredeki gen bozukluklarını hedefleme çalışmalarında yeni kan damarları oluşumunda merkezi rol alması VEGF' in önemini ortaya koymuştur. Hayvanlarda iki VEGF eşinden birisinin eksikliği kardiyovasküler sistemin gelişmemesinden dolayı ölüme sebep olmaktadır [80]. Bu çalışmalar vasküler sistemin VEGF' in konsantrasyonundaki hassas değişimlere bağlı olduğunu göstermektedir. Embriyo gelişimi sırasında azalan VEGF miktarı fatal dönemde anyogenezin azalmasına sebep olabilir. Hücrenin VEGF sentezini kontrol edememesi birçok anjiyogenesis hastalığa sebep olabilir [79]. Premature bebeklerde göz bozuklukları oluşmasının sebebi olarak gelişimi sağlayan VEGF yapısının yeterli salgılanmadığı ortaya çıkmıştır. Genel olarak yaygın olan anjiyogenezin bir parçası olmayan normal retinal gelişimde ortaya çıkan bu yaygın anjiyogenezin sonucu olarak aşırı VEGF üretimi olmaktadır. Bu aşırı üretim sonucu kandaki VEGF seviyesinin değişmesi ile bebeklerde bazı hastalıklar görülmektedir. Retinanın belirli bölgelerinde olan retinopatinin diğer türlerinde de benzer şekilde görülen aşırı VEGF körlüğe sebep olabilir. VEGF kanser başta olmak üzere romatoid artrit, sedef, proliperaktif retinopati gibi birçok insan hastalığının serumda teşhisi için önemli bir biyobelirteçtir. Örneğin tümör 0,2-2 mm arasında bir boyuta ulaştığında büyümek ve metaztaz için aşırı miktarda besini ve oksijeni kandan alır ki bu da VEGF' in aşırı oluşumu anlamına gelir ve bu durumda aşırı büyük bir vasküler büyüme ağrı oluşur. Bu nedenle, hastanın tam kanı ya da serumu içinde VEGF' in hızlı, seçici ve hassas bir şekilde algılanması, hastalık teşhis ve sonrasındaki tedavi kontrolü için özellikle önemlidir [81].

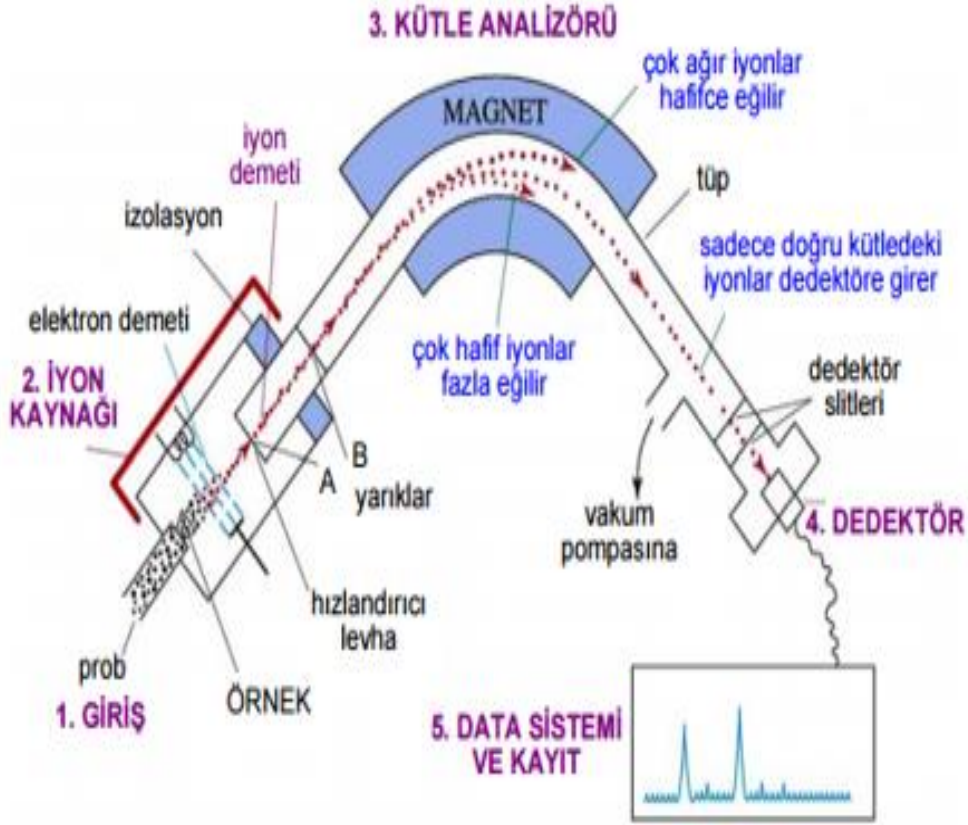
Bu kadar önemli bir proteini hassas olarak dedekte edebilmek için hedef yapıya özgün bağlanan aptamer yapıları kullanımına dair birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların en önemlisi macugen adı verilen aptamerdir. Macugen adı verilen aptamer kandaki VEGF proteinini yakalayarak bu proteinin aktif olarak fonksiyon göstermesini engellemektedir. 2004 yılının aralık ayında Ulusal Gıda Denetleme Örgütü pegantanip sodyumu (macugen), anti-vasküler büyüme faktörü RNA aptamerini, yaşa bağlı macugen dejenerasyonlarının (age related degeneration-AMD) bütün tipleri için tedavi edici ajan olarak kabul etmiştir [24]. Penagtanip' i üreten Ruckman ve arkadaşları

SELEX işlemi sonrası oluşan aptamer yapısının 46. nükleotidini 2'-F, 2'-NH₂ yada 2'-OH modifikasyonuna uğratarak aptamer yapılarının in vitro ortamda daha kararlı olmalarını sağlamışlardır [24].

2.3. Kütle Spektrometrisi

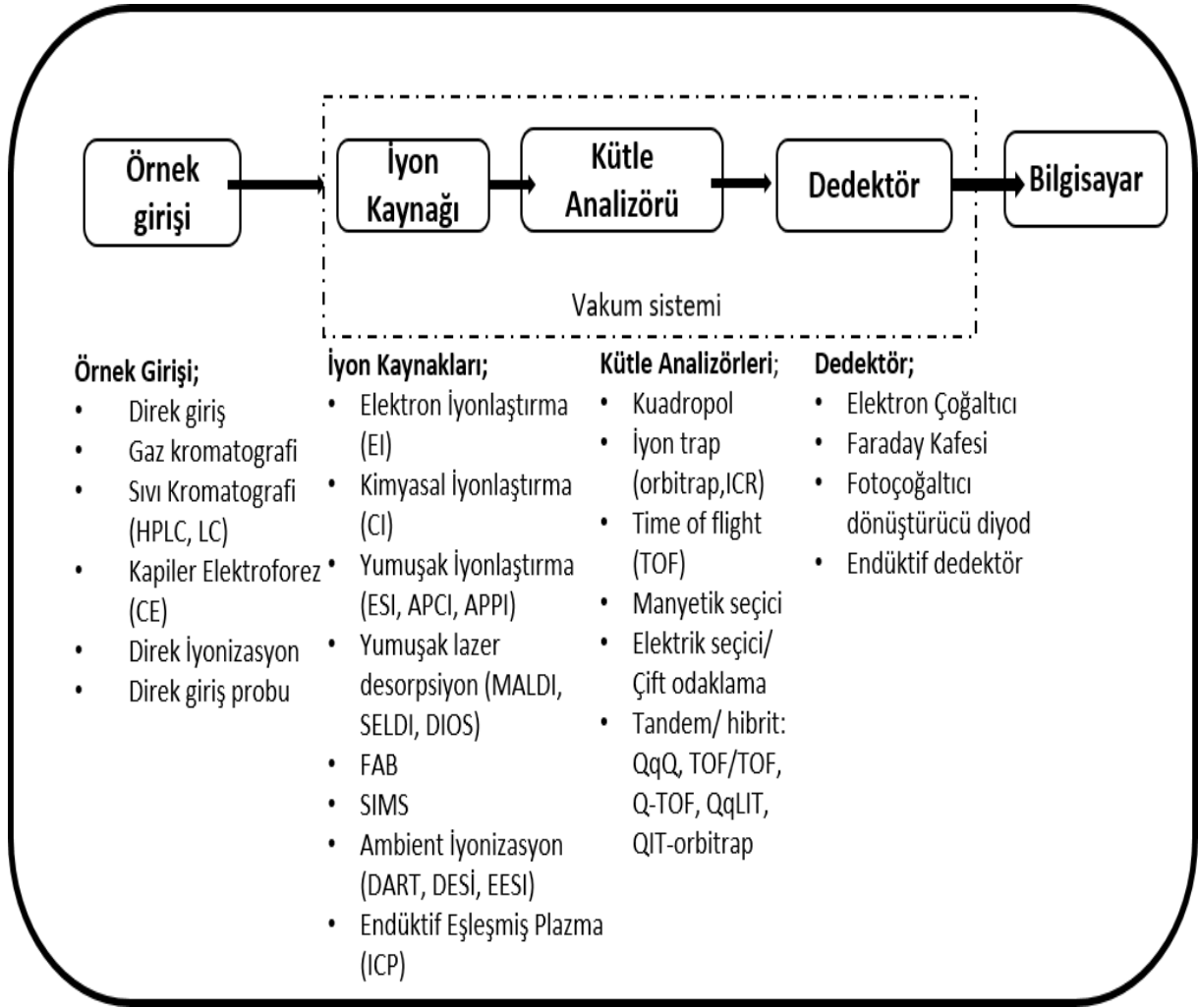
Kütle spektrometrisi (MS) en genel tanımıyla atomların ve moleküllerin kütlelerini belirlemek için kullanılan analitik tekniktir. Kütle spektrometresi yapıların tam olarak kütleleri hakkında bilgi verdiği için çok çeşitli alanlarda bilgiye olanak sağlamaktadır. Tipik bir MS cihazında temel çalışma prensibi şu şekildedir [82];

- 1) Verilecek örneğin iyonlaşmadan önce gaz fazına geçmesi için gerekli bölmeye alınır.
- 2) Gaz fazına geçen örnek çeşitli yöntemler (elektron bombardımanı, MALDI, ESI, kimyasal iyonlaştırma gibi iyon kaynakları) ile iyonlaştırılır.
- 3) İyon haline gelen örnekler belirli bir vakum ortamında elektrik ya da manyetik alan altında hızlandırılır.
- 4) Bu hızlandırma sırasında; elektrik ya da manyetik alandan yüklerine ve kütlelerine göre etkilenen iyonlar kütle/yük oranlarına göre ayrışırlar.
- 5) Kütle/yük oranlarına göre ayrılan iyonlar detektöre çarparak sinyal oluştururlar ve kalibrasyon sonucunda matematiksel bir hesaplama ile bu detektöre çarpan yapıların kütleleri belirlenmiş olurlar.



Şekil 2.4. Kütle Spektrometrisinin şematik gösterimi.

İlk olarak 1899 yılında Wilhelm Wien'in paralel ışınların elektrik ve manyetik alanda saptırılabilileceğini bulmasıyla başlayan süreçte Joseph J. Thomson 1912 yılında katot ışınlarını ve pozitif ışınları kullanarak ilk kütle spektrometrisini yapmıştır [83]. Daha sonra bu sisteme parabol spektrograf adı verilmiştir. Bu cihaz sayesinde ilk defa O₂, N₂, NO, CO₂ ve COCl₂ moleküllerinin kütle spektrumu alınmıştır. 1919 yılında F. W. Aston; hız odaklı kütle spektrometresini geliştirerek Nobel ödülü kazanmış ve yaptığı çalışmalarla kütle spektrometresinin gelişmesini sağlamıştır [84]. 1912 yılından beri birçok bilim adamının katkıları ile gelişen kütle spektrometrisi günümüzde birçok alanda kullanılan en geniş uygulama alanına sahip cihazlardan bir tanesidir. Biyokimya [85], organik [84], polimer [86], sağlık ve tıp [87], çevre ve adli bilimler [88] gibi birçok alanda uygulaması olan kütle spektrometrisinin iki önemli bileşeni vardır; bunlar iyonlaştırıcılar ve kütle analizörleridir.



Şekil 2.5. Kütle Spektrometrisinin genel bileşenleri ve bu bileşenlerin çeşitli örnekleri [89].

2.3.1. İyonlaştırma Teknikleri

Örnek girişinde çeşitli sistemlerle getirilen örnek iyon kaynakları sayesinde iyon formuna dönüştürülmektedir. İyon kaynakları çalışılacak örneğin türüne ve analiz amacına göre değişmektedir. Molekülleri gaz iyonlarına dönüştüren çok sayıda yöntem vardır. Kütle spektrometresinde uygulanan bazı iyonlaştırma kaynakları ise örneğin uçucu özelliğine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır;

Uçucu bileşikler için:

- Elektron Bombardımanlı İyonlaştırıcı (EI)
- Kimyasal İyonlaştırıcı (CI): Pozitif kimyasal iyonlaştırıcı (PCI), ve Negatif kimyasal iyonlaştırıcı (NCI) kaynaklar

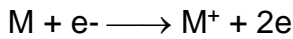
Uçucu olmayan bileşikler için:

- Hızlı Atom Bombardımanı (FAB); Atmosferik Basınç İyonlaştırıcısı (API); MALDI (Matriks destekli Lazer desorpsiyon/iyonizasyon), ESI (elektrosprey iyonlaştırıcı)

Başka bir gruplandırma tekniği olarak iyon kaynaklarının örneği parçalayarak sert bir iyonlaştırma ya da bütün halde yumuşak bir iyonlaştırma yapmasına dayanmaktadır. Sert iyonlaştırma tekniğine dahil olan iyonlaştırıcılar genellikle örneği küçük fragmentlerine kadar parçalarken, yumuşak iyonlaştırma tekniğine dahil olan iyonlaştırıcılar molekülü ya parçalamadan ya da çok az parçalanmaya uğratarak iyonlaştırırlar.

Bazı iyonlaştırma teknikleri incelenecek olursa;

Sert bir iyonizasyon tekniği olan Elektron bombardımanlı iyonlaştırma tekniğinde genellikle 10^{-5} torr gibi bir vakum değerinde çalışılır. İyonlaşma işlemi 7-15 eV civarı elektron demeti enerjisi ile başlamaktadır.



M molekülü, M^+ 'da "moleküler iyon"u veya "ana iyon"u gösterir.

Elektron bombardımanlı iyonlaştırma tekniğinde 7-70 eV arası enerjide olanlar elektron demetleri gaz fazında olan örneklerle çarpılarak onlardan elektron kopartarak örnekleri iyon haline getirmektedir. İyon haline gelen örnek belirli bir elektrik alan altında hızlandırılarak kütle analizörüne doğru yönlendirilir. 7-70 eV arasındaki enerjiye sahip elektron demetlerinin enerjisinin fazla olması örnek molekülleri ile elektronların çarpışma olasılığının artması nedeniyle, daha fazla parçalanma iyonu oluşmaktadır [90].

Kimyasal iyonlaştırma (CI) tekniğinde ise; iki karşılıklı delikte elektronlar çarpıştırılır ve çarpışan bu elektronlar reaktif gazın da varlığında örnekle karşılaşarak örneği iyonlaştır. Bu yöntemle iyonlaştırma bölmesinde reaktif gazlar ile yüksek enerjili elektronlar karşılaşır. Bu karşılaşma sonucunda reaktif gaz iyonlarının oluşması

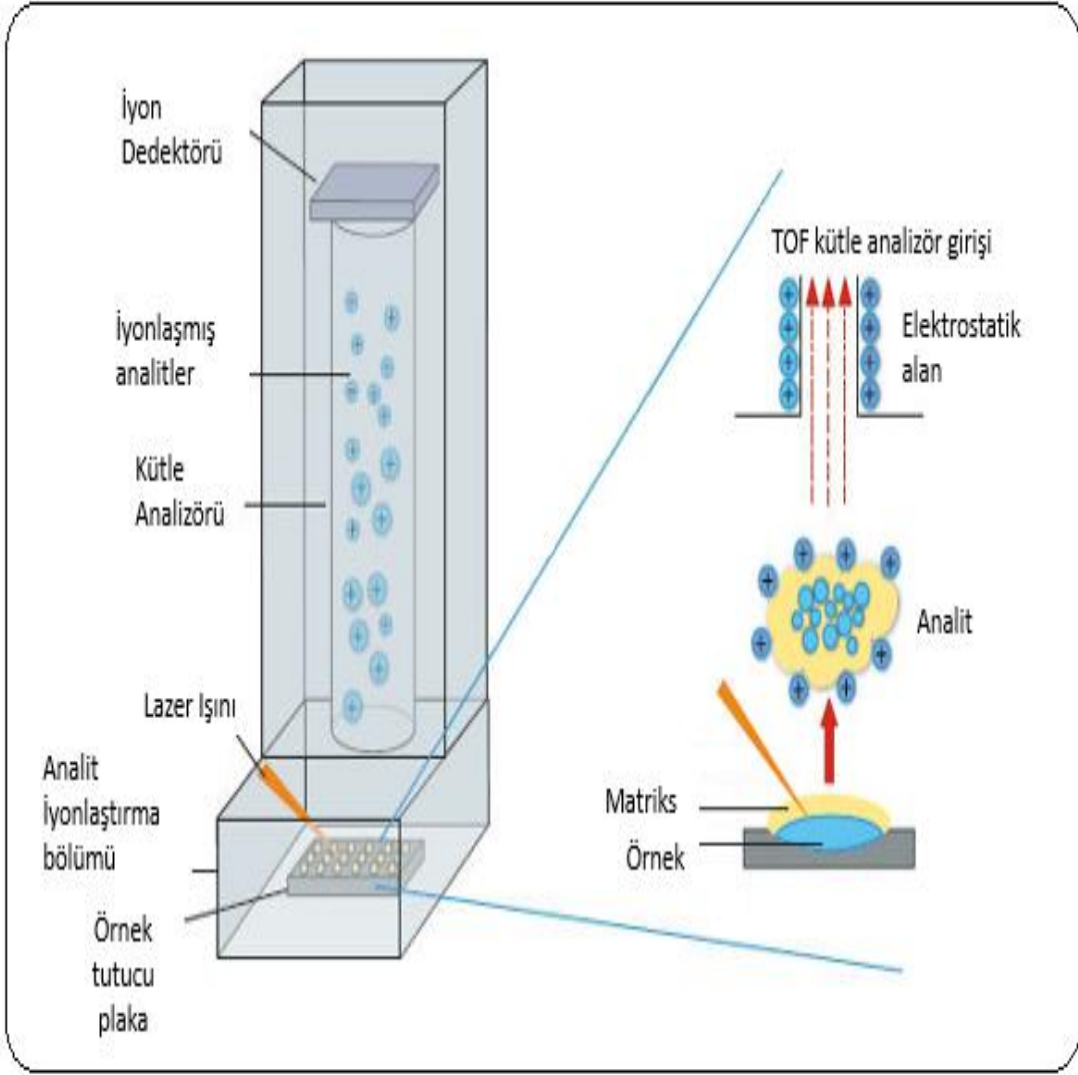
sağlanır. İyon haline gelen reaktif gazların örnek molekülleri ile çarpışması sonucu örnek moleküller iyonlaştırılırlar. Bu yöntemde molekülün doğrudan yüksek enerjili elektronlar ile çarpıştırılması yerine daha düşük enerjili bir tür ile etkinleştirilerek genelde az parçalanmaya uğrayan moleküller iyonların oluşturulması sağlanır [91].

Bu iki sert iyonlaştırma tekniği gibi Alan iyonlaştırma, Hızlı atom bombardımanı ve ikincil iyon tekniği gibi teknikler genel olarak 1000 Da' dan daha düşük molekül ağırlığına sahip gaz fazına bozunmadan geçebilen örnekler için uygundur.

1000 Da' dan büyük gaz fazında ısısız olarak kararsız ve yeterli buhar basıncına sahip olmayan yapılar için sert iyonlaştırma tekniği; bu teknikte fragmentlerine ayrılıp bütün halde iyonlaştırılma güçlüğünden dolayı uygun değildir. Biyomolekül gibi özellikle büyük yapılar için daha yumuşak, daha az enerjili, iyonlaştırma teknikleri geliştirilmiştir. Bu iyonlaştırma tekniklerinden en yaygın olanı Matriks Yardımlı desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) tekniği ve Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) tekniğidir. K. Tanaka ve F. Hillencamp 1987 yılında MALDI'yi keşfetmişlerdir ve 2002 yılında bu keşif Koichi Tanaka'ya Nobel ödülünü kazandırmıştır. Aynı şekilde 1980 lerde "elektrosprey iyonlaştırma tekniği"ni geliştirdiği için 2002 yılında John Bennett Fenn Nobel bilim ödülüne layık görülmüştür.

2.3.1.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma

Uçucu olmayan ve termal açıdan kararlı olan; protein, oligonükleotit, sentetik polimer ve inorganik yapıların analizi için oldukça önemli olan MALDI sisteminde hem desorpsiyon hem de iyonlaştırma basamağı mevcuttur [92]. Matriks olarak adlandırılan zayıf asidik özellikte olan küçük organik molekül çözeltileri lazer enerjisini güçlü absorplama yeteneğine sahiptir. Matriks çözeltileri örnekle matriks oranı fazla olacak şekilde belirli oranlarda karıştırılır ve bu karışım 'plate' adı verilen metal bir örnek tutucu üzerinde karışım hacmi 1-3 µL olacak şekilde uygulanır [93]. Bu işlem sonrasında analiz edilecek örnek matriks molekülleri arasında dağılmış ve birbirinden uzaklaşmış olmaktadır [92].



Şekil 2.6. MALDI cihazının genel görünümü ve iyonlaştırma basamağının şematik gösterimi.

Kuruyan örnek-matriks karışımına belirli bir vakum ortamında lazer pulsarı yollanmaktadır. Lazer pulsarlarının sahip oldukları enerjinin bir kısmı örneğin iyonlaşması için kullanılırken kalan enerji matriks tarafından absorplanmaktadır [93]. İyonlaşma basamağı tam olarak açıklanamamakla birlikte matriksin zayıf asit özelliği sayesinde H^+ kazanan analitin lazer pulsarlarının enerjisi ile katı fazından gaz fazına geçtiği varsayılmaktadır [94]. Gaz fazında iyon haline gelen analit, örnek tutucunun voltajı ile grid adı verilen kapıların voltajının farkından dolayı vakum altında kütle analizörüne transfer edilir.

MALDI sisteminde analit matriks ile belirli oranlarda karıştırıldığı için analitin öbikleşmesi engellenerek bütün ve tek halinde iyonlaşması sağlanır.

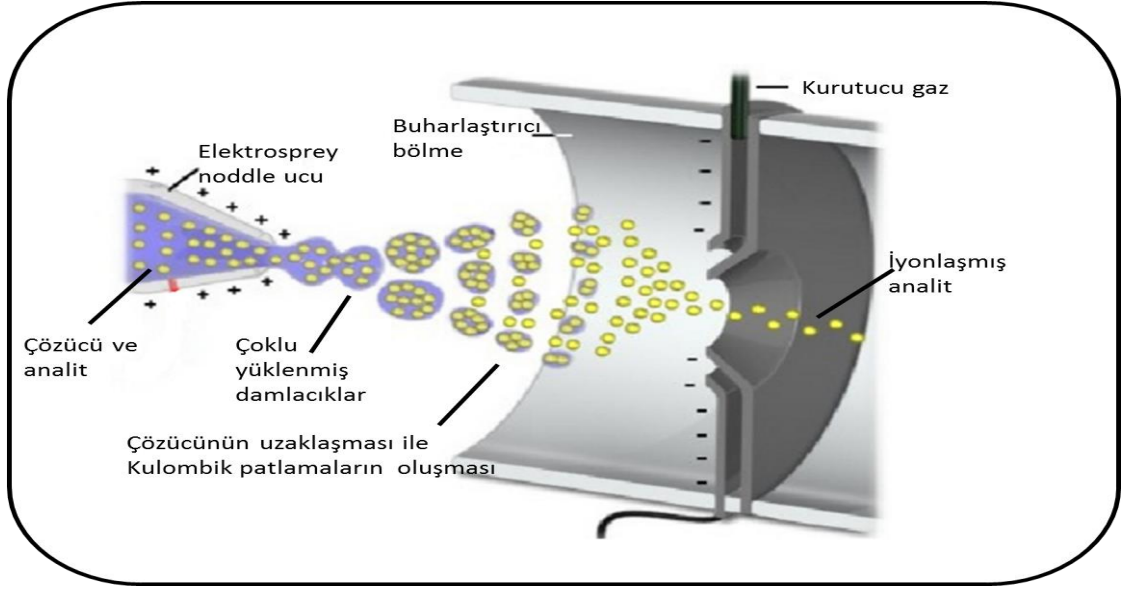
Ayrıca matriksin lazer enerjisinin bir kısmını absorplaması sayesinde analit aşırı miktarda enerjiyle parçalanmadan bütün halinde iyonlaşması sağlanmaktadır. Analitin etkili bir şekilde iyonlaşması açısından matriks seçimi oldukça önemlidir [95]. Genel olarak bir MALDI matriksi lazer enerjisine karşı kuvvetli absorban, analite uygun çözücülerde çözünebilme ve analitle kimyasal reaksiyona girmeden sadece iyonlaştırma gibi özelliklere sahip olmalıdır. MALDI çok çeşitli moleküller için çok uygun bir yöntem olmakla birlikte analit türlerinin uygun iyonlaşması için çeşitli matriksler belirlenmiştir. Genel hatlarıyla çeşitli analitler için uygun matriksler Çizelge 2.2. de sınıflandırılmış olup peptitler ve proteinler için en yaygın olarak bilinen 2,5-dihidroksibenzoik asit [96], α -siyano-4-hidroksisinamik asit [97] ve sinapnik asit [98] matriksleridir.

2.3.1.2. Elektrosprey İyonlaştırma

Bir diğer yumuşak iyonlaştırma tekniği olan Elektrosprey iyonlaştırma tekniğinde protein, polimer, biyopolimer gibi büyük makromoleküllerin parçalanmadan bütün halinde iyonlaşması sağlanmaktadır. Moleküllerin çözelti içinde sahip oldukları çoklu iyonik formlarını görmemizi sağlayan bu sistem genel olarak; yüklü damlacık oluşturma, çözeltinin uzaklaştırılması, örneklerin iyonik formda gaz haline geçmesi olarak basamaklara ayrılabilir [99].

Analit	Matriks	Kısaltma
Peptitler/Proteinler	α -Siyano-4-hidroksisinamik asit 2,5-Dihidroksibenzoik asit Sinapinik asit	CHCA DHB SA
Oligonükleotitler	Trihidroksiasetofenon 3-Hidroksipikolinik asit	THAP HPA
Karbonhidratlar	2,5-Dihidroksibenzoik asit α -Siyano-4-hidroksisinamik asit	DHB CHCA
Sentetik Polimerler	Trans-3-indolakrilik asit Ditranol 2,5-Dihidroksibenzoik asit	IAA DIT DHB
Organik Moleküller	2,5-Dihidroksibenzoik asit	DHB
İnorganik Moleküller	Trans-2-(3-(4-ter-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden) malononitril	DCTB
Lipitler	Ditranol	DIT

Çizelge 2.2. Farklı analitler için kullanılan çeşitli MALDI matriksleri ve bu matrikslerin kısaltmaları [100].



Şekil 2.7. Elektrosprey iyonlaştırıcısında analitin iyonlaştırılmasının şematik gösterimi [101].

Sıvı halde bulunan örnek akış hızı 1-10 μL olacak şekilde pompalanır. "Nebulizer" adı verilen iğne uçlu bir kapiler yardımıyla püskürtülür. Bu kapilerin uç kısmına uygulanan 3-5 kV arasındaki elektrik alan etkisiyle örnek püskürtülme sırasında yüklü hale getirilmektedir [102]. Püskürtülme sonucunda örnek ve çözelti damlacıkları oluşur. Çözelti damlacıklarının uzaklaşması için ya kurutucu gaz gönderilmektedir ya da ısıtma işlemi uygulanmaktadır. Kurutucu gazlarla karşılaşan çözelti damlacıkları kururken örneğinde içinde bulunduğu damlacıklarda bu gazın etkisiyle küçülmektedir. Bu küçülmeye yüklü halde olan örnek molekülleri birbirini iterek "Kolombik patlama" denilen etkiye sebep olmaktadır [103]. Bu patlama ile sıvı halde iyonik formda olan moleküller gaz fazına geçmiş olmaktadır. Gaz fazına geçen iyonlar ise vakum altında kütle analizörüne doğru ilerletilmektedir.

Örneklerin çoklu yüklerini koruyarak bütün halinde iyonlaşması ESI'nın en büyük avantajıdır. Bu özelliği sayesinde özellikle biyomoleküllerin yapıları hakkında birçok aydınlatıcı çalışmada kullanılmaktadır [78] [80].

2.3.2. Kütle ayırıcıları

Kütle ayırıcıları oluşan iyonların kütlelerine göre ayrılması açısından oldukça önemlidir. Bir kütle ayırıcısının; kütle aralığı limiti, analiz hızı, geçirgenliği, kütle doğruluğu ve birbiri arasında çok küçük kütle/yük (m/z) oranı olan iki iyon ayırarak farklı sinyaller verme gücü yüksek olması beklenir. Moleküllerin kütle/yük oranlarına göre ayrılmasında temel ilke iyonların yüklerine göre elektrik alandan veya manyetik alandan etkilenecek kütlelerinin de etkisiyle hızlanması ya da yavaşlamasıdır. 1953 yılında ilk kütle spektrometresi olan kuadropol iyon trap (QIT) keşfedildikten 40 yıl sonra kullanılmaya başlanmış ve katkılarından dolayı 1984 yılında Wolfgang Paul, Nobel ödülü kazanmıştır. Kuadropol iyon trap'ın kullanımıyla birlikte çeşitli kütle analizörleri gelişmeye başlamıştır. Günümüzde ayırma prensibi farklı olan Manyetik alan, Elektrik alan, dört kutuplu ve uçuş zamanlı gibi birçok kütle analizörü mevcuttur.

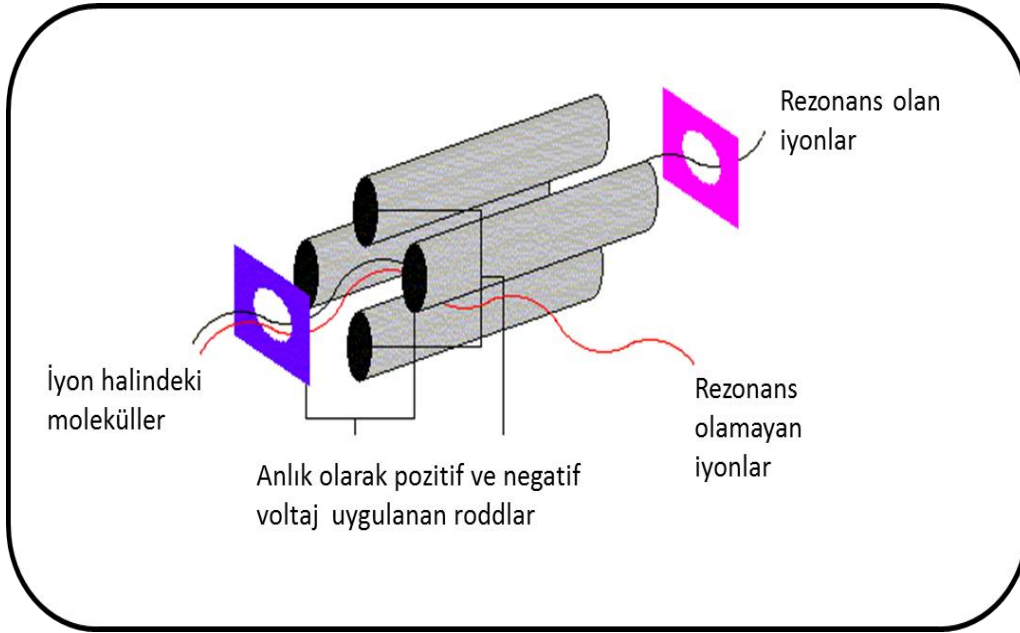
En eski kütle ayırıcılarından olan Elektriksel alanlı ayırıcılar ve Manyetik alanlı ayırıcılarda; iyon kaynağında iyonlaşan örnek molekülleri yaklaşık aynı hızda kütle analizörüne girmektedirler. Kütle analizörünün sahip olduğu elektrik alanlı ya da manyetik alanlı dairesel yolda merkezkaç kuvvetine maruz kalırlar. Bu yoldaki merkezkaç kuvveti iyon yönüne dik olacak şekilde uygulanan manyetik ya da elektrik alanla dengelenmektedir. Bu denge sayesinde dairesel yolun sonunda iyonlar kütle/yük oranlarına göre ayrılmış olmaktadır. Ancak bu ayırma büyük yapılar için yüksek hassasiyette bir ayırma olmamaktadır [91].

İyon tuzaklı kütle ayırıcısında ise temel mantık; iyonları tuzaklı bir bölmede tutarak zamana göre ayırım sağlamaktır. Bu ayırıcıda üç adet elektrot tarafından oluşturulan bir elektrik alan vardır. Bu elektrik alan zamanla değişmektedir. Bu değişime bağlı olarak iyonların da hareketi değişmektedir. İyonlar radyo frekansının değişmesi ile farklı zamanlarda bu değişen elektrik alan bölmesinden çıkmaktadırlar. Kütle/yük oranlarına göre farklı zamanlarda bu alandan çıkan iyonlar detektöre farklı zamanlarda vardıkları için ayırım sağlanmış olmaktadır.

Elektrik alanlı, iyon tuzaklı kütle ayırıcıları hala kullanılmakla birlikte daha hassas daha iyi ayırıcılık sağlayan kuadropol ve uçuş zamanlı kütle ayırıcıları daha çok tercih edilmektedir.

2.3.2.1. Kuadrupol Kütle ayırıcısı (Q)

1953 yılında Bonn Üniversitesi'nde Paul ve Steinweger [91] tarafından temel prensipleri açıklanan Kuadrupol kütle ayırıcısı dairesel ya da hiperbolik dört metal çubuktan oluşmaktadır [104]. Bu metal çubuklar birbirine paralel halde konumlandırılıp bu konumlanma sayesinde oluşturulan elektriksel alan sayesinde iyonların ayrımı sağlanmaktadır. İyon kaynağında oluşturulan iyonlar kuadrapol ayırıcısının metal çubukları arasındaki boşluğa girdiği zaman; bu dört metal çubuğa uygulanan potansiyelin zamana bağlı olarak değişmesi ile iyonlar salınım hareketi yaparak bu boşlukta ilerlemektedir. Belirli bir vakum değerinde; kütle/yük oranlarına göre bu değişen potansiyelden farklı oranda etkilenen iyonların bu sayede ayrımı sağlanmaktadır. Metal çubuklara uygulanan voltaj farkı değiştirilerek istenmeyen iyonların dairesel boşluktan çıkarak detektöre ulaşması engellenebilmektedir [105].



Şekil 2.8. Kuadrupol kütle ayırıcısının şematik gösterimi.

2.3.2.2. Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı (TOF)

1946 yılında Stephens tarafından açıklanan ardından 1955 yılında doğrusal olarak dizayn edilen TOF kütle analizörü; vakum ortamında iyonların sahip oldukları kinetik enerji ile uzun bir yol boyunca kütle/yük oranına göre ayrılması sağlanmaktadır. İyon kaynağında oluşturulan iyonların uçuş zamanlı kütle ayırıcısına (Time of flight) gelmeden hemen önce çeşitli kapılarda uygulanan yaklaşık 30 ev değerindeki voltajlar

ve elektrik alan yardımıyla aynı kinetik enerjiye sahip olması sağlanmaktadır. Aynı kinetik enerjiye sahip olan iyonlar temel kinetik enerji formülüne göre kütleleri farklı olanlar farklı hızda olmaktadır.

$E = 1/2 mv^2 = z.e.V$	Eşitlik 3.1
$v = L/t$	Eşitlik 3.2
$\frac{m}{z} = \frac{2evt^2}{L^2}$	Eşitlik 3.3

m = iyonun kütlesi

v = iyonun hızı

z = iyonun yükü

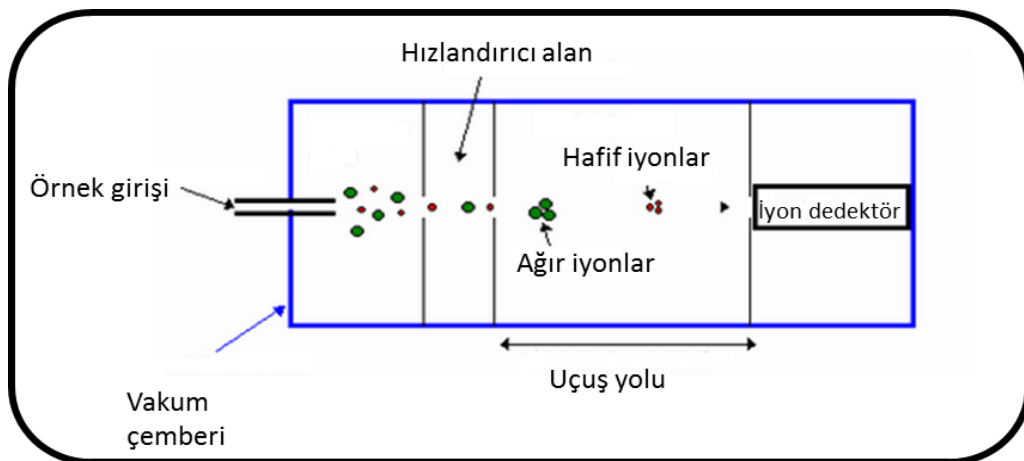
V = elektrik alanın gerilimi

L = tüpün içindeki serbest yol uzunluğu

t = uçuş zamanı

Eşitlik 3.1. deki v Eşitlik 3.2. de yerine yazılırsa Eşitlik 3.3. elde edilir. Bu eşitlikte de kütle/yük oranının uçuş süresinin karesiyle doğru orantılı olduğu görülmektedir.

Eşitlik 3.1. deki temel kinetik enerji formülüne göre aynı enerjiye sahip olan küçük moleküller büyük moleküllere göre daha fazla hız kazanmaktadır. Eşitlik 3.2. ye göre aynı mesafede daha hızlı iyonlar daha az uçuş zamanına sahip olmaktadır. Bu teorik verilere göre de daha küçük kütle/yük oranına sahip olan iyonlar büyük iyonlara göre daha çabuk detektöre varmaktadırlar.



Şekil 2.9. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısının şematik gösterimi (time of flight)

Teorik olarak uçuş zamanlı kütle analizörleri; MALDI gibi uygun yumuşak iyonlaştırma teknikleri ile birlikte kullanıldığında kütle sınırı olmamaktadır. MALDI-TOF ile 66 kDa kütlede analiz örnekleri mevcut olduğu gibi 200 kDa kütlede de analiz örnekleri literatürde mevcuttur [106,107]. Kütle sınırının olmamasının yanında; verileri çok hızlı kaydedebilmesi, duyarlılığı yüksek olması gibi avantajları sayesinde birçok alanda çalışma için oldukça kullanışlıdır.

2.3.3. Biyomolekül çalışmalarında Kütle spektrometrisi

Yapının molekül ağırlığı hakkında kesin bilgi veren nadir sistemlerden olan kütle spektrometrisi sayesinde örneğin yapısal analizinde oldukça kolaylık sağladığı için günümüzde biyolojik örnek analizlerinde en çok kullanılan cihazlardan biri olmuştur. Sert iyonlaşma teknikleri olan elektron bombardımanlı, kimyasal iyonlaşmalı gibi eski teknikler biyolojik örnekler gibi büyük moleküllerin gaz fazına geçirilemediği ve örnekleri bütün halinde iyonlaştıramadığı için kullanım alanı oldukça kısıtlıdır [108]. Uçucu olmayan biyomoleküllerin analizi 1974 yılında plazma desorpsiyonu ve 1984 yılında lazer desorpsiyonu yöntemlerinin gelişmesi ile hız kazanmıştır [109]. Ancak yüksek kütleli tek yüklü iyon oluşturma zorluğu bu iyonlaştırma teknikleri ile de aşılamadığı için çok fazla ilerleme sağlanamamıştır. Elektrosprey iyonlaşma tekniği (ESI) ve Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonlaşma teknikleri ile biyolojik örnekler için kütle spektrometrisi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Bugün lipitler ve fosfolipitler [110], peptitler ve proteinler [111], karbonhidratlar [112], oligonükleotitler [113] için kilometre taşı olan birçok bilgi kütle spektrometresi ile elde edilmiştir.

Tampon ya da tuz çözeltilerinden gelen yüksek derişimdeki kirlenmeleri giderme konusunda da üstünlükleri sayesinde biyolojik örneklerin molekül ağırlıklarının tayini dışında çeşitli önemli çalışmalarda da kütle spektrometrisinden faydalanılmıştır. Proteomiks gibi oldukça ses getiren çalışmalarda kullanılan kütle spektrometrisi; proteinlerin dizilim çalışmalarında [85], proteinlerin üç boyutlu yapıları hakkında ve proteinlerin aktifleşmek için uğradıkları glikolizasyon, karboksilasyon, asetilasyon, gibi kovalent bağlarla ilgili çalışmaların [114] yanında kovalent olmayan etkileşim çalışmalarında da kullanılır [115]. Yukarıda açıklanan ve daha başka birçok çalışma

için MALDI ve ESI yöntemi sayesinde femtomol ile pikomol gibi çok düşük miktarlarda nicel analiz imkanı bulunmaktadır [116].

Özellikle MALDI-TOF-MS cihazının yüksek kütle ayırıcılığı, yüksek hassasiyet ve yüksek hız ve kolay kullanımı gibi avantajları protein ve peptit hedeflerinin analizinde yeni bir yaklaşım oluşmuştur [7]. MALDI-TOF-MS sistemi klasik protein belirleme yöntemlerinden ELISA gibi birçok yöntemle göre üstün özellikler göstermektedir. Bu üstünlükler aşağıdaki gibi verilmektedir;

- 1) MS ve MS/MS analizleri sayesinde antijenler bulunabilir.
- 2) Antijenin protein bölgelerin çeşitli izoformları ve post transasyonel modifikasyonları MALDI-TOF-MS ile ayırt edilebilir.
- 3) MS cihazı çoklu deney imkanı ve yüksek veri imkanı sayesinde yüzlerce molekülü aynı anda simule edilebilir.
- 4) ELISA yönteminde yakalanan hedef protein ile birlikte onu yakalayan antikor da bir özgün enzimle parçalanmaya uğratılarak peptit hedeflerinin analizi ve epitop içeren peptitlerin analizleri oldukça zordur [117]. Bazı gruplar hedef proteini belirlemek ve miktar ölçmek için klasik yöntemlerle çeşitli çalışmalar yapmışlardı. Grupların analizleri doğru çıkmasına rağmen uygulama oldukça limitli olmuştur. Ancak peptit analizi MALDI-TOF-MS ile yüksek ayırıcılık kullanımı sayesinde daha hassas elde edilebilmektedir [7].

Aptamerlerin yapı analizleri için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. X ışınları, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi çok yaygın tekniklerin yanında Yüzey Plazmon Rezonans (SPR), Kuarts Kristal Mikroteraziler (QCM) gibi yöntemlerde aptamer yapılarının analizleri ve aptamer protein etkileşimi çalışmalarında kullanılan yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin de bazı sakıncıları vardır. Örneğin; X ışınları kromatografisi bazı aptamer-protein etkileşimini açıklama konusunda oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak bu başarı sadece saf ve homojen kristal oluşturabilen yapılarla sınırlıdır [15]. Nükleer Manyetik Rezonans cihazı da aptamer-protein yapıları hakkında detaylı bilgi sağlamaktadır, ancak çok fazla malzeme, uzun ölçüm süresi bu yöntemin dezavantajıdır [118]. Bu yüzden aptamer-protein etkileşiminde MALDI-MS, ESI-MS gibi işaretlemesiz, hassas, güvenilir bir metot oldukça değerlidir. Yumuşak iyonlaştırma tekniği ile proteini ve aptameri parçalamadan analiz etme imkanı sağlanırken uygun koşullar altında aptamer-protein kompleksinin analizi de mümkün

olmaktadır. Özellikle ESI sayesinde moleküllerin çözelti fazında sahip oldukarı yükleri belirleme imkanı ile biyolojik ortamda aptamer yapısının konformasyonuna ve aptamer-protein yapısının konformasyonuna dayalı çalışmalar mevcuttur [15].

MALDI-TOF-MS tekniğinin yumuşak iyonlaştırma özelliği, saf kristal yapıya ihtiyaç duymadan analiz imkanı diğer bir deyişle matriks tolere avantajı ve yaklaşık olarak 5 µL gibi çok düşük numune ihtiyacı da MALDI-TOF-MS'in aptamer-IFN-γ ve aptamer-VEGF etkileşim çalışmalarında diğer tekniklerin önüne geçirmiştir. Bu avantajların yanı sıra analiz süresinin oldukça kısa olması da MALDI-TOF-MS'in diğer bir tercih sebebidir. Bu nedenle, birçok hastalık için belirteç görevi gören IFN-γ ve VEGF proteinlerinin aptamer gibi özel bir yapı ile zenginleştirilmesinin ardından MALDI-MS in diğer yöntemlere göre avantajlarından faydalanılarak yeni bir zenginleştirme yöntemi oluşturulmuştur. Bu çalışma ile aptamerler ile gerçekleştirilen IFN-γ ve VEGF gibi biyolojik fonksiyonu oldukça önemli olan biyomolekül yapıları ve onların kovalent olmayan komplekslerinin belirlenmesi etkileşim tür, yer ve sitokiyometrelerinin belirlenmesi ve bunlara dayanılarak özgünlük ve zenginleştirme çalışmalarında MALDI-TOF-MS kullanılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan IFN- γ proteini ve Vasküler Endotel Büyüme faktörü proteini Sigma Aldrich (Amerika) den alınmıştır. IFN- γ aptameri 5'-[ThiC6]AAAAAAGGGGTTGGTTGTGTTGGGTGTTGTGTCCAACCCC-3' dizilimine sahip olup Sigma Aldrich (Amerika)'den satın alınmıştır. VEGF aptameri 5'-[ThiC6]AAAAAACCG GUA GUC GCA UGG CCC AUC GCG CCC GGA AAA AAAA-3' diziliminde olup Sigma Aldrich (Amerika) den satın alınmıştır. Katı yüzey olarak kullanılan Hekzametilendiamin (HMDA)' in epoksi grupları üzerinden kovalent olarak bağlı bulunduğu poli(glisidilmetakrilat-ko-etilen glikol dimetakrilat), (poly(GMA/EGDMA)) mikroküreleri Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Yakup Arıca'dan hediye olarak alınmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat (Sülfo-SMCC) Thermo Scientific (Amerika) dan temin edilmiştir.

Karışım deneylerinde kullanılan lizozim, sitokrom C proteinleri ve enzimatik parçalama işlemi sırasında kullanılan tripsin (sığır pankreasından), ditiyotritol (DTT), iyodoasetamid (IAA) Sigma Aldrich (Amerika) den satın alınmıştır. Deneylerde çözücü olarak kullanılan asetonitril (ACN), triflorasetikasit (TFA), Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris-HCl), hidroklorik asit (HCl) Sigma Aldrich (Amerika) ten temin edilmiştir. Deneylerde 18.2 M.Ω.cm direncine sahip deiyonize su kullanılmıştır (Puris Expe-Ultrapure Water System, Mirae St co. Ltd. Kore). Kan plazma deneylerinde ticari olarak satılan insan plazması kullanılmıştır ve Sigma Aldrich (Amerika) ten temin edilmiştir.

MALDI kütle spektrometresi örnek hazırlama sırasında kullanılan α -siyano-4-hidroksisiamik asit (CHCA), 2-5 dihidroksibenzoik asit (DHB), sinapinik asit (SA), 6-aza-2-tiyotiyamin (ATT), 2',4',6'-Trihidroksiasetofenon monohidrat (THAP), 3-hidroksipikolinik asit (3HPA) matriksleri Fluka (Buchs, İsviçre) den temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Deneyle sırasında deney ortamı olan ependorflara uygun mikro pH metre olan Metter Toledo-Seven Multi pH metre (Metter Toledo, İsveç) cihazı ile pH kontrolu sağlanmıştır.

Polimer yüzeye çapraz bağlayıcı, aptamer ve protein ilaveleri sırasında karıştırma işlemlerinde vorteks cihazı olarak Heidolph-reax Cotrol Vortex (Almanya) kullanılmıştır.

Bağlanmayan aptamerin ve proteinin uzaklaştırılma işlemleri sırasında MPW Yüksek Hızlı Fırçasız Santrifüj (MPW Medical Instruments, Çin) cihazı kullanılmıştır.

Seyreltik ortamdan zenginleştirilen proteinlerin enzimatik parçalama sonrası oluşan peptitlerine Voyager-DE™ PRO MALDI-uçuş zamanlı kütle Spektrometresi (Applied Biosystems, Amerika) cihazı ile analiz edilmiştir. MALDI de kullanılan azot lazeri dalga boyu 337 nm de olup lazer şiddeti analiz sırasında manuel olarak değiştirilmiştir. Lazer etkisi ile oluşan iyonlar 5×10^{-8} torr vakum ortamında yaklaşık 20 kV hızlandırma potansiyeline maruz kalmaktadırlar. Kütle spektrumları 100-150 lazer vuruşu sonucunda toplanmış ve lineer mod da alınmıştır. Anjiotensin peptidi kullanılarak çeşitli kalibrasyon işlemleri ile kütle kalibrasyonu yapılmıştır.

3.3. MALDI matrikslerinin hazırlanışı

Analiz edilecek örnekler çeşitli matrikslerle, matriks oranı fazla olacak şekilde, 1:5, 1:10 veya 'onspot' (örneğin eklendiği yüzey olan 'plate' adı verilen örnek tutucu üzerinde 1:1 oranında birbiri üzerine uygulanması) karıştırılmıştır. Hazırlanan matriksler deneylere özgü taze olarak hazırlanmıştır.

- DHB matriksi; Derişimi 10 mg/mL DHB olacak şekilde % 50 asetonitril (ACN), % 50 su, % 0.1 TFA çözücüleri ile hazırlanmıştır.
- DHB 2 matriksi; Derişimi 10 mg/mL DHB olacak şekilde deiyonize su ile hazırlanmıştır.
- 3HPA matriksi; Derişimi 50 mg/mL 3HPA olacak şekilde % 50 asetonitril (ACN), % 50 su çözücüleri ile hazırlanan çözelti ile derişimi 50 mg/mL di amonyum sitrat olacak şekilde hazırlanan çözeltinin 9:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır.

- THAP matriksi; Derişimi 10 mg/mL THAP olacak şekilde % 50 asetonitril (ACN), % 50 su çözücülerini ile hazırlanan çözelti ile derişimi 50 mg/mL di amonyum sitrat olacak şekilde hazırlanan çözeltinin 9:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır.
- ATT matriksi; Derişimi 10 mg/mL 6-azo-2-tiyotimin olacak şekilde % 50 asetonitril (ACN), % 50 amonyum sitrat çözeltisi (20 mM lık) ile hazırlanmıştır.
- CHCA matriksi; Derişimi 10 mg/mL CHCA olacak şekilde % 50 asetonitril (ACN), % 50 su, % 0,1 TFA çözücülerini ile hazırlanmıştır.

3.4. IFN- γ proteini, IFN- γ aptameri, VEGF proteini ve VEGF aptamerinin MALDI-MS ile analizleri

IFN- γ aptameri ve VEGF aptamer çözeltileri derişimi 70 pmol/ μ L olacak şekilde hazırlanmıştır. IFN- γ proteini stok çözelti derişimi 262 pmol/ μ L olacak şekilde hazırlanırken VEGF proteini stok çözeltisi derişimi 2 pmol/ μ L olacak şekilde hazırlanmıştır. Aptamerler ve proteinlerin en iyi kütle spektrumunu almak için stok çözeltilerden örnekler alınarak çeşitli matrikslerle karıştırılmıştır.

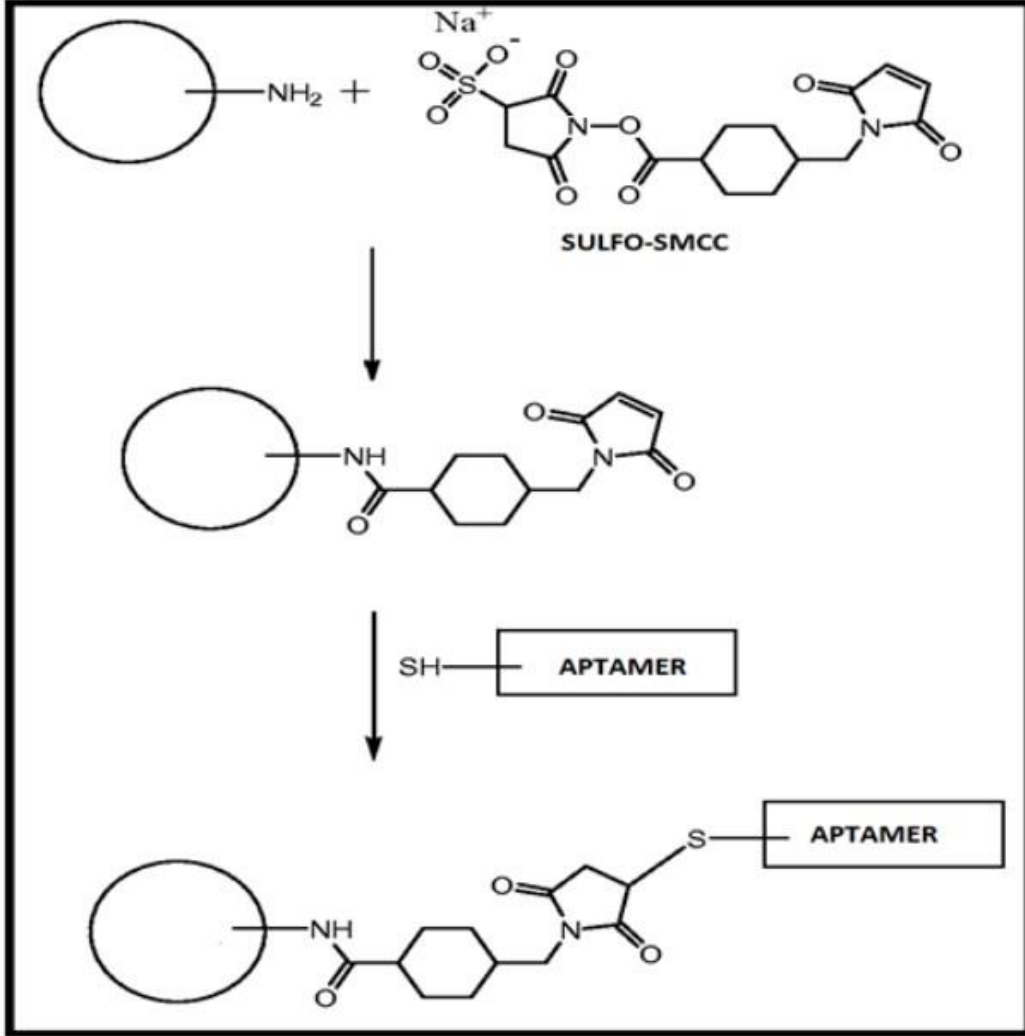
3.5. Deney ortamı ve pH ayarlanması

Aptamerler ilgili literatür bilgilerinde aptamer yapısının fizyolojik pH olan 7 civarında optimum çalışma gösterdiği mevcuttur [119]. Bu pH koşulunu sağlamak için çapraz bağlayıcı ekleme sırasında hazırlanan 1 mM lık tris-HCl tamponu eklenmiştir. Ortamın pH' sı çapraz bağlayıcının da optimum çalışma pH' sı olan 7 civarında tutulması sağlanmıştır. Fazla çapraz bağlayıcı, aptamer, proteini uzaklaştırmak için yapılan yıkama işlemleri sırasında da 100 mM lık Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Deney sırasında sürekli olarak pH kontrolü yapıp deney ortamının pH' ının değişmemesi sağlanmıştır.

3.6. Polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı bağlanması

Aptamerin bağlanacağı uygun ortamı oluşturmak için öncelikle hekzametilen diamin fonksiyonel grulu polimerik küreler 10 mg kadar tartılıp pH 7.2-7.7 arasında olan 1M tris-HCl tamponundan 100 μ L kadar eklenerek Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısının bağlanması için uygun ortam oluşturulmuştur. Daha sonra 2 mg/ μ L Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısından 200 μ L eklenerek 2 saat boyunca oda koşullarında

kariştirilerek amin yapılarının çapraz bağlayıcı ile kovalent bağ yapması sağlanmiştır (şekil 3.1.).



şekil 3.1. Çapraz bağlayıcı ve aptamerin polimerik yzeye bağlanmasının şematik gsterimi.

3.7. Aptamerin apraz bağlayıcıya bağlanması

Bağlanmayan fazla çapraz bağlayıcısının 100 mM lık tris-HCl tamponu ile birkaç defa yıkama yapılarak uzaklaştırılmasının ardından yzeye 7.0 pmol/ μL 100 μL aptamer eklenmektedir. Bu sayede bir ucundaki sulfat grubu ile polimerik yzeye kovalent bağlanan çapraz bağlayıcı, diğer ucundaki pirol yapısındaki çift bağ açılarak aptamer yapısının ucundaki tiyol ($-\text{SH}$) grubu ile kovalent bağ yaparak aptamerin polimerik yzeye bağlanması sağlanmaktadır (şekil 3.1.).

Eklenen aptamer oda koşullarında iki saat boyunca düşük hızdaki vorteks yardımıyla karıştırılarak kovalent bağ oluşturacak fonksiyonel grupların uygun yönleneşi amaçlanmıştır.

3.8. Proteinlerin aptamer bağı polimerik yüzeyler yardımı ile zenginleştirilmesi

Aptamerin karıştırma sonunda kovalent olarak çapraz bağlayıcıya bağlanmasının ardından bağlanmayan fazla aptamer 100 mM lık tris-HCl tamponu ile birkaç defa yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından aptamerin özgün olarak bağlanacağı protein çözeltileri yüzeye eklenerek aptamer-protein etkileşimi sayesinde proteinin tutulması amaçlanmıştır. Yüzeye eklenen çeşitli derişimlerdeki yaklaşık 100 µL civarındaki protein çözeltileri uygun etkileşimi olabilmesi için yaklaşık olarak 2 saat boyunca düşük hızdaki vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Aptamerlerle özgün etkileşen proteinlerin kovalent olmayan ikincil etkileşimlerle bağlanmasının ardından ortamdaki var olabilecek bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için 100 mM lık tris-HCl tamponu ile birkaç defa yıkama yapılmıştır. Bu işlem ile çözelti ortamında analiz imkanı zor olan proteinlerin daha derişik bir ortama alınması sağlanmıştır.

Tez kapsamında zenginleştirilen IFN- γ protein derişimleri; 7.0 pmol/ µL, 0.7 pmol/ µL, 0.07 pmol/ µL, 0.007 pmol/ µL olup VEGF protein derişimleri 1.0 pmol/ µL, 0.2 pmol/ µL, 0.02 pmol/ µL, 0.002 pmol/ µL olarak seçilmiştir.

3.9. Bağlanan proteinlerin enzimatik parçalanması

Gerekli yıkamaların ardından ortama eklenen 10 µL 9 mM DTT (20 mM amonyum bikarbonat çözeltilinde) çözeltileri ile 60°C de yarım saat su banyosunda bekletilerek bağlanan proteinin di sülfid bağlarının azaltılması amaçlanmıştır [120]. Yarım saatlik beklemenin ardından 10 µL 20 mM IAA çözeltileri (20 mM amonyum bikarbonat çözeltilinde) eklenerek yarım saat karanlık bir ortamda bekletilerek protein yapısındaki histidin ve sistein aminoasitlerinin alkillenmesi sağlanmıştır [121]. Bekleme süresinin ardından proteinin lizin ve arginin aminoasitlerini karboksil uçlarından parçalamak için 1mg/µL tripsin çözeltilerinden 3 µL eklenerek 37°C de su banyosunda enzimatik parçalanma başlatılmıştır. İki saat sonunda enzimatik parçalanma işlemi 2 µL derişik trifloroasetikasit (TFA) ile durdurulmuştur. Protein parçalanması ile oluşan peptit parçaları uygun matrikslerle MALDI-MS cihazında analiz edilmiştir.

0.07 pmol/ μ L, 0.007 pmol/ μ L, 0.02 pmol/ μ L, 0.002 pmol/ μ L, gibi çok düşük protein derişimleri için DTT, iyodoasetamid, tripsin hacimleri yarıya düşürülmüştür.

3.10. Proteinlerin çözelti ortamında enzimatik parçalanması

Zenginleştirmenin sonuçlarının karşılaştırılması için tez kapsamında çalışılan IFN- γ ve VEGF proteinlerinin çeşitli derişimlerinin olduğu çözeltiler hiçbir zenginleştirme yapmadan enzimatik parçalanmaya uğratılmıştır. Bu parçalama işleminde çalışılan çeşitli derişimlerdeki 100 μ L protein çözeltilerine 10 μ L 9 mM DTT (20 mM amonyum bikarbonat çözeltisinde) çözeltisi ile 60°C de yarım saat su banyosunda bekletilmiştir. Yarım saatlik beklemenin ardından 10 μ L 20 mM IAA çözeltisi (20 mM amonyum bikarbonat çözeltisinde) eklenerek yarım saat karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından 1mg/ μ L tripsin çözeltisinden 3 μ L eklenerek 37°C de su banyosunda enzimatik parçalanma başlatılmıştır. İki saat sonunda enzimatik parçalanma işlemi 2 μ L TFA ile durdurulmuştur. Protein parçalanması ile oluşan peptit parçaları uygun matrikslerle MALDI-MS cihazında analiz edilmiştir.

3.11. Karışım ortamında IFN- γ ve VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi

Karışım ortamında aptamerin hedef protein ile özgün olarak etkileştiğini incelemek açısından yapılan deneylerde, polimerik yüzeye bağlanan çapraz bağlayıcı ve 7.0 pmol/ μ L derişimdeki aptamer çözeltisinden 100 μ L eklendikten sonra 50 μ L 7.0 pmol/ μ L Lizozim, 50 μ L 7.0 pmol/ μ L Sitokrom C, 200 μ L 7.0 pmol/ μ L IFN- γ ' nın karıştırılması ile oluşturulan çözelti yüzeye eklenmiştir. Bekleme süresinin ardından 100 μ L 100 mM tris-HCl tamponu ile yıkama yapıp enzimatik parçalama gerçekleştirilmiştir. Aynı protein çözeltisi hiçbir zenginleştirme işlemi yapmadan enzimatik parçalamaya uğratılmıştır. Ardından daha düşük derişimlerdeki etkisi incelenmek için aynı deney işlemi proteinlerin hacim miktarları sırası ile 25 μ L, 25 μ L ve 50 μ L olacak şekilde karıştırılıp tekrarlanmıştır.

VEGF proteinin karışım ortamından özgün bir şekilde seçilip analiz edilmesi için aptamer polimerik yüzeye bağlandıktan sonra 5 μ L 1.0 pmol/ μ L sitokrom C, 5 μ L 1.0 pmol/ μ L lizozim, 10 μ L 1.0 pmol/ μ L VEGF karıştırılarak yüzeye eklenmiştir. Aynı protein çözeltisi hiçbir zenginleştirme işlemi yapmadan enzimatik parçalamaya uğratılmıştır. Ardından daha düşük derişimlerdeki etkisini incelemek için aynı deney

işlemi proteinlerin hacim miktarları sırası ile 10 µL, 10 µL, 2 µL olacak şekilde karıştırılıp tekrarlanmıştır.

3.12. Kan plazma örneğinde IFN- γ ve VEGF protein zenginleştirilmesi

Birçok uygulama alanı olan aptamerin insan kan örneğinde hedef proteini yüksek özgünlükte ayırt edebilme gücünü incelemek için ticari olarak satın alınan insan kan plazması ortamında IFN- γ ve VEGF proteinleri çeşitli derişimlerde aptamer bağlı yüzeye eklenerek zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu ticari kan plazması 1 µL de 70 µg toplam protein içermektedir. IFN- γ deneyleri sırasında bu kan plazmasından 100 µL alınarak 7 mg'lık protein karışımı elde edilmiştir. Zenginleştirme işleminde önce ticari olarak alınan kan plazmasında BSA proteini özel bir kit yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından, IFN- γ aptameri bağlanan yüzeye derişimi 20 pmol/µL IFN olacak şekilde 100 µL kan plazması hazırlanmış ve eklenmiştir. Bekleme süresinin ardından yıkama işlemleri ve enzimatik parçalama işlemleri yapılarak peptitler MALDI-MS cihazında analiz edilmiştir. VEGF aptameri bağlanan yüzeyde ise derişimi 1.0 pmol/µL VEGF olacak şekilde hazırlanan 50 µL kan plazmasında zenginleştirme işlemi yapılmıştır.

3.13. Peptit sinyallerinin artması için ziptip işlemi uygulanması

VEGF protein çözeltilisinin hacminin az olması nedeni ile hacimler IFN- γ proteinin deney hacimlerinin yarısı kadar kullanılmıştır. Ziptip işleminde enzimatik parçalama sonrası ortamda bulunan DTT, IAA ya da çeşitli tuzların ortamdaki uzaklaşmasını sağlayan c-18 reçinesinden oluşan bir kit kullanılır. Bu kit sayesinde ortamdaki bu çeşitli kimyasallar uzaklaşacağı için peptit sinyallerinin daha belirgin gözlenebilme ihtimali vardır. Bu amaçla VEGF peptitlerinin bulunduğu çözeltiye ziptip işlemi uygulanmıştır. Bu işlemde hidratlama, yıkama ve elüsyon çözeltisi olmak üzere üç çözelti bulunmaktadır. Hidratlama çözeltisi % 50 ACN, % 50 su, % 0,1 TFA dan oluşurken; yıkama çözeltisi % 0,1 TFA sulu çözeltisinden oluşmaktadır. Elüsyon çözeltisi ise % 80 ACN, % 20 su, % 0.1 TFA dan oluşmaktadır. C18 ziptip ucu mikropipetlere takılmış, üç kez 3 µL yıkama çözeltisinden geçirilmiştir. Ardından iki kez bağlanma çözeltisi alınıp ve ziptip uygulanacak çözeltiden 10 µL alınmıştır. Alıp bırakma işlemi birkaç defa tekrar edilmiştir. Ardından üç kez elüsyon çözeltisi ile bağlanan peptitler 3 µL ye deriştirilir. Daha derişik ve tuzundan arındırıldığı için çözeltide var olan peptit sinyallerinde artış gözlemlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

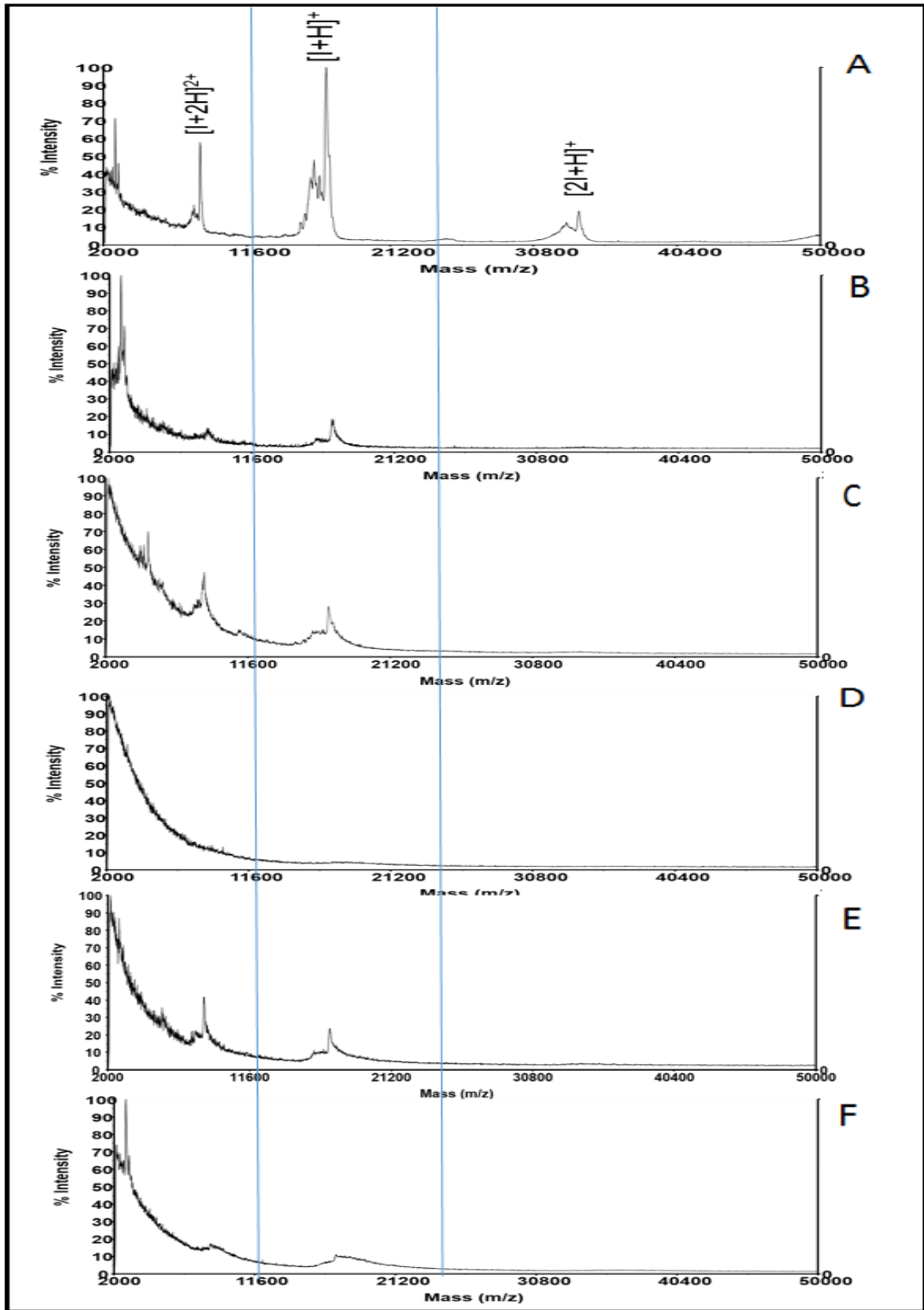
4.1. IFN- γ proteinin analizleri

4.1.1. IFN- γ proteini ve IFN- γ aptamerinin MALDI-MS ile analizleri

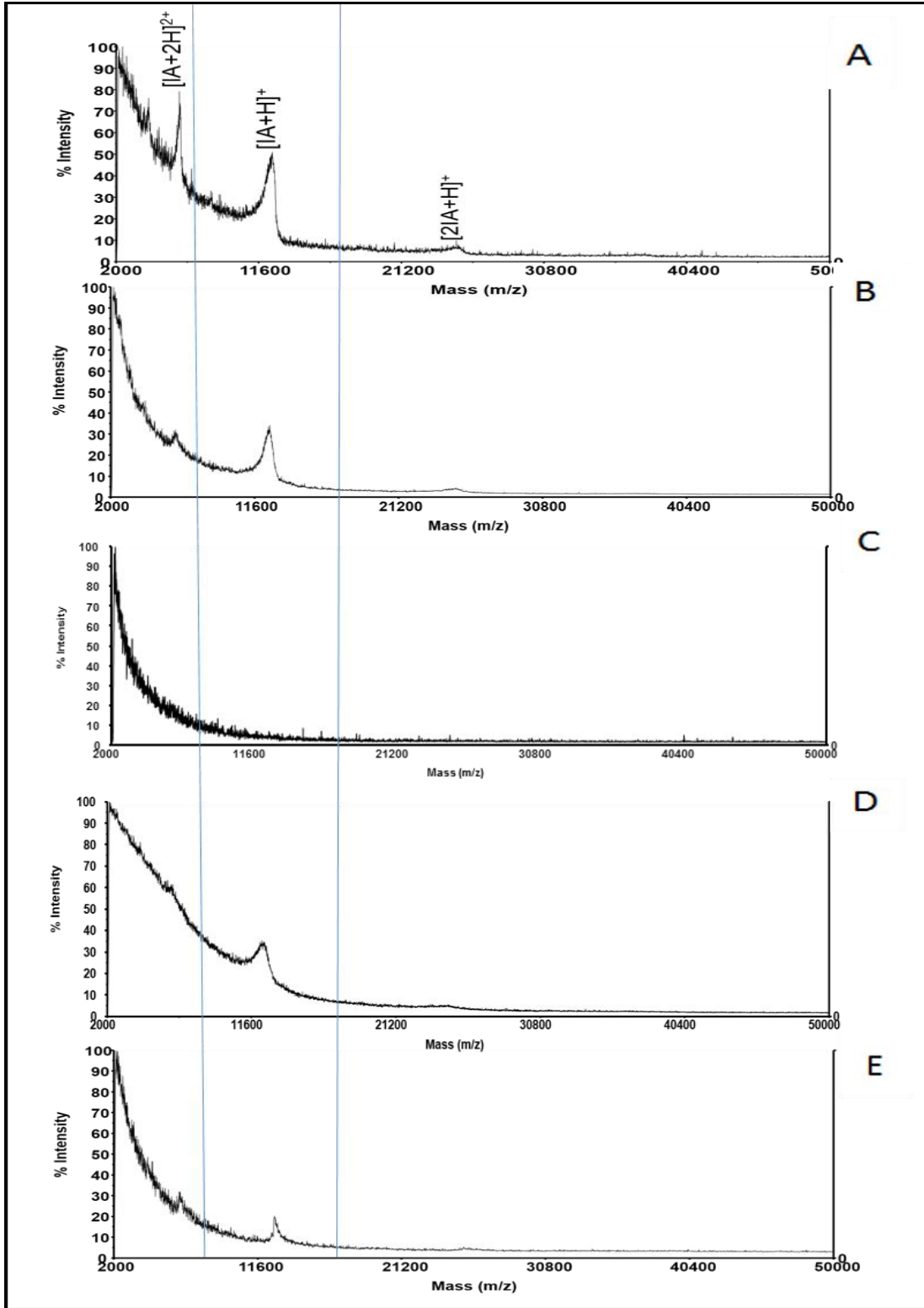
IFN- γ proteini ve aptamerinin kütle spektrumlarını en iyi şekilde almak için çeşitli MALDI matriksleri ile analizler yapılmıştır. İki mavi çizgi arasında olan 17,000 Da civarında IFN- γ proteinine ait '+1' yüklü moleküler iyon sinyalinin([I+H]⁺) gelmesi beklenmektedir.

IFN- γ proteini 3HPA, ATT, DHB, SA, THAP, DHB 2 matriksleri ile ince tabaka örnek hazırlama metodu uygulanarak analiz edilmiştir (Şekil 4.1.). Analizler sonunda yaklaşık 17 kDa molekül ağırlığında olan IFN- γ proteinin 3HPA matriksi ile uygun spektrumlar alınamamasına rağmen, ATT, SA, DHB, THAP, DHB 2 matriksleri ile uygun spektrumlar alınmıştır. SA ile alınan spektrumda IFN- γ proteinine ait '+1' yüklü moleküler iyon sinyalinin yanı sıra dimer yapısı için 34 kDa civarında sinyali ([2I+H]⁺) ve IFN- γ proteininin '+2' yüklü yani çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ([I+2H]²⁺) 8.5 kDa civarında gözlemlenmiştir. DHB ve DHB 2 matrikslerinde de sinyallerin daha yayılmış halde olmasına rağmen moleküler iyon sinyalinin ve çift protonlanmış iyon sinyalleri gözlemlenebilmektedir.

IFN- γ proteinine özel olarak sentezlenen aptamer ise DHB, ATT, SA, THAP, 3HPA matriksleri ile ince tabaka örnek hazırlama metodu uygulanarak analiz edilmiştir (Şekil 4.2.). Analizler sonucunda aptamer için iki mavi çizgi arasında gözlemlenmesi gereken '+1' yüklü molekül iyon sinyalinin([IA+H]⁺) değeri 12,638 Da olup SA matriksi ile alınan kütle spektrumunda moleküler iyon sinyali gözlemlenmemesine rağmen, DHB, ATT, SA, THAP matriksleri ile aptamere ait moleküler iyon sinyali 12.6 kDa civarında gözlemlenmiştir. THAP matriksi ile alınan kütle spektrumunda 6.3 kDa civarında moleküle ait çift protonlanmış iyon sinyali ([IA+2H]²⁺) belirgin bir şekilde gözlenirken, 3HPA ve ATT matriksinde bu sinyalin şiddeti zayıflamıştır. Ayrıca aptamerin dimerine ait olan 25 kDa civarında bulunan sinyal ([2IA+H]⁺) THAP, ATT, DHB gibi matriksler yardımıyla gözlemlenebilirken aptamerin hem çift protonlanmış hem de dimerinin gözlenebildiği matriks THAP'tır.



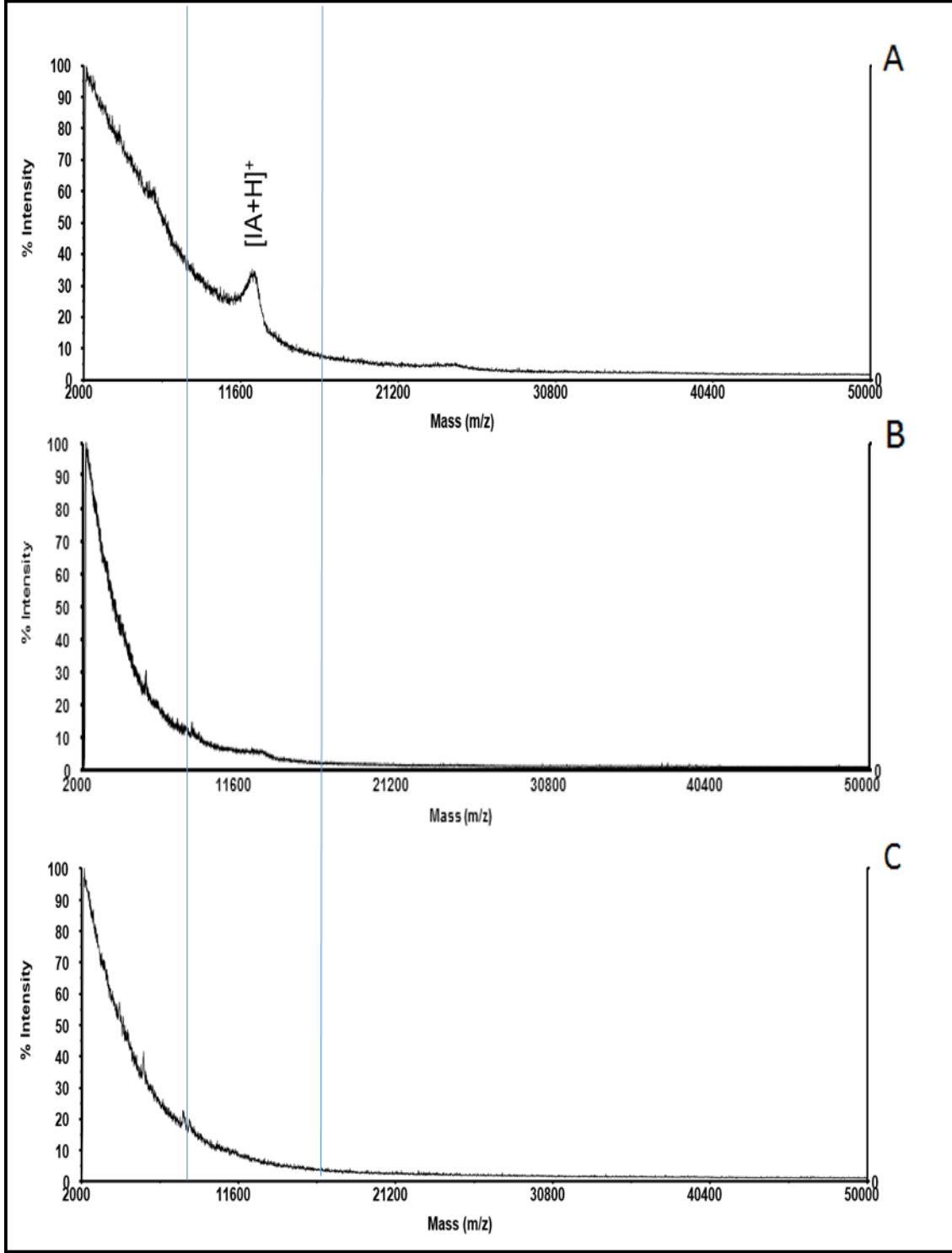
Şekil 4.1. IFN- γ protein çözeltisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) SA matriksi ile, (B) ATT matriksi ile, (C) DHB matriksi ile, (D) 3HPA matriksi ile, (E) THAP matriksi ile ve (F) DHB 2 matriksi ile IFN- γ proteinin MALDI-TOF-MS analizi.



Şekil 4.2. IFN- γ aptamer çözeltisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) THAP matriksi ile, (B) ATT matriksi ile, (C) SA matriksi ile, (D) DHB matriksi ile ve (E) 3HPA matriksi ile IFN aptamerinin MALDI-TOF-MS analizi.

4.1.2. IFN- γ aptamerinin $\text{\text{\text{\text{\text{\text{\text{}}}}}}}$ bağlayıcıya bağlanması

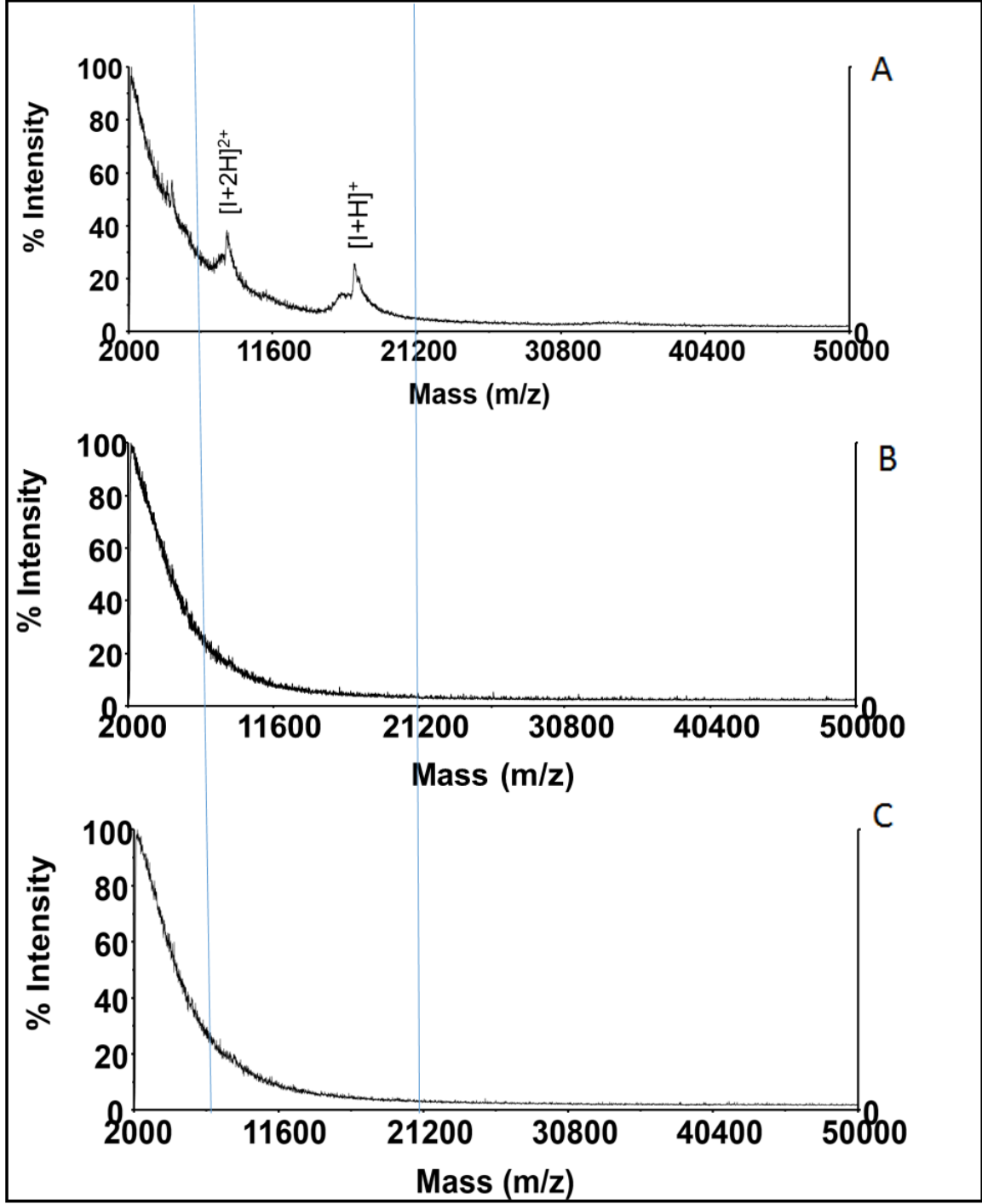
Polimerik yüzeye çapraz bağlayıcının bağlanmasının ve gerekli yıkamaların ardından eklenecek olan $100 \mu\text{L}$ $7.0 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ aptamer çözeltisinin analizi yapılmıştır. Aptamerin yüzeye eklenmesinin ve bekleme süresinin ardından polimerik katı yüzey üstündeki çözeltide aptamer varlığı analiz edilmiştir. Daha sonra yıkama yapılarak var ise fazla aptamerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi 3 defa $1000 \mu\text{L}$ 100 mM tris-HCl tamponu ile yapılmıştır. Son yıkamanın ardından yıkama çözeltisi yüzeyden aptamer ayrılışının kontrolü amaçlı analiz edilmiştir. Alınan kütle spektrumları incelendiğinde; yaklaşık 12 kDa molekül ağırlığında olan aptamerin yüzeye eklenmeden önceki çözeltisinde aptamer varlığı belirgin olduğu tespit edilmiştir. Yüzeye eklenen aptamer çözeltisinin bekleme süresinin sonundaki analizinde aptamere ait moleküler iyon sinyalin büyük oranda şiddetinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bağlanma öncesi ve sonrası spektrumlar karşılaştırıldığında çözeltide aptamerin yüzeye bağlanması ile derişiminin büyük miktarda azaldığını gözlemlenmiştir. Yıkama çözeltisinin analizinde ise ortamda bağlanmayan ya da yıkama tamponu ile gelen aptamer varlığı tespit edilememiştir. (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. (A) 7.0 pmol/µL IFN-γ aptamer çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) Aptamer çözeltisi çapraz bağlayıcı yüzeye eklenip uygun bekleme süresinin ardından ortamdaki çözelti formunun DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Yıkamalar sonrası yıkama çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.3. IFN- γ proteinin yüzeye bağlanan aptamerle etkileşimi

Polimerik yüzeydeki çapraz bağlayıcıya aptamer yapısının bağlanmasının ve gerekli yıkamaların ardından eklenecek olan 100 μ L ve 7.0 pmol/ μ L IFN- γ çözeltisinin analizi yapılmıştır. Yüzeye eklenen proteinin çözeltisinin bekleme süresinin ardından polimerik katı yüzey üstündeki çözeltide protein varlığı analiz edilmiştir. Daha sonra yıkama yapılarak var ise fazla protein uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkama işlemi 3 defa 1000 μ L 100 mM tris-HCl tamponu ile yapılmıştır. Son yıkamanın ardından yıkama çözeltisi yüzeyden protein ayrılışının kontrolü amaçlı analiz edilmiştir. Alınan kütle spektrumları incelendiğinde yaklaşık 17 kDa molekül ağırlığında olan proteine ait moleküler iyon sinyali ($[I+H]^+$) ve 8,5 kDa civarında olan çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ($[I+2H]^{2+}$) yüzeye eklenmeden önceki çözeltisinde protein varlığını göstermektedir. Bekleme süresinin sonunda yüzeyin üstündeki çözeltiliye ait kütle spektrumunda proteine ait olan sinyalin çok büyük oranda şiddetinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bağlanma öncesi ve sonrası spektrumlar karşılaştırıldığında çözeltideki protein yapısının büyük oranda yüzeydeki aptamerle ikincil etkileşime girdiği görülmektedir. Yıkama çözeltisinin analizinde ise ortamda bağlanmayan ya da yıkama tamponu ile gelen protein varlığı gözlemlenememiştir (Şekil 4.4.).

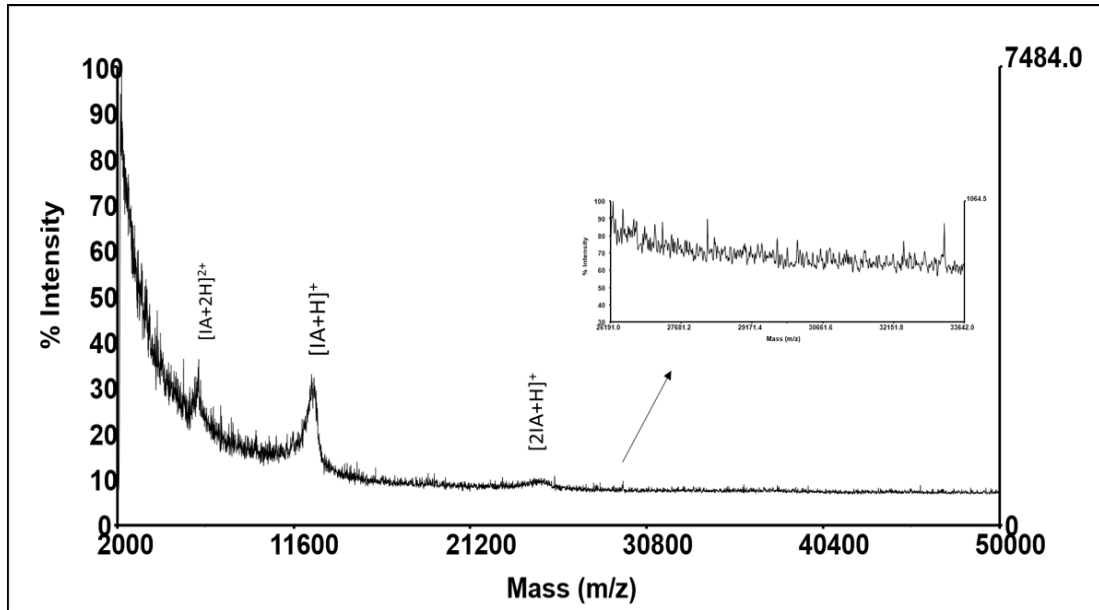


Şekil 4.4. (A) 7.0 pmol/µL IFN- γ protein çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) IFN- γ çözeltisinin aptamer bağlı yüzeye eklenip beklemesinin ardından ortamdaki çözelti formunun DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Yıkamalar sonrası yıkama çözeltisinin DHB matriksi ile elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.4. IFN- γ -aptamer kompleksinin MALDI-MS ile analizi

Literatürde aptamer-protein kompleksinin MALDI-MS ile analizi için genellikle asidik olmayan pH 7 civarında olan ATT gibi matrisler kullanılmaktadır [122, 123]. Aptamer-IFN- γ kompleksini analiz etmek için 7.0 pmol/ μ L derişimindeki aptamer çözeltisinden 50 μ L eklenip 7.0 pmol/ μ L çözeltisindeki IFN proteininden 50 μ L eklenmiştir. Kompleks oluşumu için 20 mM lık tris-HCl tamponu ortama eklenerek ortamın pH ının 7.4 civarında olması sağlanmıştır. Belirli bekleme süresinin ardından literatüre uygun olarak ATT matrisi kullanılarak yapılan analizlerde kompleks oluşumu gözlemlenememiştir (Şekil 4.5.). IFN- γ -aptamer kompleksi 30 kDa civarında gözlemlenmesi gerekmektedir. Ancak sadece ikincil etkileşimlerle birbirine bağlı olan aptamer ve protein, lazerin enerjisi ile ikincil etkileşimleri zayıflayarak gaz fazında ayrılmaktadır. Gaz fazına geçen aptamerin '+1' yüklü sinyali ([IA+H]⁺) yaklaşık 12.6 kDa gözlenirken '+2' yüklü sinyali ([IA+2H]²⁺) ise 6,300 Da civarında gözlemlenmiştir. Şekil 4.5.' de IFN aptamer-protein kompleksi civarında gözlemlenememiştir.

Literatürde yapılan kovalent olmayan etkileşimine dair çalışmalarda etkileşimi en iyi şekilde gözlemlmek için μ M gibi yüksek derişimlerde çalışılmıştır [122, 123]. Tez kapsamındaki gibi düşük derişimlerde aptamer- IFN- kompleksinin gözlemlenememesi bağlanan proteinin tripsin ile parçalanarak peptit fragmentlerinin analizine yöneltmiştir.



Şekil 4.5. IFN- γ - aptamer kompleksinin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS ile analizi.

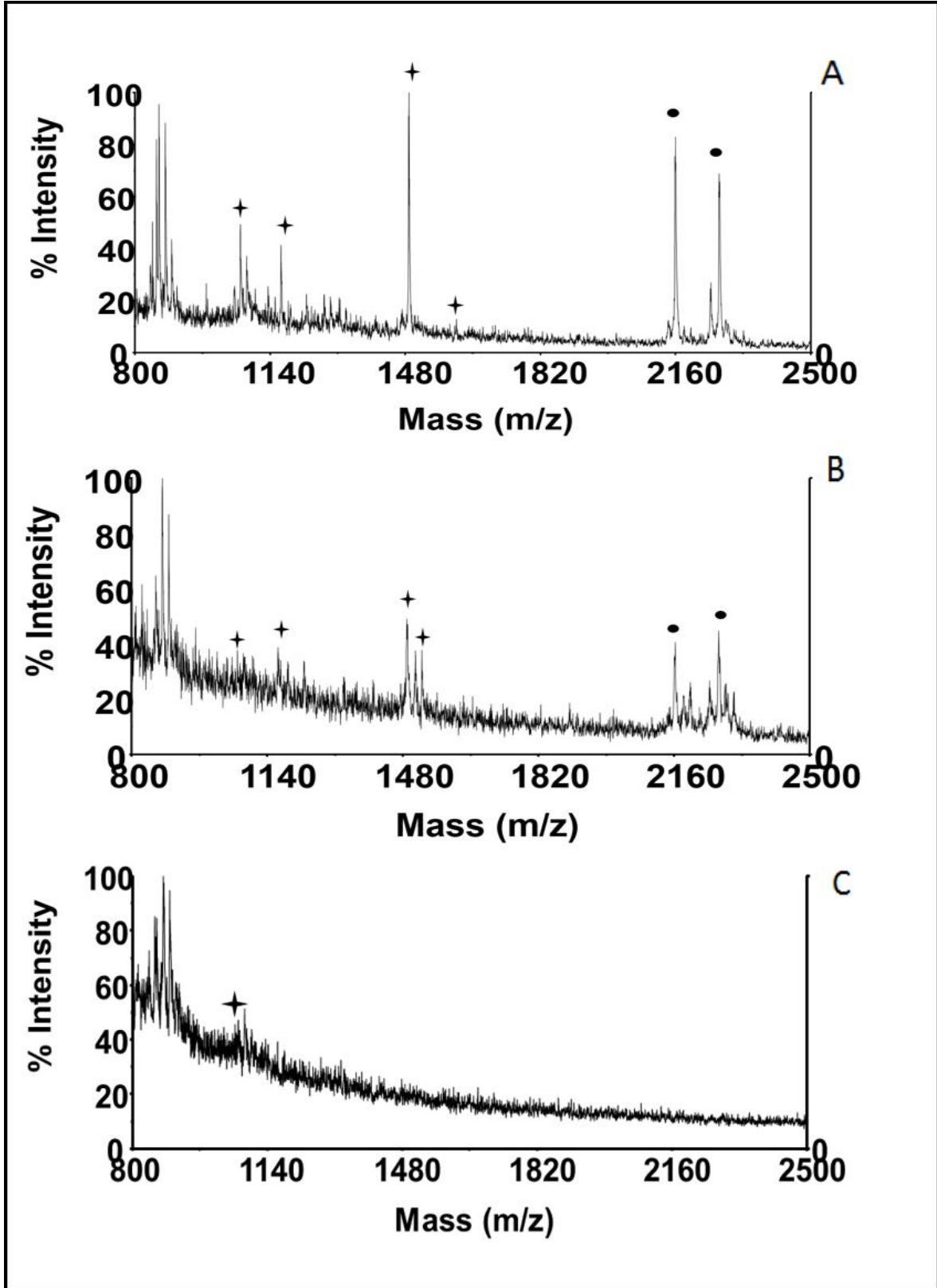
4.1.5. Farklı derişimlerde IFN- γ protein çözeltilerinin enzimatik parçalanması ve aptamer bağılı yüzeylerde farklı derişimlerde IFN- γ proteini zenginleştirilmesi

Sinyal şiddetlerinde azalma olması ve ayırıcılığın düşük olması gibi birçok zorluklar proteinlerin bütün halde analizinin yapılmasında güçlük çıkarmaktadır. Bu sorunlardan kurtulmak için zenginleştirme sonrası enzimatik parçalama ile oluşan peptit sinyalleri ile analizler ve yorumlamalar yapılmıştır. Tez kapsamında IFN- γ ait peptitler“ ✦ “ işareti ile tripsine ait otokataliz ürünleri “ ● “ gösterilmiş olup peptit fragmentlerinin kütleleri Çizelge 4.1. de tablo halinde verilmiştir.

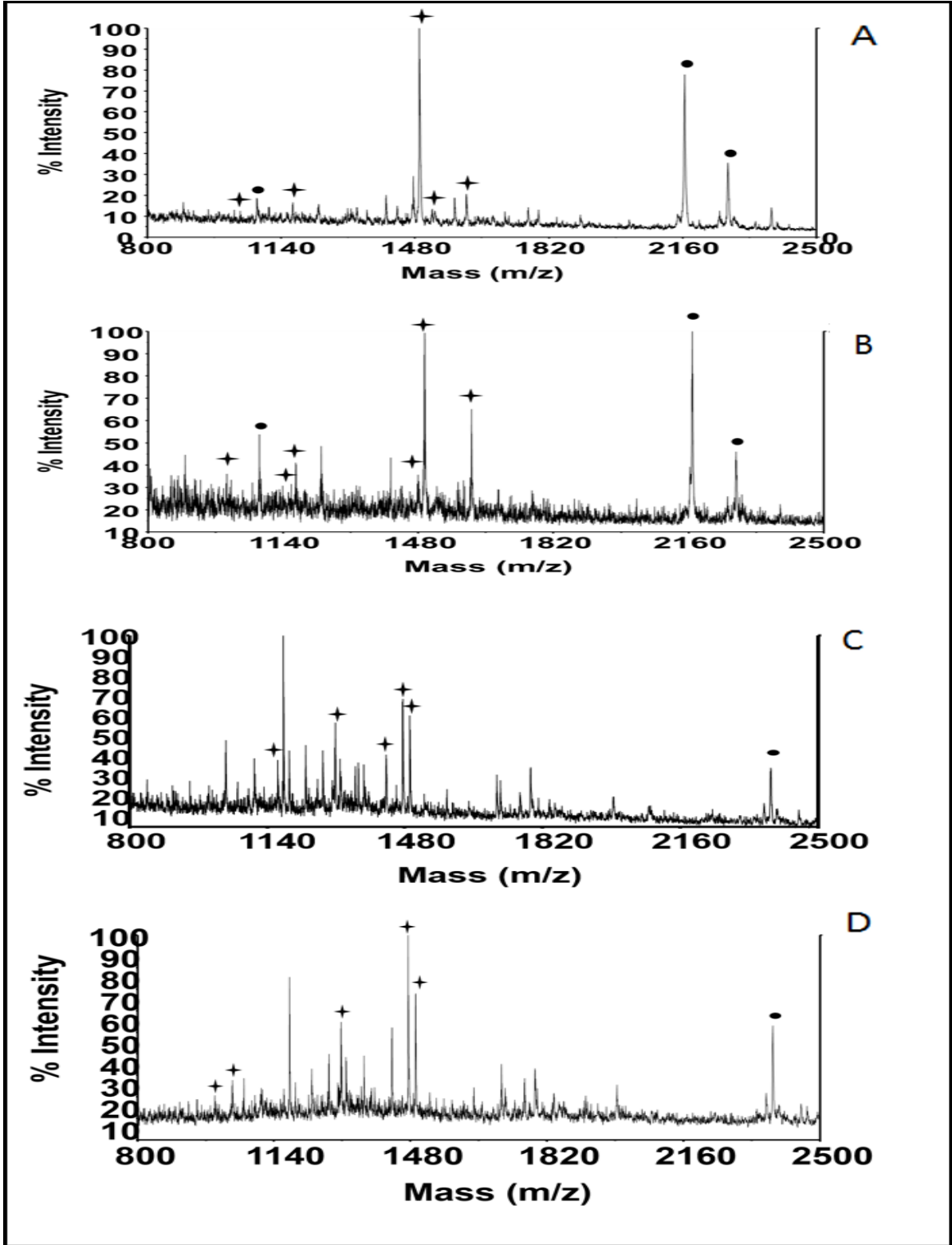
7.0 pmol/ μ L, 0.7 pmol/ μ L, 0.07pmol/ μ L derişimlerine sahip olan IFN- γ protein çözeltileri hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitler MALDI-MS ile analiz edilmiştir (Şekil 4.6.). Alınan kütle spektrumlarında var olan peptitlerin çözelti ortamında çok iyi gözlenemediği, 7.0 pmol/ μ L derişimin altındaki derişimlerde peptilere ait sinyallerin gözlenemediği görülmüştür. Daha sonra aptamer yapıları ile 7.0 pmol/ μ L, 0.7 pmol/ μ L, 0.07 pmol/ μ L, 0.007 pmol/ μ L derişimlerdeki IFN- γ proteinlerin zenginleştirilmesi deneyleri yapılmıştır (Şekil 4.7.). Bu deneyler sonucu zenginleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve peptit sinyal şiddetlerinin çözeltideki peptit sinyal şiddetlerine oranla arttığı gözlemlenmiştir. Çözelti ortamında 0.07 pmol/ μ L derişimindeki protein çözeltisine ait peptit sinyalleri gözlemlenemezken bu derişimden 10 kat daha az derişime sahip olan 0.007 pmol/ μ L derişimindeki protein peptitlerinin zenginleştirme sayesinde analiz edilebildiği görülmüştür(Şekil 4.8.).

IFN- γ			Tripsin
994.52	1063.48	1066.21	1077.56
1151.38	1169.38	1278.72	1478.73
1306.72	1307.57	1392.71	1611.80
1473.67	1490.76	1491.80	2163.05
1522.78	1611.84	1650.88	2273.15

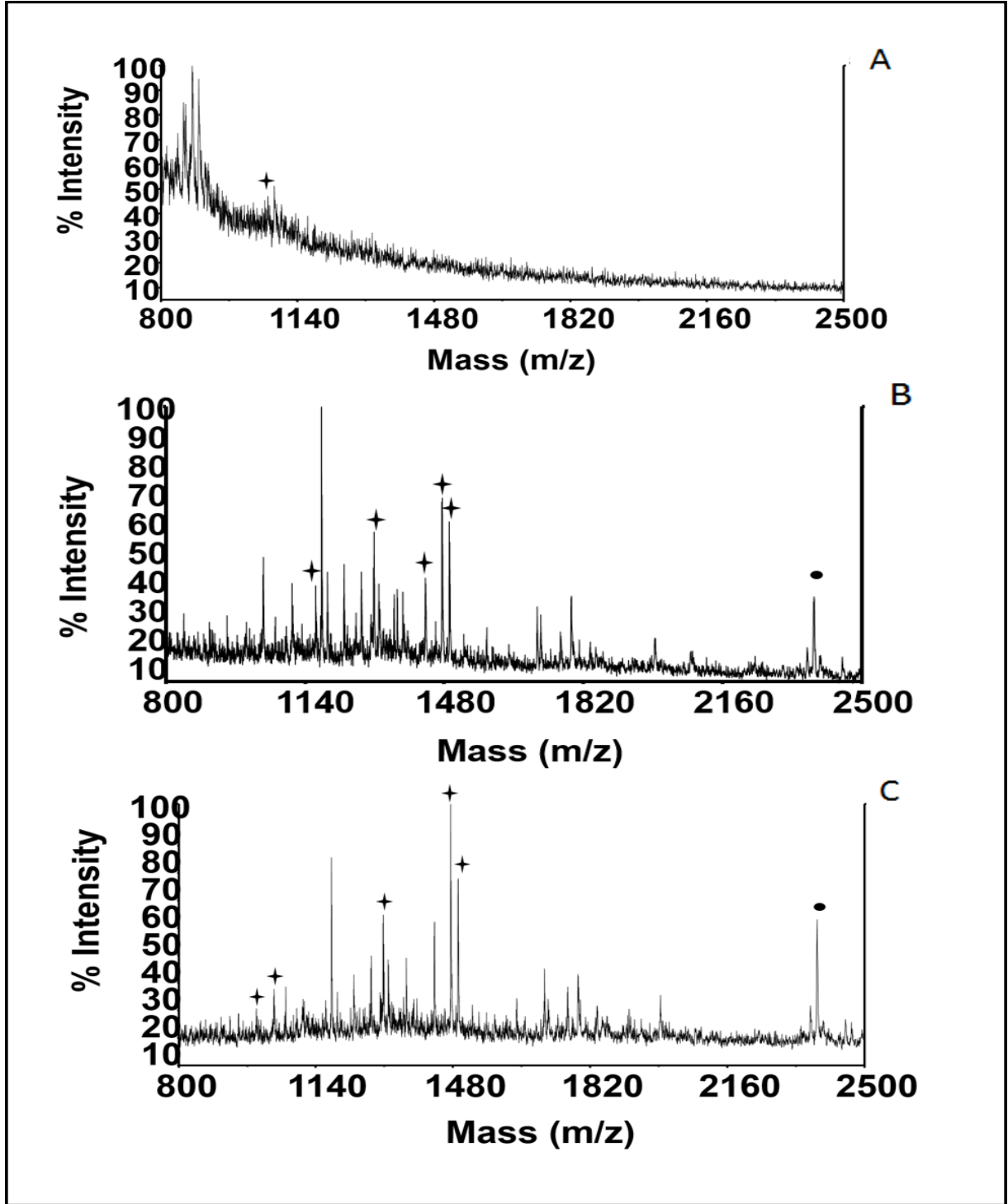
Çizelge 4.1. IFN- γ proteinine ait peptit fragment kütleleri (Da) ve tripsin enzimine ait otokataliz ürünlerin kütleleri.



Şekil 4.6. (A) 7.0 pmol/μL, (B) 0.7 pmol/μL ve (C) 0.07 pmol/μL derişimlerine sahip olan IFN-γ protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



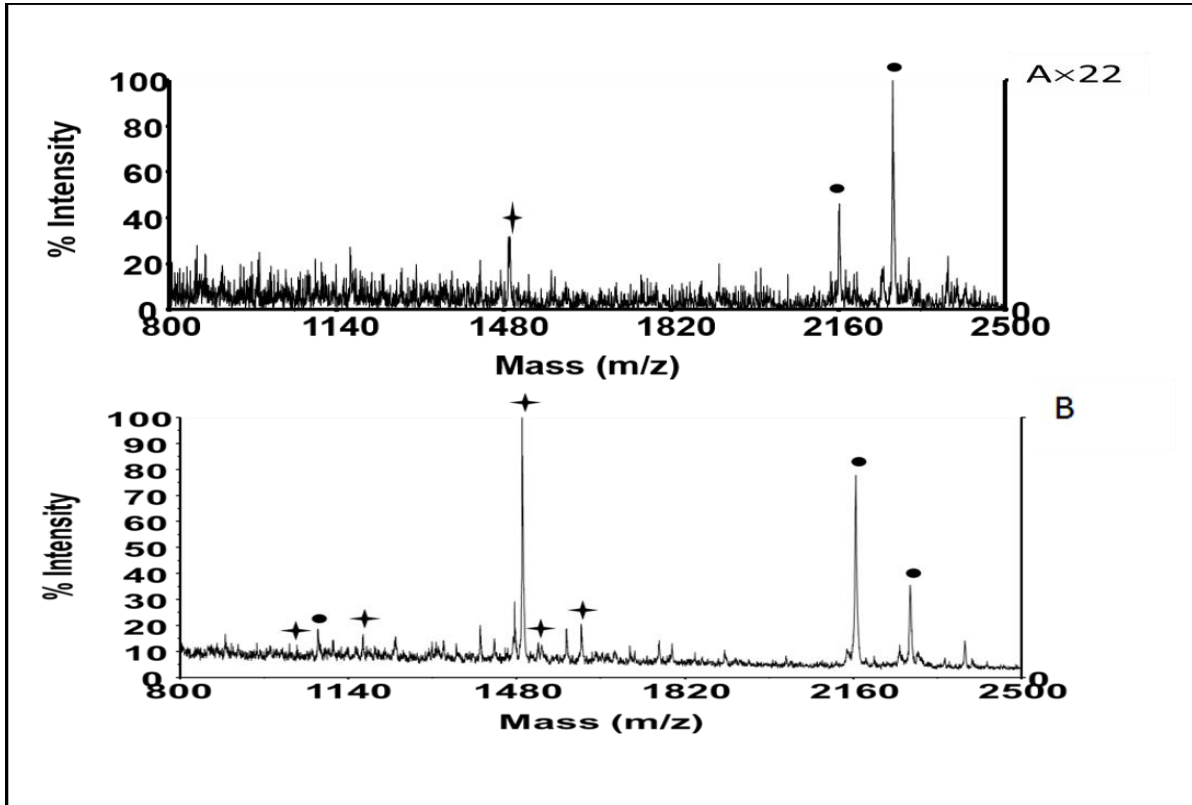
Şekil 4.7. Aptamer bağlı yüzeyde IFN- γ proteininin zenginleştirilmesi. (A) 7.0 pmol/ μ L, (B) 0.7 pmol/ μ L, (C) 0.07 pmol/ μ L ve (D) 0.007 pmol/ μ L derişimlerine sahip olan IFN- γ proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.8. (A) 0.07 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları, (B) 0.07 pmol/µL ve (C) 0.007 pmol/µL derişimlerine sahip olan IFN-γ proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

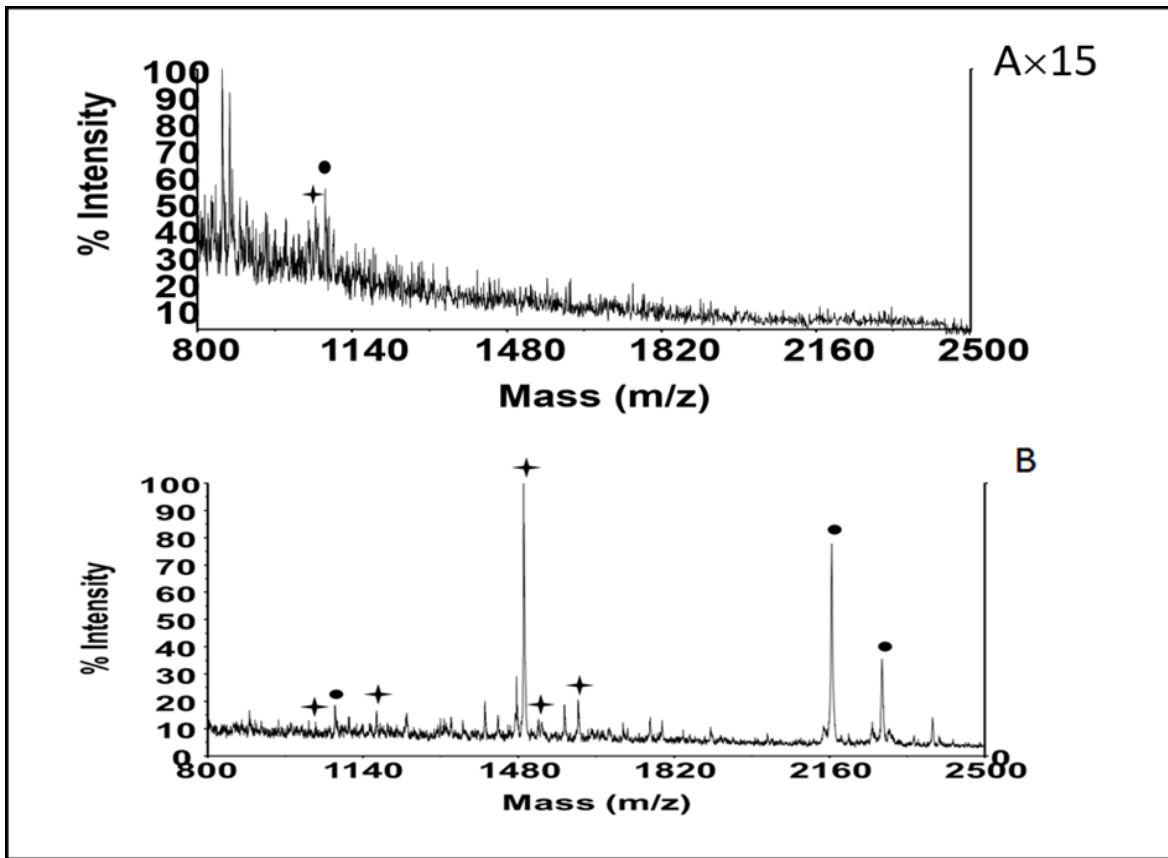
4.1.6. IFN- γ proteinin yüzeye ve çapraz bağlayıcı ile etkileşiminin incelenmesi

IFN- γ proteinin yüzeye etkileşimini incelemek amaçlı polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı ve aptamer olmadan 100 μ L ve 7.0 pmol/ μ L IFN- γ protein çözeltisi eklenmiş ve gerekli bekleme süresinin ardından yıkama yapılarak bağlanmayan protein uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkamanın ardından normal deney işlemlerindeki enzimatik parçalama işlemi gerçekleştirilerek var olan peptitlerin analizi yapılmıştır. Yüzeyde çapraz bağlayıcı ve aptamer varlığındaki ve yokluğundaki protein bağlanmasına ait kütle spektrumları karşılaştırıldığında (Şekil 4.9.); aptamer ve çapraz bağlayıcı yokluğunda polimerik yüzey ile IFN- γ proteinin etkileşiminin yok denecek kadar az olduğu çapraz bağlayıcı ve aptamer varlığında ise zenginleştirmenin oldukça başarılı olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.9. Polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı ve aptamer yokluğunda eklenen 7.0 pmol/ μ L protein çözeltisi yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Polimerik yüzeyde çapraz bağlayıcı ve 7.0 pmol/ μ L interferon aptamer varlığında yüzeye eklenen 7.0 pmol/ μ L IFN- γ proteinin yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.

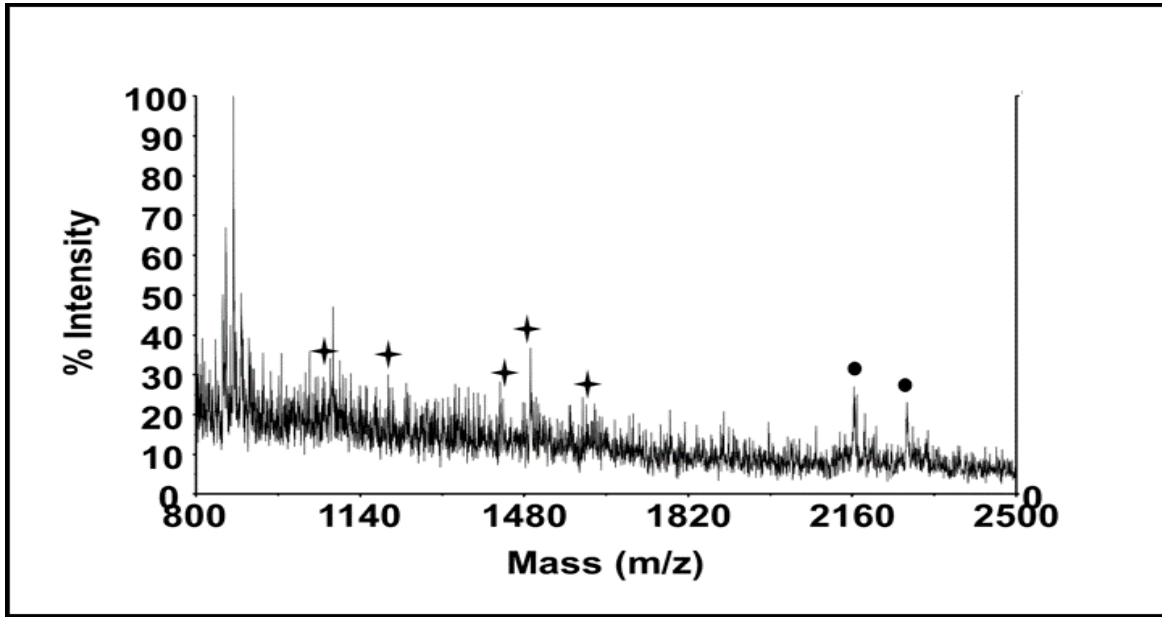
IFN- γ proteininin çapraz bağlayıcı ile etkileşimini incelemek için ise polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı bağlandıktan sonra aptamer bağlanmadan 7.0 pmol/ μ L ve 100 μ L IFN- γ proteini eklenmiş ve gerekli bekleme süresi ve yıkamalardan sonra enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlere ait kütle spektrumları alınmıştır. Alınan kütle spektrumlarında aptamer yokluğunda proteinin çapraz bağlayıcıyla etkileşime girmediği gözlemlenmiştir. Aptamer varlığında yapılan deneyden elde edilen sonuç kıyaslandığında (Şekil 4.10.), IFN- γ ' nın aptamer varlığında peptit sinyallerinin gözlemlendiği, aptamer yokluğunda ise peptit sinyalleri gözlemlenmediği tespit edilmiştir.



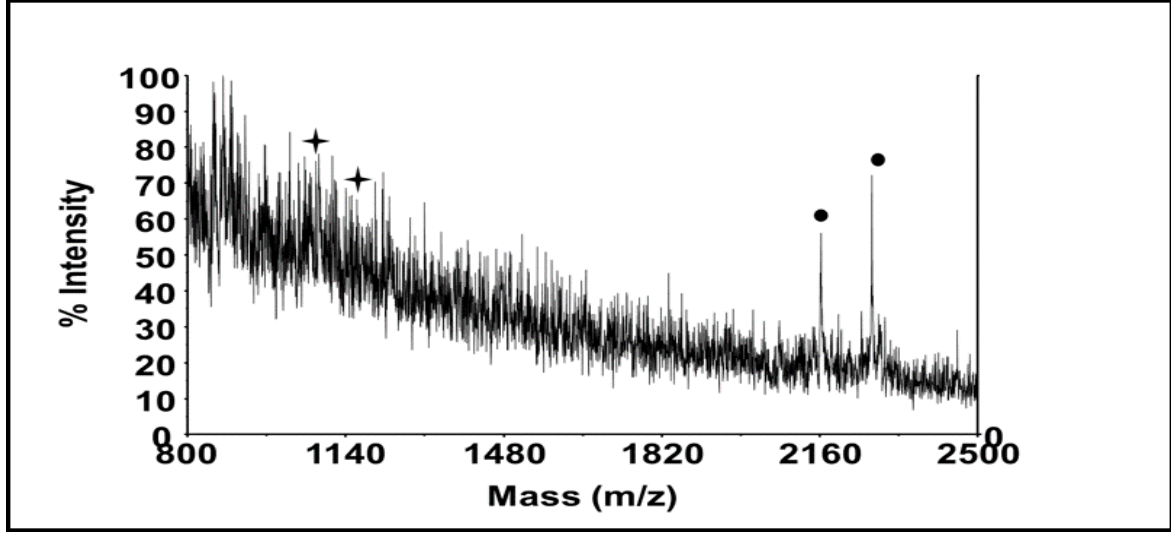
Şekil 4.10. Polimerik yüzeyde çapraz bağlayıcı ekledikten sonra aptamer olmadan eklenen 7.0 pmol/ μ L protein çözeltisinin yıkamalar ve enzimatik parçalama sonrası elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Polimerik yüzeye bağlanan çapraz bağlayıcı ve 7.0 pmol/ μ L IFN- γ aptameri ardından yüzeye bağlanan 7.0 pmol/ μ L IFN- γ proteininin enzimatik parçalanma sonrası pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.7. Enzimatik parçalamaya sonrası yüzeyde peptit varlığının kontrolü

Aptamer ile etkileşen proteinin yıkamalar ve enzimatik parçalamaya uğratılması sonucu oluşan peptitlerinin çözelti formuna geçmek yerine yüzeyle ikincil etkileşime girip girmediğinin kontrolü amaçlanmıştır. Enzimatik parçalamaya sonrası polimerik yüzeyin üzerindeki çözelti uzaklaştırıldıktan sonra % 50 ACN, % 50 SU, % 0.5 TFA dan oluşan elüsyon çözeltisi ile yüzey muamele edilmiştir. Elüsyon çözeltisinin var olan peptitleri çözelti ortamına alması için yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra bu elüsyon çözeltisi (Şekil 4.11.) ve polimerik yüzey (Şekil 4.12.) MALDI-MS ile analiz edilmiştir. Alınan kütle spektrumlarında peptitlere ait sinyaller oldukça düşük gözlemlenmiştir. Analiz sonuçlarına dayalı olarak enzimatik parçalanma sonucu oluşan peptitlerin yüzeyle etkileşime girmediğini, oluşan peptitlerin çoğunun parçalamaya sonrası çözelti fazına geçtiği belirlenmiştir.



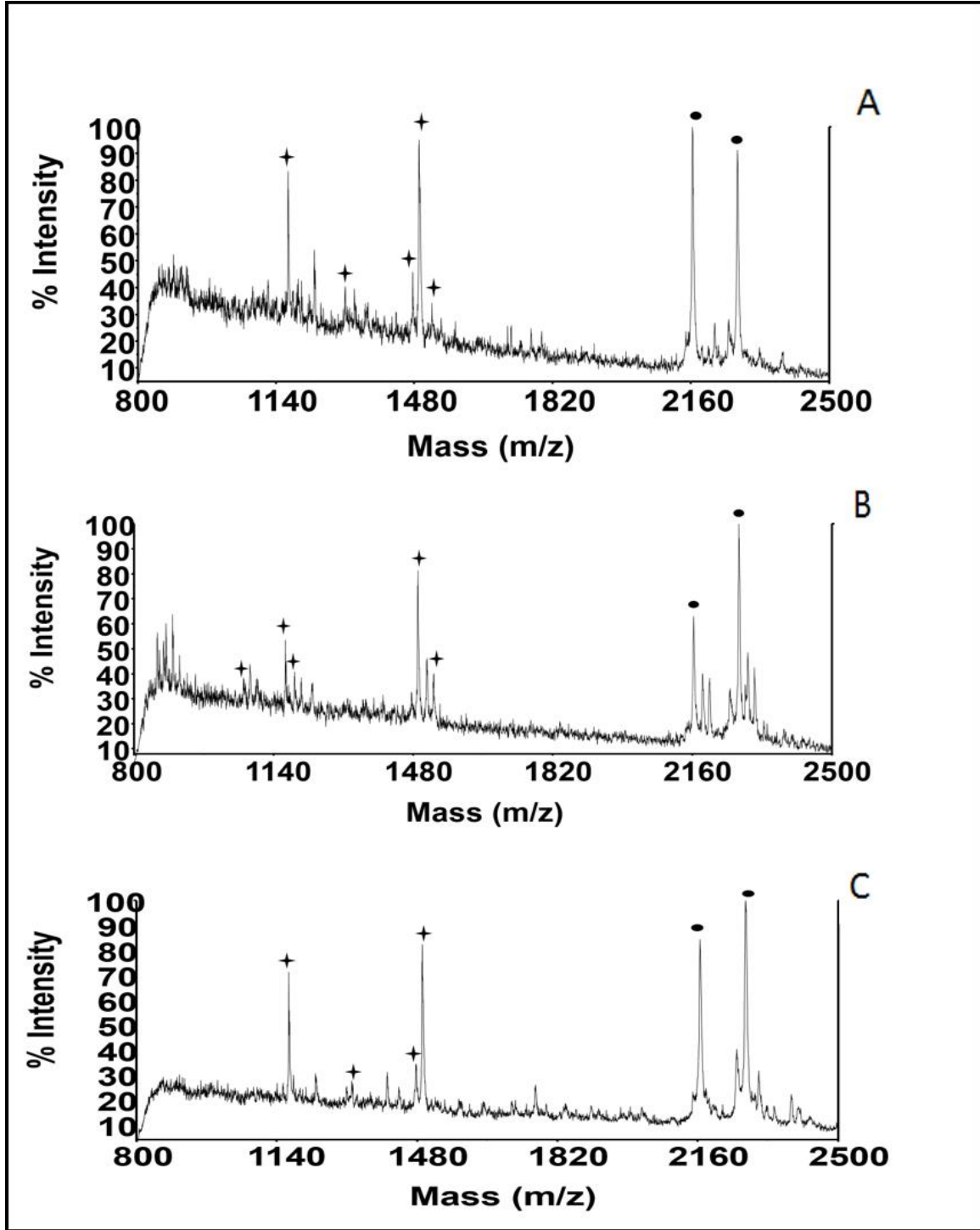
Şekil 4.11. 7.0 pmol/μL IFN-γ proteini eklenen yüzeyde parçalanma işlemi bittikten sonra elüsyon çözeltisi (% 50 ACN, % 50 SU ve % 0.5 TFA) ile muamele edilen yüzeyin çözelti formuna ait pozitif iyon MALDI-TOF-MS spektrumu.



Şekil 4.12. 7.0 pmol/ μ L IFN- γ proteini eklenen yüzeyde parçalama işlemi bittikten sonra elüsyon çözeltisi (% 50 ACN, % 50 SU ve % 0.5 TFA) ile muamele edilen yüzey formuna ait pozitif iyon MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.8. Enzimatik parçalamayı asit ile sonlandırmanın peptit sinyallerine etkisi

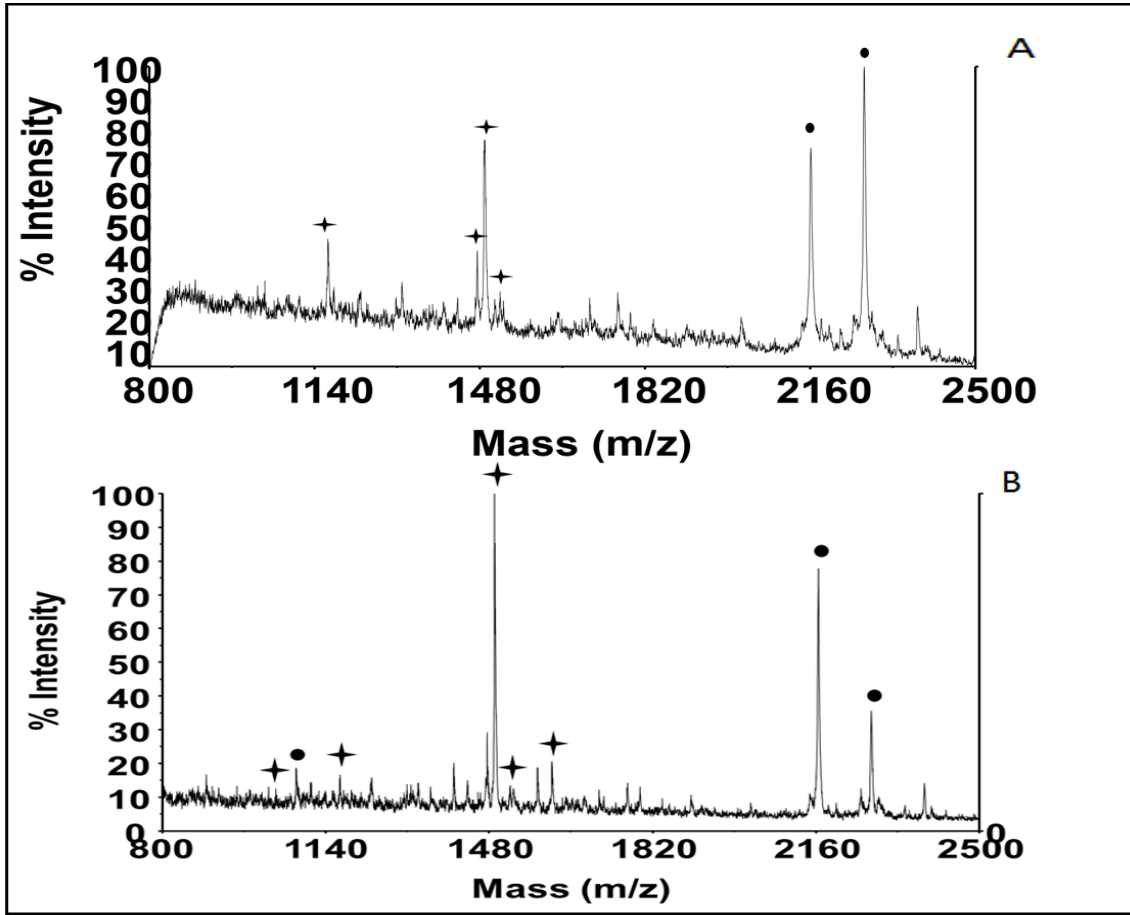
Aptamer ile etkileşen 7.0 pmol/ μ L derişimindeki proteinin; DTT, iyodoasetamid ve tripsin ile enzimatik parçalama işlemi yaklaşık 3 saat sürdürülmüştür. Bu süre sonunda genel olarak enzimatik parçalama 2 μ L TFA ile sonlandırılmıştır. Bu sonlandırma işleminin elde edilen peptit sinyallerine etkisini incelemek için zenginleştirme işlemi sonrası polimerik yüzeyin üzerindeki çözelti 3 eşit hacime ayrılarak analiz edilmiştir. Eşit hacimdeki çözeltilerden biri hiçbir durdumaya uğratılmamış, biri seyreltik asit ile sonlandırılmış diğeri ise normal TFA ile sonlandırılmıştır. Daha sonra bu çözeltilerin MALDI-TOF-MS ile analizi yapılmıştır (Şekil 4.13.). Elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde peptit sinyal şiddetlerinde çok fark gözlemlenmemiştir. Bu durum protein yapısının peptitlerine ayrılması için 1 mg/ μ L tripsin çözeltisinden 3 μ L eklenerek 37°C de su banyosunda 2 saat bekletilme işleminin yeterli olduğu ve bu durum sonunda yeterince peptit oluştuğu için tripsinin aktivitesinin durdurulmasının peptit oluşumuna önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.13. 7.0 pmol/µL IFN- γ proteininin zenginleştirme sonrası (A) Durdurulmayan Enzimatik parçalanma çözeltisinin, (B) seyreltik TFA ile durudurulan enzimatik parçalanmanın çözeltinin ve (C) 1 µL derişik TFA ile durdurulan enzimatik parçalama çözeltisinin elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.1.9. Bağlanma ve enzimatik parçalama sürelerinin peptit sinyallerine etkisi

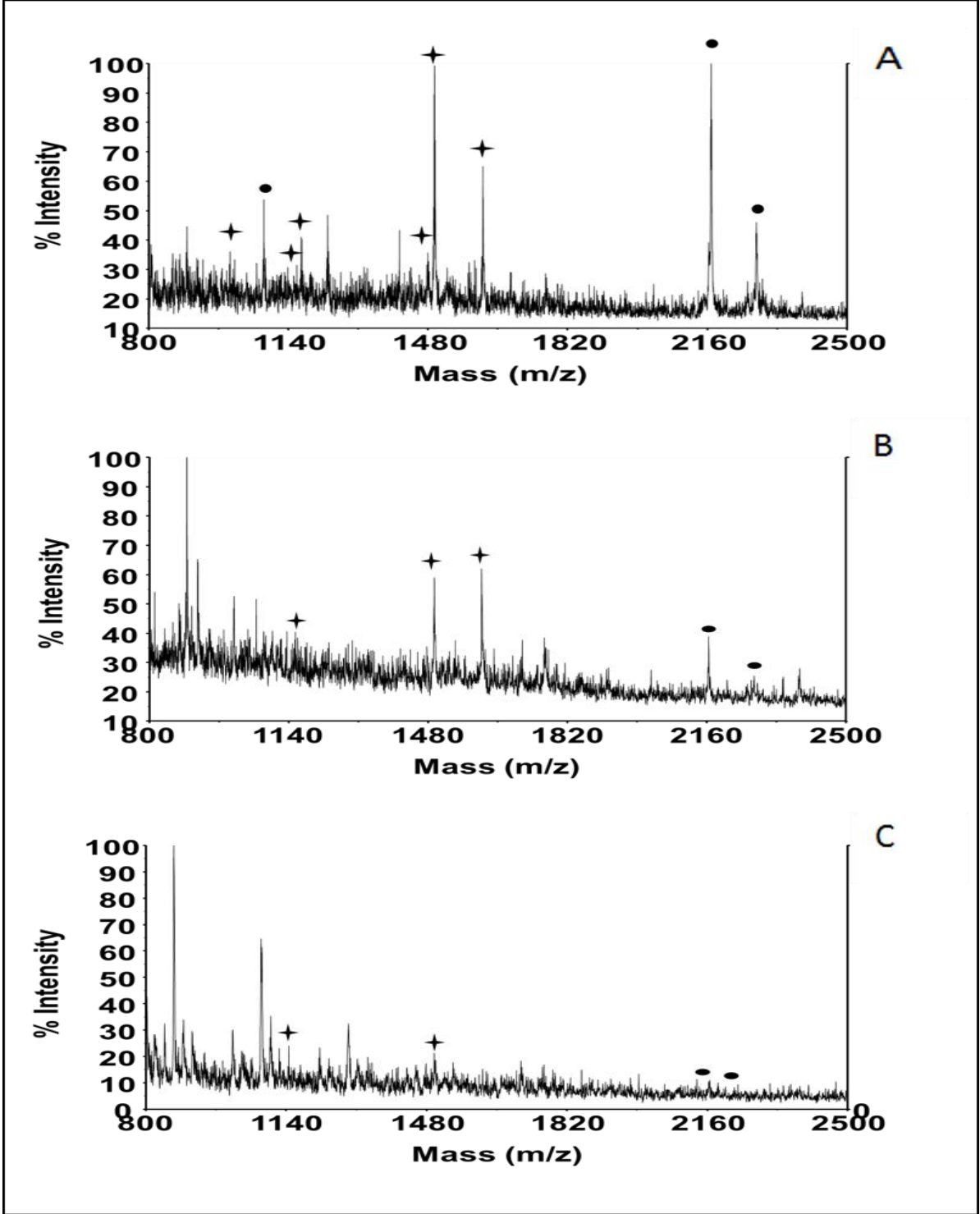
Aptamerin çapraz bağlayıcıya ve proteine bağlanma etkinliğinin artması amacı ile bağlanma süreleri iki katına çıkarılarak deney tekrar gerçekleştirilmiştir. Aptamerin bağlanması için 4 saat, proteinin bağlanması için 4 saat beklendikten sonra bağlanma sonrası proteinlerin peptitlere daha iyi parçalanmasını sağlamak için enzimatik parçalanma süresi de iki katına çıkarılmıştır. Bağlanma ve parçalanma sürelerinin iki katına çıkarıldığı deneyden elde edilen sonuçlarda (Şekil 4.14.) peptit sinyal şiddetlerinde önemli bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Bu deneysel sonuçlara dayanarak aptamer ve protein için yaklaşık 2 saat olan bağlanma sürelerinin ideal olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.14. Bağlanma ve bekleme sürelerinin iki katına çıkarıldığı 7.0 pmol/μL IFN-γ proteinin zenginleştirme sonrası enzimatik parçalanma ürünlerinin pozitif iyon modunda alınan MALDI-MS spektrumu. (B) Bağlanma sürelerinin başta belirlenen koşullara göre olduğunda IFN-γ proteinin zenginleştirme sonrası enzimatik parçalanma ürünlerinin pozitif iyon modunda alınan MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.10. Deney ortamına tampon çözeltinin etkisi

Deneysel işlemlerde 1M Tris-HCl tamponununundan 100 µL eklenerek çapraz bağlayıcı için uygun ortam sağlanmıştır. Çapraz bağlayıcının polimerik yüzeye kovalent olarak bağlanmasının ardından 100 mM lık Tris-HCl tamponu ile yıkamalar yapılmıştır. Yıkamaların ardından tampon çözelti olmadan aptamer yüzeye eklenmiş ve çapraz bağlayıcı ile kovalent bağlanması sağlanmıştır. Aptamerin bağlanmasının ardından tekrar 100 mM lık Tris-HCl tamponu ile yıkamalar yapılarak bağlanmayan aptamer uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından tampon çözelti olmadan protein çözeltisi eklenerek bağlanma sağlanmıştır. Protein bağlanmasının ardından yıkama işlemi yapılmıştır. Bütün deney boyunca tampon çözelti yıkama işlemi esnasında görev almakta olup deneyin tüm aşamaları tampon çözelti içerisinde gerçekleştirilmemiştir. Ancak tampon çözeltinin bağlanmaya etkisini incelemek için deney tamamen 100 mM lık Tris-HCl tamponu içerisinde tekrarlanmıştır. Ayrıca literatürde aptamerlerin uygun çalışma koşulları genellikle 7.0-7.5 pH aralığında olan tris-HCl tamponu ya da fosfat tamponu ile oluşturulmaktadır [124-127]. Fosfat tamponun zenginleştirmeye etkisini incelemek üzere deney fosfat tamponu ile tekrar edilmiştir. Elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.15.) tampon çözeltinin bütün deney işlemleri sırasında aptamerin ve proteinin bağlanmasında engelleyici rol oynadığı ve bu durumun da peptit sinyallerinin şiddetlerinde belirgin bir düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca literatürde kullanılan fosfat tamponun bu zenginleştirme işlemi için uygun olmadığı bu tez kapsamındaki şartlarda tespit edilmiştir. Bu üç durum arasında peptit sinyalleri sadece yıkamalar sırasında tampon çözelti kullanımında en iyi gözlemlenebilmiştir.



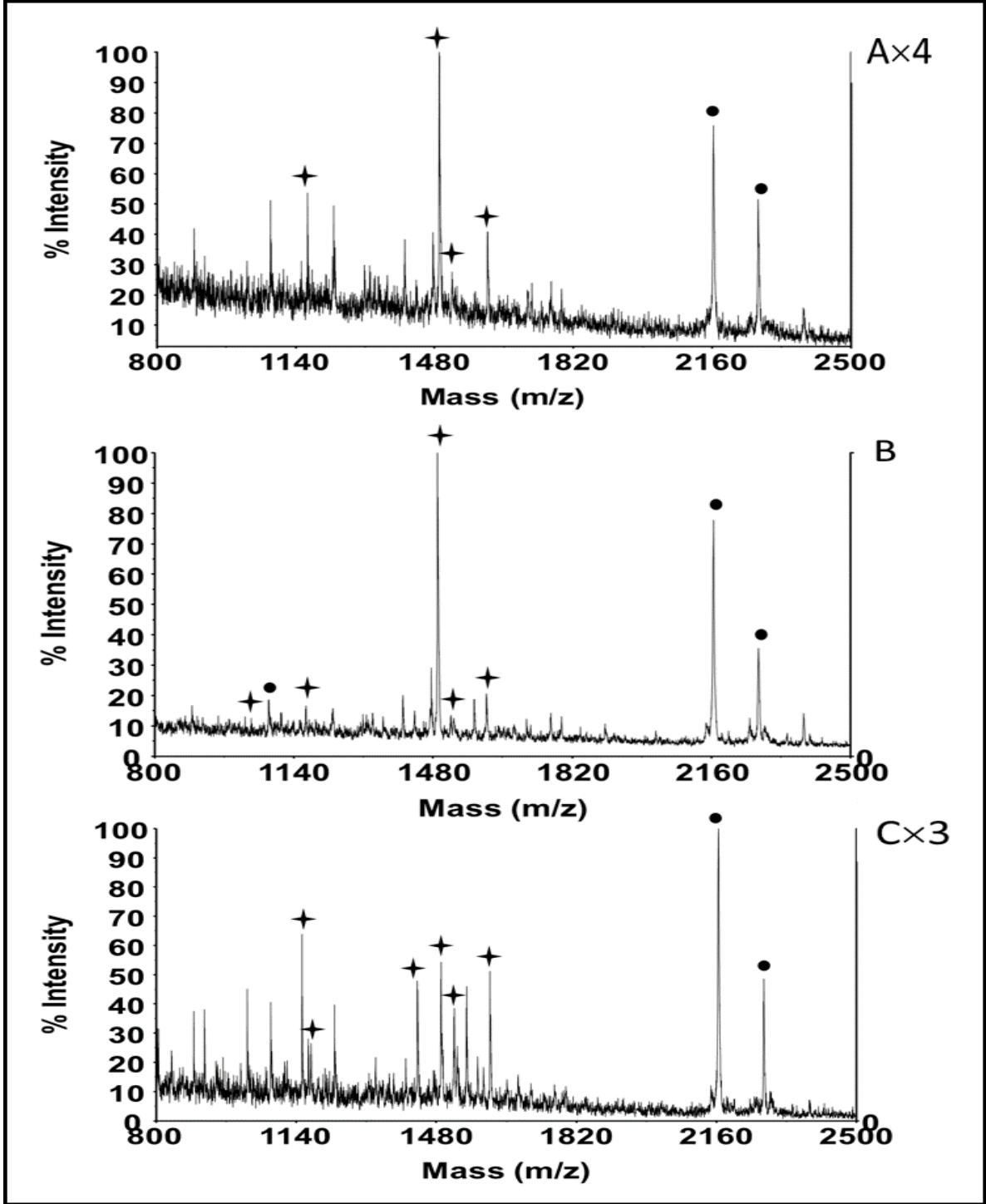
Şekil 4.15. (A) 100 mM lık tris-HCl tamponunun sadece yıkama esnasında kullanıldığı deney işlemlerine ait kütle spektrumu, (B) Deneyin tamamının 100 mM lık tris-HCl tamponun içinde gerçekleştirildiği deney işlemlerine ait ve (C) Deneyin tamamının 100 mM lık fosfat tamponunun içinde gerçekleştirildiği deney işlemlerine ait pozitif iyon modunda alınan MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.1.11. Polimerik katı yüzey kütlelerinin IFN- γ proteininin zenginleşmesine etkisi

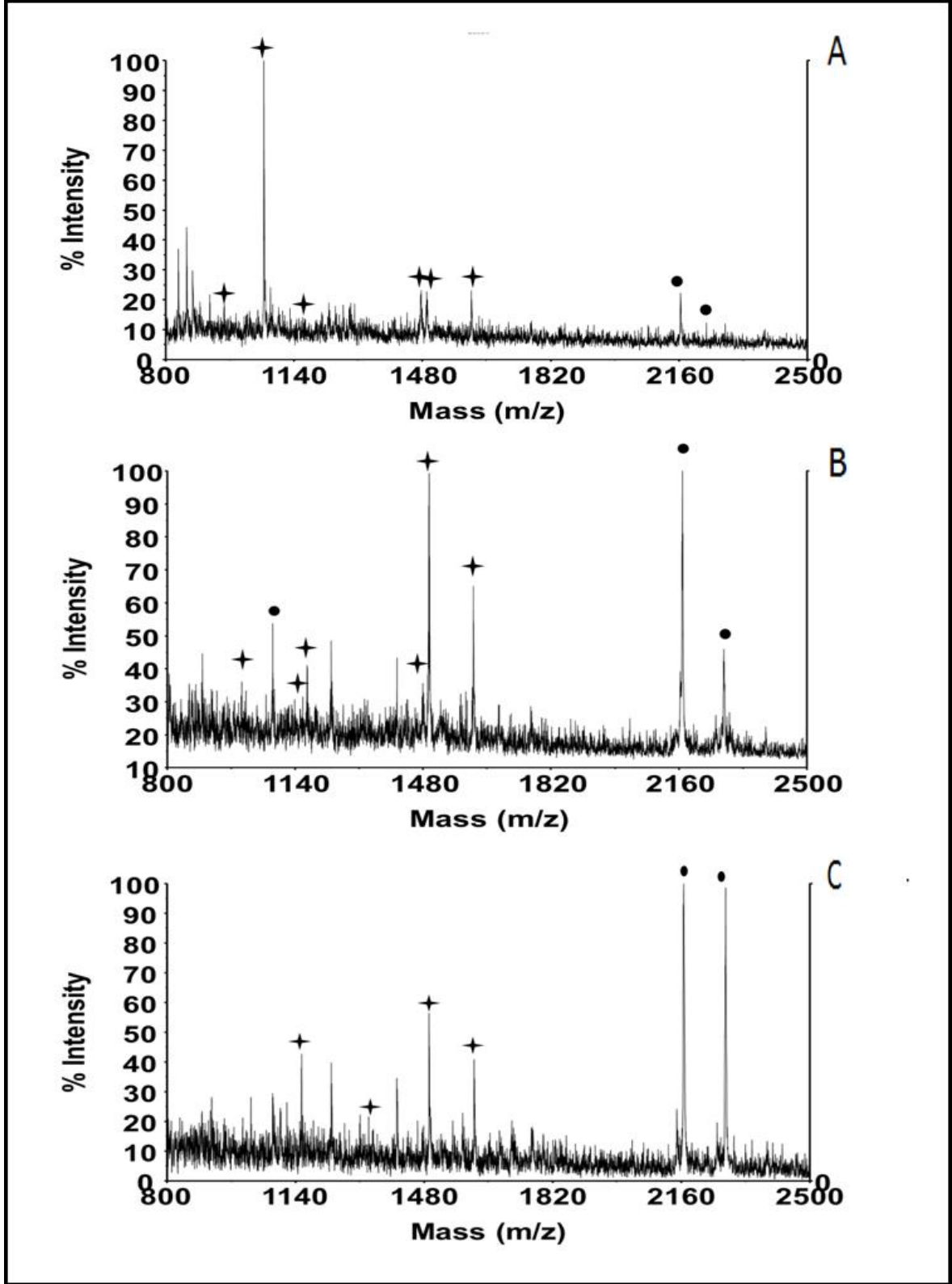
Çapraz bağlayıcının polimerik yüzey üzerine kovalent olarak bağlanması için gerekli olan $-NH_2$ gruplarının sayısını değiştirmek üzere 10 mg tartılan ve kullanılan polimerik kürelerin yerine kütleleri 5 mg ve 20 mg olacak şekilde deney tekrarlanmıştır (Şekil 4.16.). Çapraz bağlayıcının 200 μL , 7.0 pmol/ μL derişimine sahip aptamer ve protein çözeltilerinden 100 μL eklenerek yapılan zenginleştirme çalışmalarında yalnızca polimerik yüzey miktarı değiştirilerek elde edilen spektrumlar karşılaştırılmıştır ve analiz edildiğinde en uygun kütle 10 mg olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin yüzeye bağlanan aptamer ve proteinin uzaysal yönelmesi olduğu düşünülmektedir. Yirmi mg olarak tartılıp yapılan deney sonuçlarında elde edilen peptit sinyallerinin 10 mg olarak tartılıp yapılan deney sonuçlarında elde edilen peptit sinyallerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi 20 mg lık yüzeyde diğer yüzeylere oranla daha fazla $-NH_2$ grubu olduğu için çapraz bağlayıcı ve dolayısı ile devamında eklenen aptamer ve protein daha sık istiflenmeden ziyade daha seyrek bir istiflenme göstermektedir. Bu seyrek istiflenmenin bir sonucu olarak enzimatik parçalama işlemi sırasında tripsin ile bağlanan protein yapıları daha az karşılaştığı için tripsinin etki ettiği protein miktarı azalmaktadır. Bu durum da elde edilen peptit sinyallerinin şiddetinde düşüşe sebep olmaktadır (Şekil 4.16.A ve B karşılaştırıldığında). Ayrıca gerekli işlemlerin ardından başlatılan enzimatik parçalama işlemi sırasında eklenen DTT, iyodoasetamid ve tripsin yapıları bu proteinleri uzaysal olarak daha az karşılaştıkları için daha zor parçalamaktadır. Dolayısı ile 20 mg tartılarak başlatılan deney sonuçlarına ait kütle spektrumunda peptit sinyalleri çok iyi gözlenmemektedir. Beş mg ve 2 mg tartılarak başlatılan deneylerde ise 10 mg'lık yüzeylerden daha sık bir istiflenme olmasına rağmen bağlanma bölgesinin ve buna bağlı olarak protein miktarının azalması ile peptit sinyallerinde düşme gözlemlenmektedir. Aynı deney işlemi 0.7 pmol/ μL IFN- γ çözeltisi eklenerek tekrarlandığında benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 4.17.). 0.7 pmol/ μL IFN- γ çözeltisi eklenerek tekrarlanan deneylerde de en uygun miktarın 10 mg olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca 7.0 pmol/ μL derişiminde IFN- γ proteini zenginleştirmek için 2 mg tartılarak deney tekrarlandığı zaman 5 mg tartılarak yapılan deney sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiş olup yukarıda bahsedilen sık istiflenme sayesinde miktar olarak oldukça

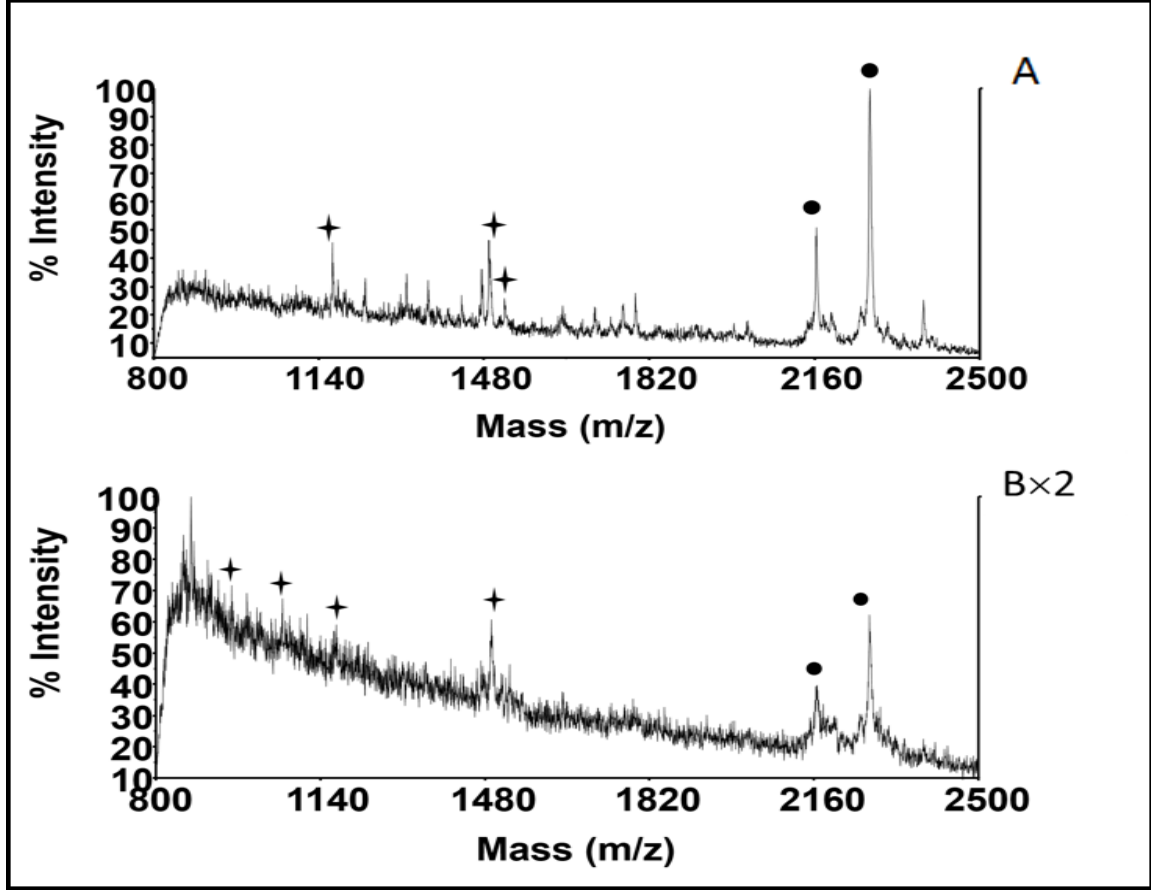
düşük olan 0.007 pmol/μL derişimindeki protein analizi yapılabilmştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.16. 7.0 pmol/μL derişiminde IFN-γ proteinin (A) 20 mg tartılan polimerik yüzey ile, (B) 10 mg tartılan polimerik yüzey ile ve (C) 5 mg tartılan polimerik yüzey ile zenginleştirmesi işlemi sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.17. 0.7 pmol/µL derişiminde IFN- γ proteinin (A) 20 mg tartılan polimerik yüzey ile, (B) 10 mg tartılan polimerik yüzey ile ve (C) 5 mg tartılan polimerik yüzey ile zenginleşirmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları

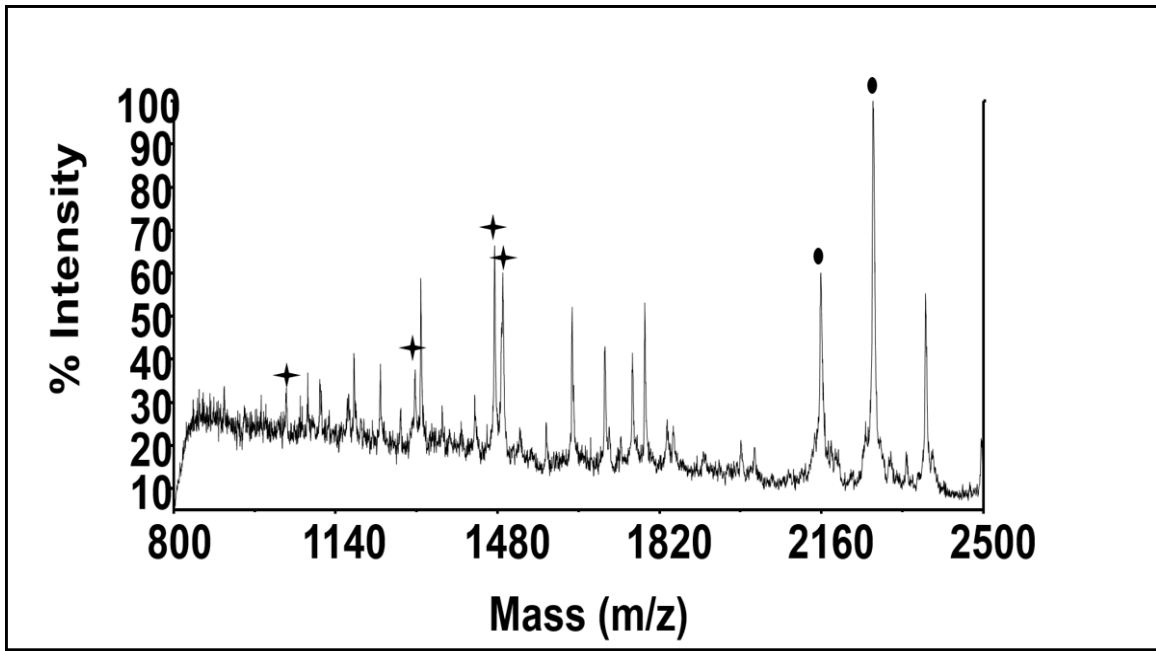


Şekil 4.18. (A) 2 mg tartılan polimerik yüzey ile yapılan 7.0 pmol/µL derişiminde ve (B) 2 mg tartılan polimerik yüzey ile yapılan 0.007 pmol/µL derişiminde IFN-γ proteini zenginleştirmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumları.

4.1.12. Protein ve onun özgün aptamerinin dış ortamda etkileştirilmesi sonrası yüzeye eklenmesi

Daha etkin zenginleştirme yapmak amacı ile aptamer-protein kompleksi dış ortamda oluşturulduktan sonra yüzeye ekleme çalışmaları yapılmıştır. 7.0 pmol/µL derişiminde aptamer çözeltisi ile 7.0 pmol/µL derişiminde IFN-γ protein çözeltisi mol oranı olarak 1:1 olacak şekilde karıştırılmıştır. Diğer taraftan ise çapraz bağlayıcının yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Polimerik yüzeye bağlanmayan fazla çapraz bağlayıcının yıkamalarla uzaklaşmasının ardından aptamer-protein kompleksi yüzeye eklenmiştir. Bağlanma süresinin ardından gerekli yıkamalar ve enzimatik parçalama sonucu oluşan peptit fragmentleri MALDI-MS ile analiz edilmiştir (Şekil 4.19.).

Analiz sonucu elde edilen kütle spektrumunda IFN- γ proteinine ait peptit fragmentleri görülmüş ancak 1490 ile 1850 Da kütle aralığındaki aptamer bağlanmayan çapraz bağlayıcıya ait sinyallerde ve gürültülerde yükselme gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin aptamer-protein kompleksi oluşurken iki molekülde de oluşan konformasyonel değişiklikler sebebiyle konformasyonu değişen aptamerin çapraz bağlayıcıya bağlanma olasılığının azalması olarak düşünülmektedir. Bu sebeple aptamer bağlanmayan çapraz bağlayıcıların sinyallerinde de yükselme gözlemlenmektedir.







Şekil 4.19. Aptamer ve IFN- γ proteinin kompleksi dışarıda oluşturulup yüzeye eklenmesinin ardından bağlanan proteinin enzimatik parçalamasından sonra pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.1.13. Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında IFN- γ proteinin zenginleştirilmesi

Aptamerler yapı itibari ile hedef moleküle özgü sentezlendiği için ortamdaki diğer yapılardan etkilenmeden hedef moleküle yüksek seçicilikle bağlanma sağlamaktadırlar [128]. IFN- γ proteinine özgü sentezlenen aptamer yapısının başka proteinler varlığında özgünlüğünün kontrolü amaçlı yapılan çalışmada bütün peptit sinyallerini gözlemleyebilmek için öncelikle 7.0 pmol/ μ L derişimlerindeki 25 μ L Lizozim, 25 μ L Sitokrom C ve 142 μ L IFN- γ çözeltileri karıştırılarak bir protein karışım çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu çözelti hiçbir zenginleştirmeye uğratılmadan enzimatik parçalama işlemine tabi tutulmuş ardından MALDI-MS analizi yapılmıştır (Şekil 4.20.A). Bu analiz sonucu elde edilen spektrumda çözelti içerisinde en yüksek derişime sahip protein IFN- γ olmasına rağmen lizozim ve Sitokrom C peptit fragment sinyallerinin baskınlığı gözlemlenmektedir. Yapılan bu deneyin ardından aptamerin özgünlüğünün kontrolü için benzer derişimlerdeki proteinler karıştırılarak (7 pmol/ μ L derişimlerindeki 50 μ L Lizozim, 50 μ L, Sitokrom C, 200 μ L IFN- γ karıştırılarak) deney tekrarlanmıştır (Şekil 4.20.B). Bu deneyden elde edilen analizler sonucunda IFN- γ aptamerinin IFN- γ proteinine yüksek özgünlükte bağlandığı gözlemlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumlarında IFN- γ proteinine ait peptit sinyallerinin diğer protein sinyallerine göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Ardından 7.0 pmol/ μ L derişimlerindeki 25 μ L Lizozim, 25 μ L Sitokrom C ve 50 μ L IFN- γ çözeltileri karıştırılarak IFN'nin derişimi daha düşük olan yeni bir protein karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Polimerik yüzeye bağlanan çapraz bağlayıcı ve aptamerin ardından yüzeye bu protein karışımı yüklenmiştir. Gerekli yıkamalar ve enzimatik parçalamanın ardından analiz edilmiştir (Şekil 4.20.C). Analiz sonucunda karışım çözeltisindeki derişimi 3.5 pmol/ μ L olan IFN- γ proteininin zenginleştiği gözlemlenmiştir. IFN- γ aptamerinin IFN- γ proteinine seçicilik gösterdiğini, IFN- γ peptitlerinin baskınlığından anlaşılmaktadır. Elde edilen kütle spektrumlarında IFN- γ 'ya ait peptit sinyallerinin lizozim ve sitokrom C protein peptitlerine göre daha şiddetli olduğu görülmektedir. Proteinlerin birincil yapılarının 20 çeşit aminoasitten oluştuğu göz önüne alınırsa; aptamer yapılarının aminoasitler aynı olsa bile dizilim farkından dolayı yüksek özgünlükte hedef yapıya bağlanma gösterdiği bu durum literatür ile uyusmaktadır [18][129].

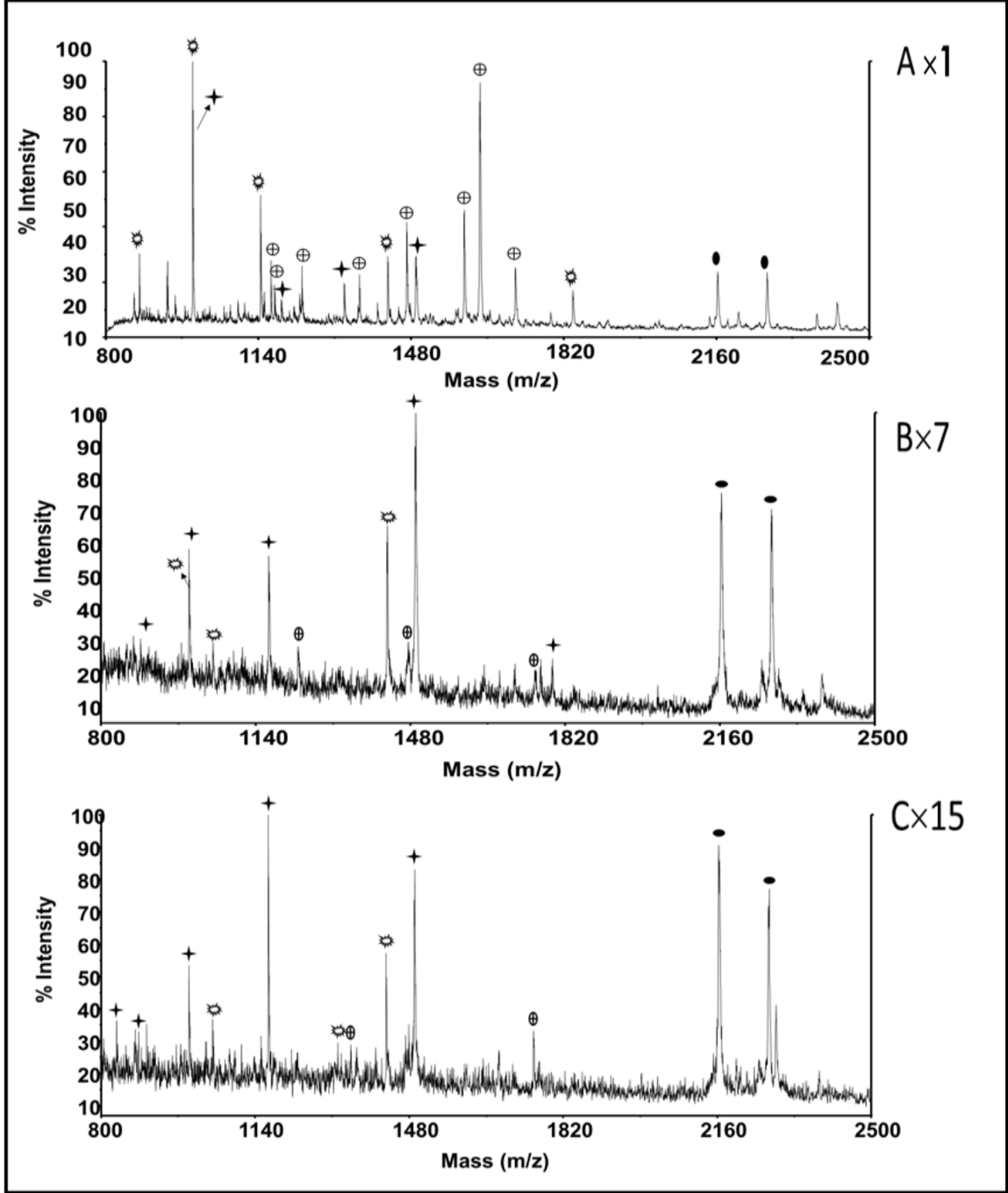
Proteinlerin hiçbir zenginleştirme olmadan enzimatik parçalamasına ait spektrum ile zenginleştirmelere ait spektrum karşılaştırıldığında (Şekil 4.20. A-Şekil 4.20. B-Şekil 4.20. C) spektrum şiddetleri genel olarak düşmesine rağmen aptamer ile zenginleştirme sonrası spektrumlarında IFN- γ peptit fragment sinyallerinin baskınlığı dikkat çekmektedir.

Yine aynı şekilde spektrum şiddetleri de göz önüne alınırsa; Lizozim ve Sitokrom C peptit sinyalleri ise aptamer ile zenginleştirme sonunda oldukça azalmış olup böylece aptamer-IFN- γ özgünlüğünün başka proteinlerin varlığında da oluştuğu gözlemlenmiştir.

Spektrumlarında Lizozime ait peptit sinyalleri “” işareti ile, sitokrom C proteinine ait peptit sinyalleri “” işareti ile, IFN- γ ait peptitler “” işareti ile, tripsine ait otokataliz ürünleri “” ile gösterilmiştir. Lizozim ve sitokrom C ye ait peptit fragmentleri Çizelge 4.2. de verilmiştir. IFN- γ peptit fragmentlerine ait sinyaller ve tripsinin otokataliz ürünlerine ait sinyaller Çizelge 4.1. de verilmiştir.

Lizozim	Sitokrom C
993.39	806.47
1045.54	1168.62
1110.48	1237.64
1428.65	1632.35
1675.80	1763.14
1753.83	

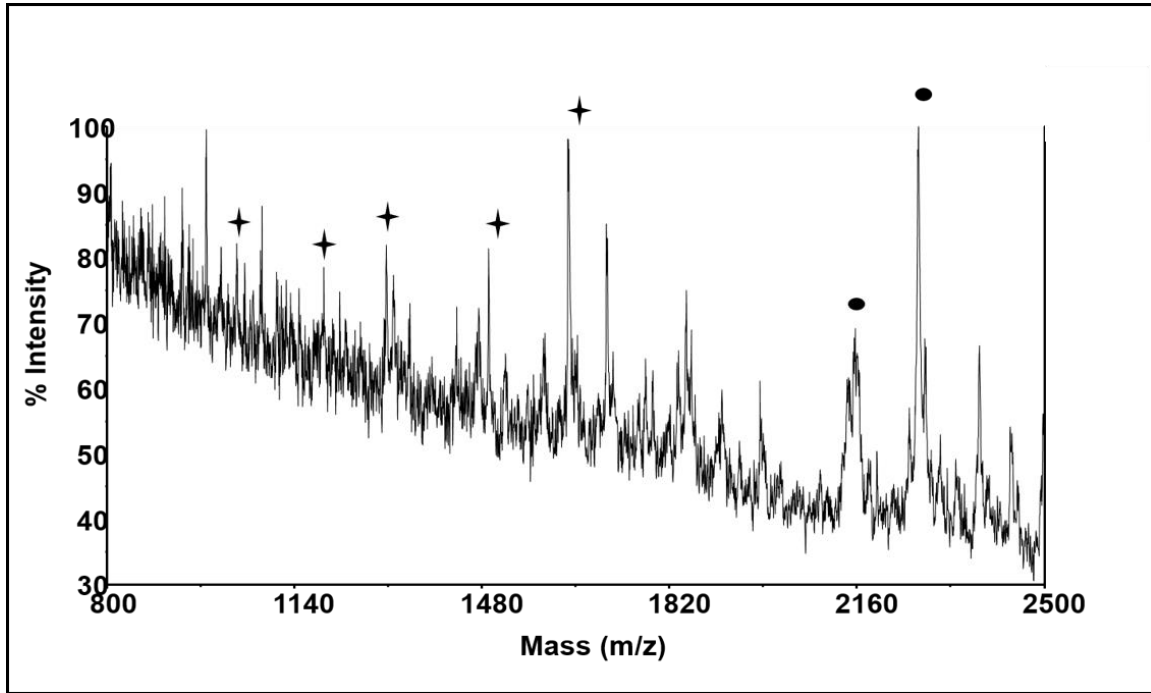
Çizelge 4.2. Tripsin ile parçalanmış Lizozim ve Sitokrom C proteinine ait peptit fragment kütleleri.



Şekil 4.20. (A) Aynı çözelti ortamında bulunan Lizozim, sitokrom C ve IFN- γ proteinlerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu, (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 5 pmol/ μ L derişimindeki IFN- γ proteinin zenginleştirilmesi sonucu pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Lizozim ve sitokrom C varlığında 3,5 pmol/ μ L derişimindeki IFN- γ proteinin zenginleştirilmesi sonucu pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu

4.1.14. Kan plazmasında IFN- γ zenginleştirilmesi

IFN- γ proteini herhangi bir tehlike varlığında belirli miktarda artarak immün sistemi uyarmaktadır [130]. Bu sebeple sağlıklı insan vücut sıvısında IFN- γ proteinin derişimi 8×10^{-7} pmol/ μ L olup tüberküloz gibi hastalıklarda anında akciğer plevial sıvısında bu miktar 3.65×10^{-4} pmol/ μ L e kadar yükselmektedir [131, 132]. Bu derişimler çalışma aralığımızın dışında olmasına rağmen kan plazması gibi birçok çeşitli örnek barındıran örnek içinde IFN- γ aptamerinin seçiciliğini incelemek için çapraz bağlayıcı ve aptamer bağlı yüzeye IFN- γ eklenmiş 100 μ L kan plazma örneği yüzeye eklenmiştir. Gerekli yıkama ve enzimatik parçalama sonucu elde edilen spektrumlarda IFN- γ proteinine ait peptit fragmentleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.21.). Bu spektrumlardan IFN- γ aptamerinin birçok protein, molekül ve çeşitli yapıların olduğu ortamdan IFN- γ proteinine yüksek seçicilikle ile bağladığı sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca bu spektrum uygulanan bu zenginleştirme yönteminin IFN- γ teşhisinde bir önçalışma niteliğinde olabileceğini göstermiştir.



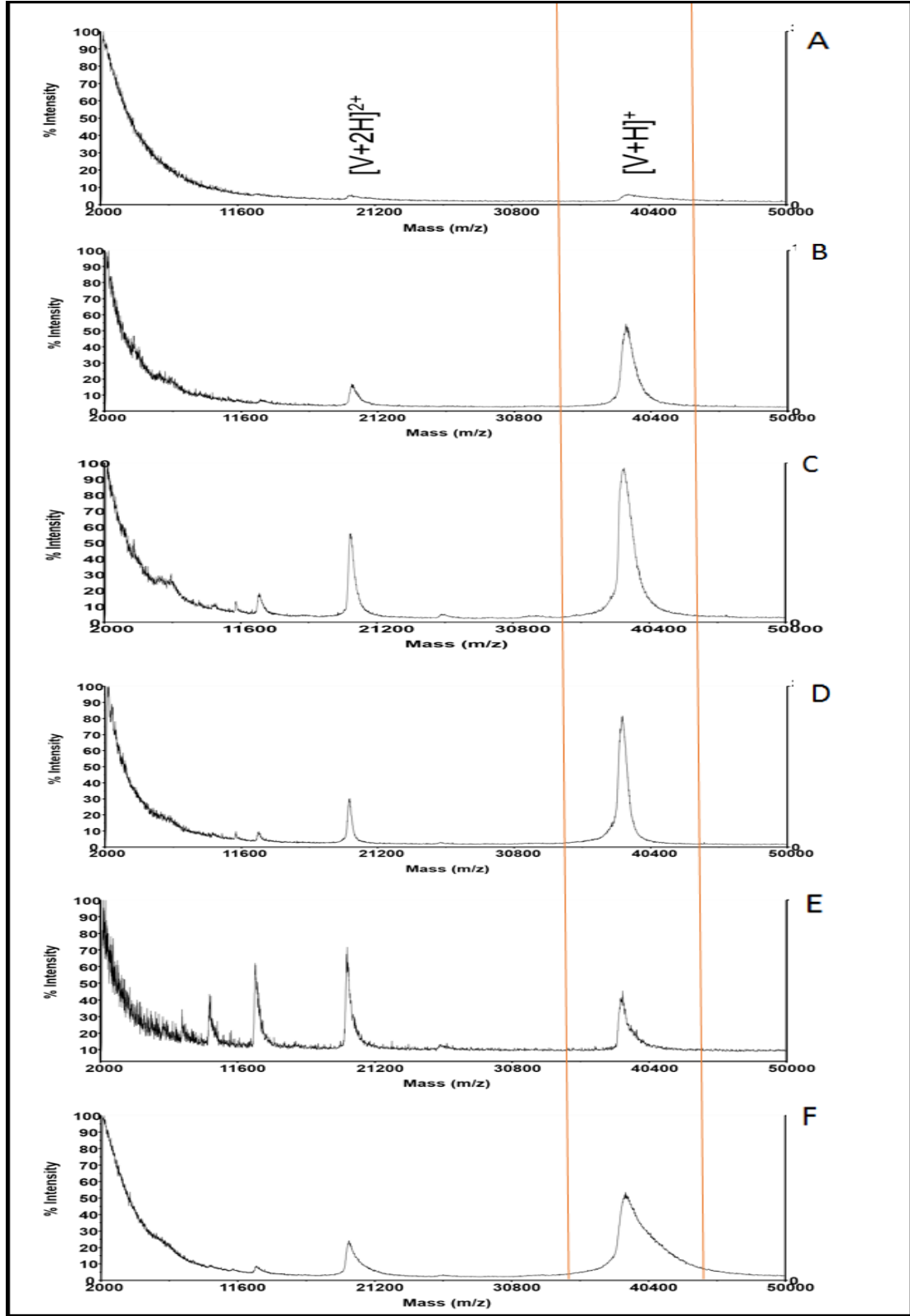
Şekil 4.21. Kan plazmasında IFN- γ proteini zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.2. VEGF proteinin analizleri

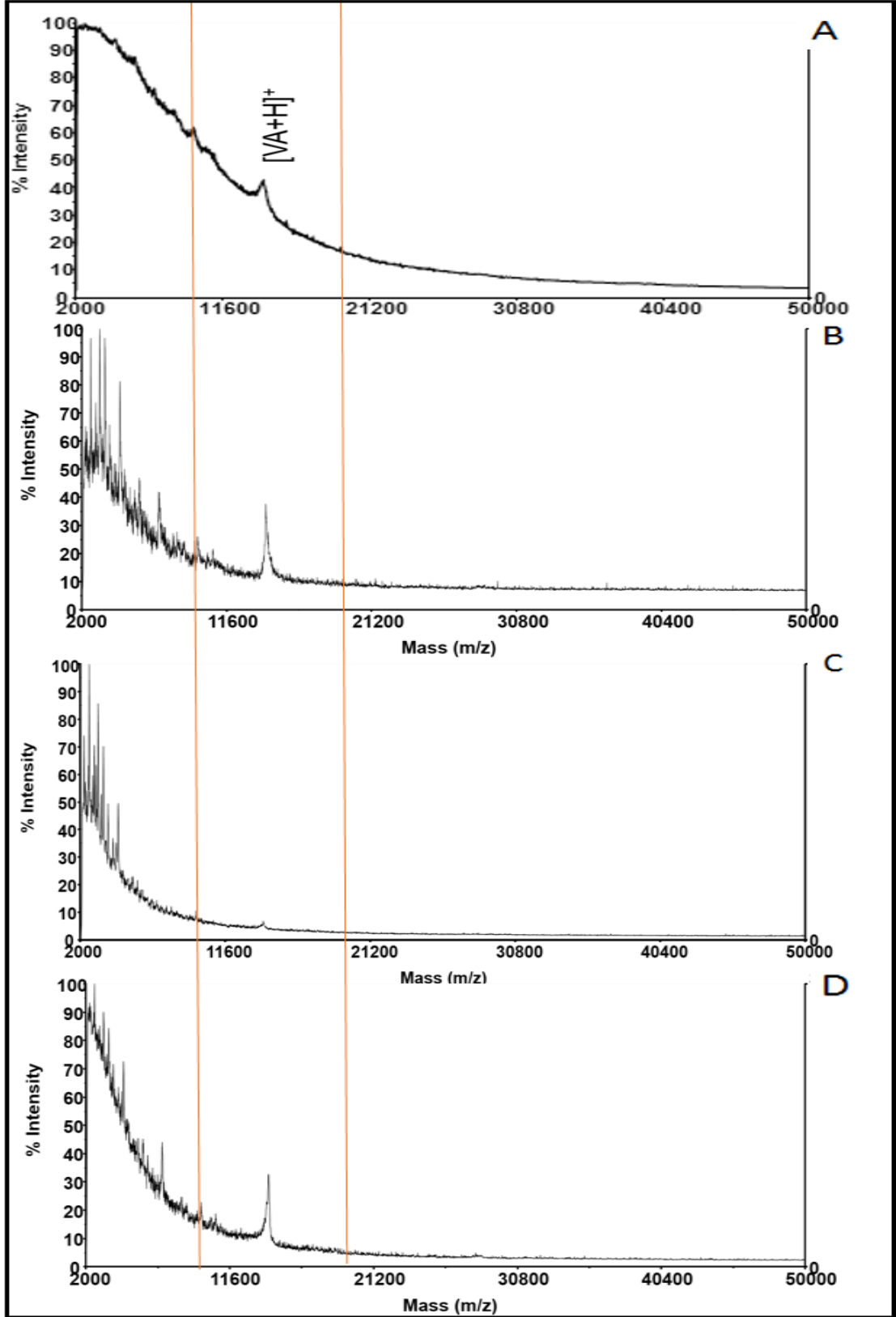
4.2.1. VEGF ve VEGF aptamerinin MALDI-MS ile analizi

VEGF proteini 3HPA, ATT, DHB, SA, THAP, DHB 2 matkileri ile ince tabaka örnek hazırlama metodu uygulanarak analiz edilmiştir (Şekil 4.22). Analizler sonunda 38,200 Da molekül ağırlığında olan VEGF proteinin '+1' yüklü moleküler iyon sinyali turuncu ile belirtilen sınırlar arasında beklenmektedir. VEGF proteininin 3HPA matriksi ile moleküler iyon sinyali gözlemlenememesine rağmen, ATT, SA, DHB, THAP, DHB 2 matriksleri ile 38.2 kDa civarında moleküler iyon sinyalinin ([V+H]⁺) görüldüğü uygun spektrumlar alınmıştır. Ayrıca bu matriksler sayesinde VEGF proteininin '+2' yüklü yani çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ([V+2H]²⁺) 19 kDa civarında gözlemlenmiştir. THAP matriksi sayesinde proteine ait '+3' yüklü ve '+4' yüklü moleküler iyon sinyalleri de gözlemlenebilmektedir.

VEGF proteinine özel olarak sentezlenen aptamer ise DHB, 3HPA, ATT, THAP matriksleri ile makriks oranı fazla olacak şekilde onspot (örnek üzerine matriks ekleme şeklinde), 1:5 ve 1:10 örnek hazırlama yöntemleri uygulanarak analiz edilmiştir (Şekil 4.23.). Analizler sonucunda molekül ağırlığı 13,977 Da olan aptamer turuncu ile belirtilen sınırlar arasında '+1' yüklü moleküler iyon sinyali ([VA+H]⁺) beklenmektedir. VEGF aptameri için ATT matriksi ile alınan kütle spektrumunda 14 kDa civarında gözlenen moleküler iyon sinyal şiddeti oldukça düşük olmasına rağmen, 3HPA ve THAP matriksleri ile aptamere ait moleküler iyon sinyali gözlemlenmiştir. THAP matriksi ile alınan kütle spektrumunda 7 kDa civarında moleküle ait çift protonlanmış iyon sinyali ([VA+2H]²⁺) belirgin bir şekilde gözlenirken, 3HPA matriksinde bu sinyalin belirginliği zayıflamıştır. Ayrıca aptamerin dimerine ait olan 27.9 kDa civarında bulunan sinyal ([2VA+H]⁺) THAP ve 3HPA matriksleri yardımıyla şiddeti düşük de olsa gözlenebilmiştir.



Şekil 4.22. VEGF proteinin çeşitli matrislerde pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) 3HPA matrisi ile, (B) ATT matrisi ile, (C) DHB matrisi ile, (D) SA matrisi ile, (E) THAP matrisi ile ve (F) DHB 2 matrisi ile VEGF proteinin MALDI-MS analizleri.

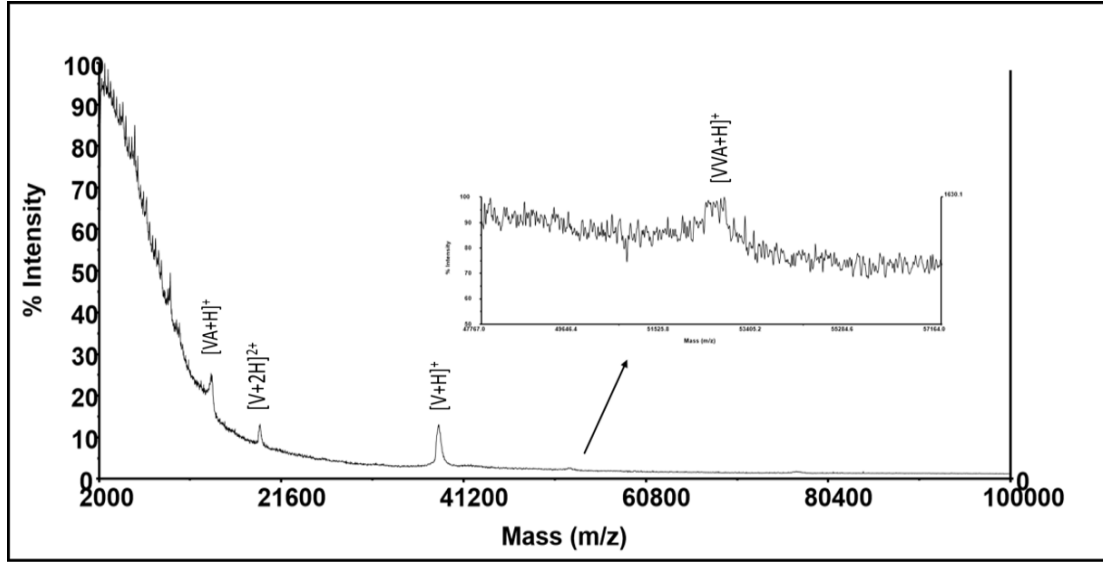


Şekil 4.23. VEGF aptamerinin çeşitli matrislerde pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları. (A) DHB matrisi ile, (B) 3HPA matrisi ile (C) ATT matrisi ile (D) THAP matrisi ile VEGF aptamerinin MALDI-TOF-MS analizleri.

4.2.2. VEGF-aptamer kompleksinin MALDI-MS ile analizi

Aptamer-VEGF kompleksini analiz etmek için 7.0 pmol/ μ L derişimindeki aptamer çözeltisinden 2 μ L eklenip 2 pmol/ μ L çözeltisindeki VEGF proteininden 7 μ L eklenmiştir. Kompleks oluşumu için 20 mM lık tris-HCl tamponu ortama eklenerek ortamın pH ının 7.4 civarında olması sağlanmıştır. Belirli bekleme süresinin ardından ATT matrisi ile yapılan analizlerde kompleks oluşumu çok belirgin gözlemlenememiştir (Şekil 4.24.). VEGF aptamer-protein komplekse ait sinyal 52.1 kDa civarında oldukça az şiddete olup VEGF proteinine ait 38,2kDa civarında bulunan sinyal ($[V+H]^+$) ve 13.9 kDa civarındaki aptamere ait sinyal ($[VA+H]^+$) oldukça şiddetlidir. Spektrumdaki sinyaller doğrultusunda, VEGF-aptamer kompleksi 52,177 Da civarındaki kompleks de bulunan ikincil etkileşimler lazerin enerjisi ile zayıflayarak gaz fazında aptamer ve proteine ayrılarak sinyal oluşturduğu düşünülmektedir.

IFN- γ -aptamer kompleksinin MALDI-TOF-MS analizi gibi, aptamer-VEGF kompleksinin bütün halinde analizinin düşük derişimlerde oldukça zor olduğunun anlaşılmasının ardından aptamere bağlanan proteinin enzimatik parçalama sonrası peptit fragmentlerinin analizine yönelinmiştir.



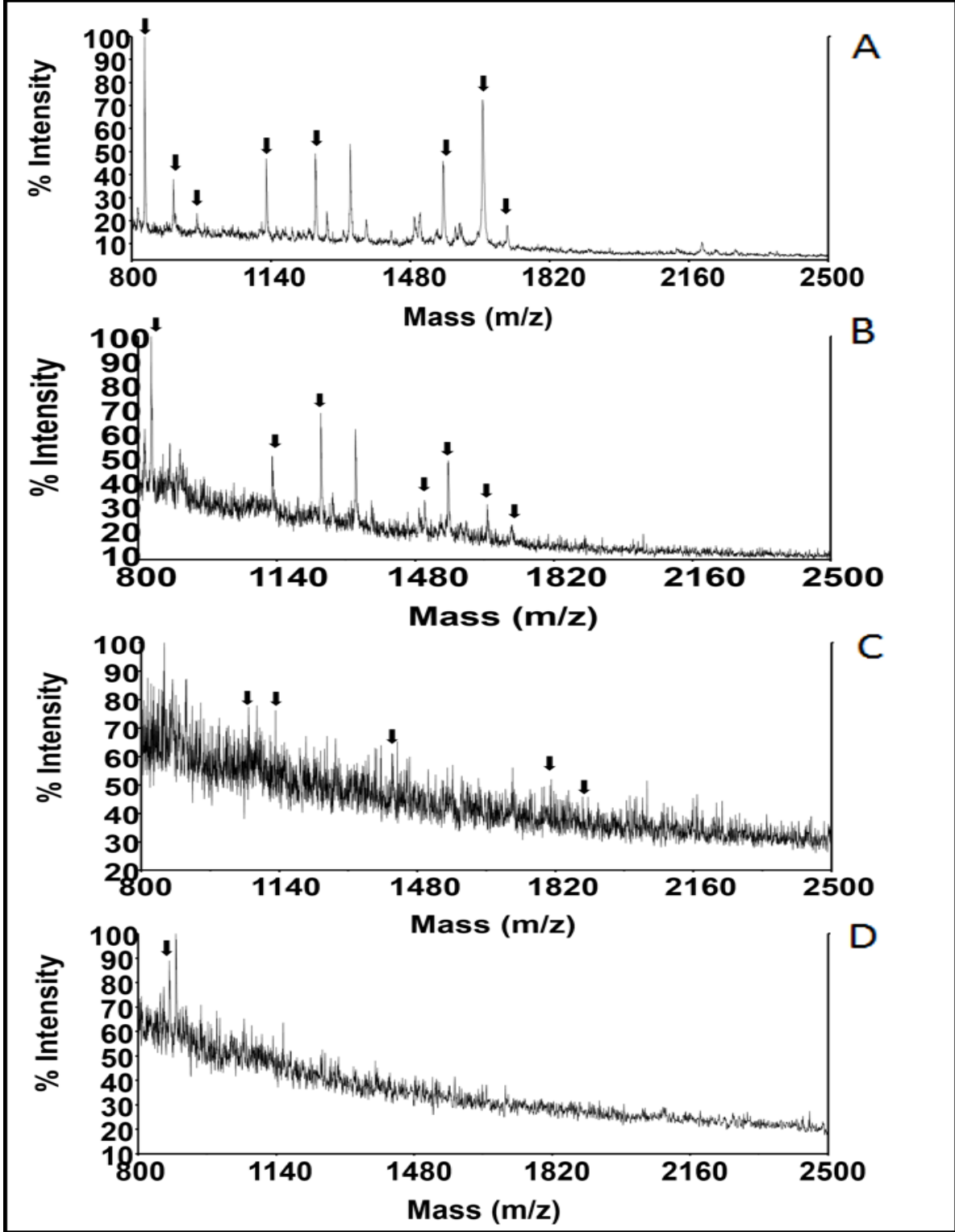
Şekil 4.24. VEGF-aptamer kompleksinin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS ile analizi.

4.2.3. Farklı derişimlerde VEGF protein çözeltilerinin enzimatik parçalanması ve aptamer bağılı yüzeylerde farklı derişimlerde VEGF proteini zenginleştirilmesi

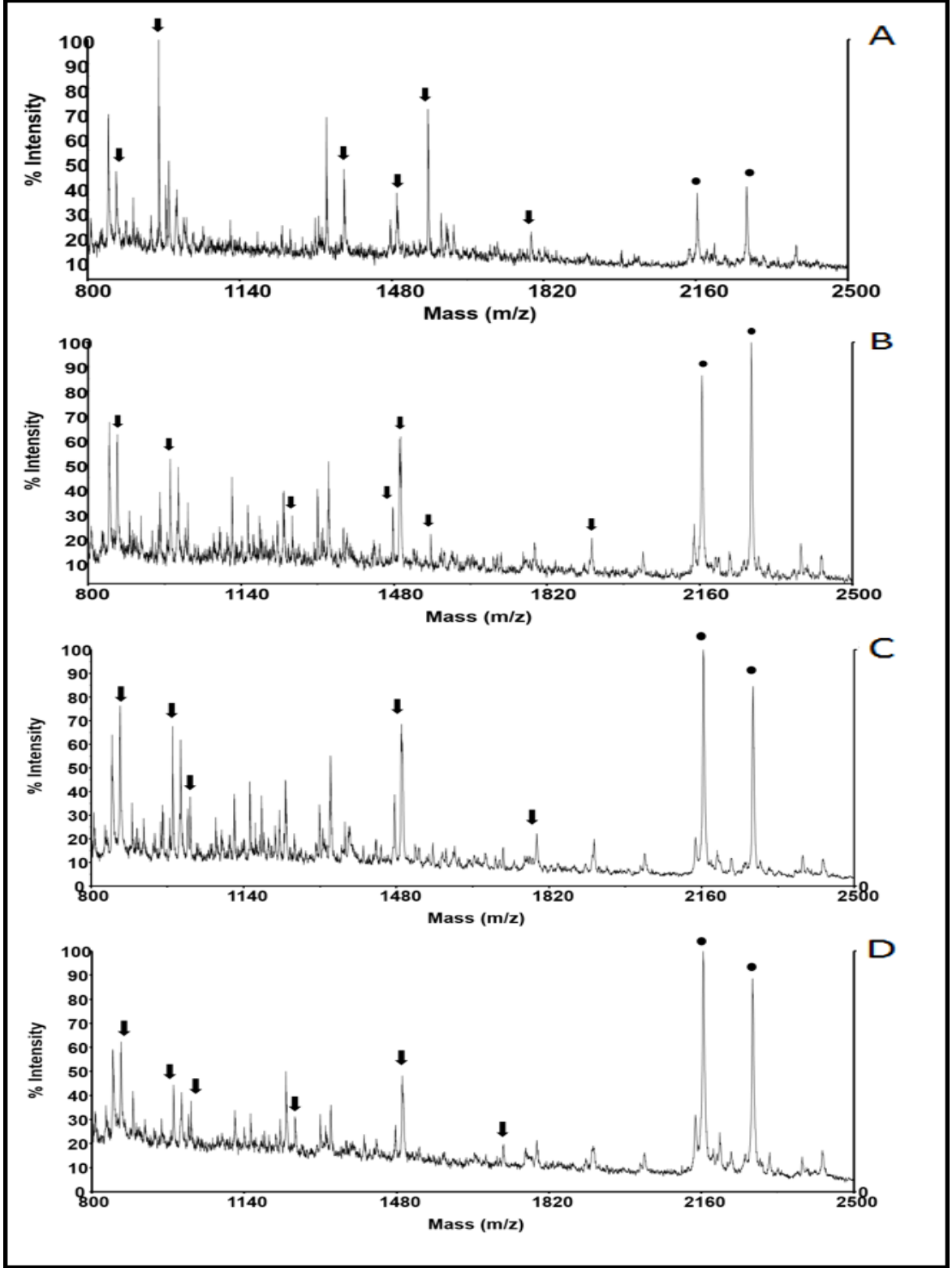
Proteinin hiçbir yüzeye bağlanmadan çözelti ortamında enzimatik parçalama sonucu oluşan peptit fragmentlerini gözlemlmek için hazırlanan 1.0 pmol/ μ L, 0.2 pmol/ μ L, 0.02 pmol/ μ L, 0.002 pmol/ μ L lik derişimlere sahip çözeltilerden 25 μ L lik hacimde örnekler alınıp enzimatik parçalamaya uğratılmıştır. Alınan çözeltiler, 3 μ L 9 mM DTT (20 mM amonyum bikarbonat çözeltisinde) çözeltisi ile 60°C de yarım saat su banyosunda bekletilmiştir. Yarım saatlik beklemenin ardından 3 μ L 20 mM iyodoasetamid çözeltisi (20 mM amonyum bikarbonat çözeltisinde) eklenerek yarım saat karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından proteini parçalamak için 1 mg/ μ L tripsin çözeltisinden 1 μ L eklenerek 37°C de su banyosunda enzimatik parçalanma başlatılmıştır. 2 saat sonunda enzimatik parçalanma işlemi 1 μ L derişik TFA ile durdurulmuştur. Enzimatik parçalanma sonunda elde edilen peptit fragmentleri MALDI-MS ile analiz edilmiştir (Şekil 4.25.). Ardından aynı miktarlarda çözeltiler kullanılarak yüzeyde zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Zenginleştirmenin ardından aynı enzimatik parçalama koşulları ile peptit fragmentleri elde edilip kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.26.). Analiz sonuçları karşılaştırıldığında 1.0 pmol/ μ L derişimine ait çözelti örneğinin kütle spektrumunda yeterince peptit sinyalleri gözlemlenirken derişim azaldıkça peptitlere ait sinyaller gözle görülemeyecek kadar zayıflamaktadırlar. 0.002 pmol/ μ L derişimine sahip çözelti örneğinin kütle spektrumunda peptit sinyalleri gözlemlenemeyecek kadar küçüktür (Şekil 4.25.D). Ancak yüzeyde zenginleştirme sonucu elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde 1.0 pmol/ μ L derişimine sahip örnekte peptit fragmentlerinin gözlemlenmesinin yanı sıra düşük derişimlerde de peptit fragmentleri yüksek sinyallerde gözlemlenebilmiştir (Şekil 4.26.).

0.002 pmol/ μ L gibi çok düşük derişimlere sahip örneklerin çözelti formuna ait ve zenginleştirme sonrasına ait kütle spektrumları karşılaştırıldığında zenginleştirmenin peptit sinyalleri gözlemlene konusunda olumlu sonuçlar oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.27.).

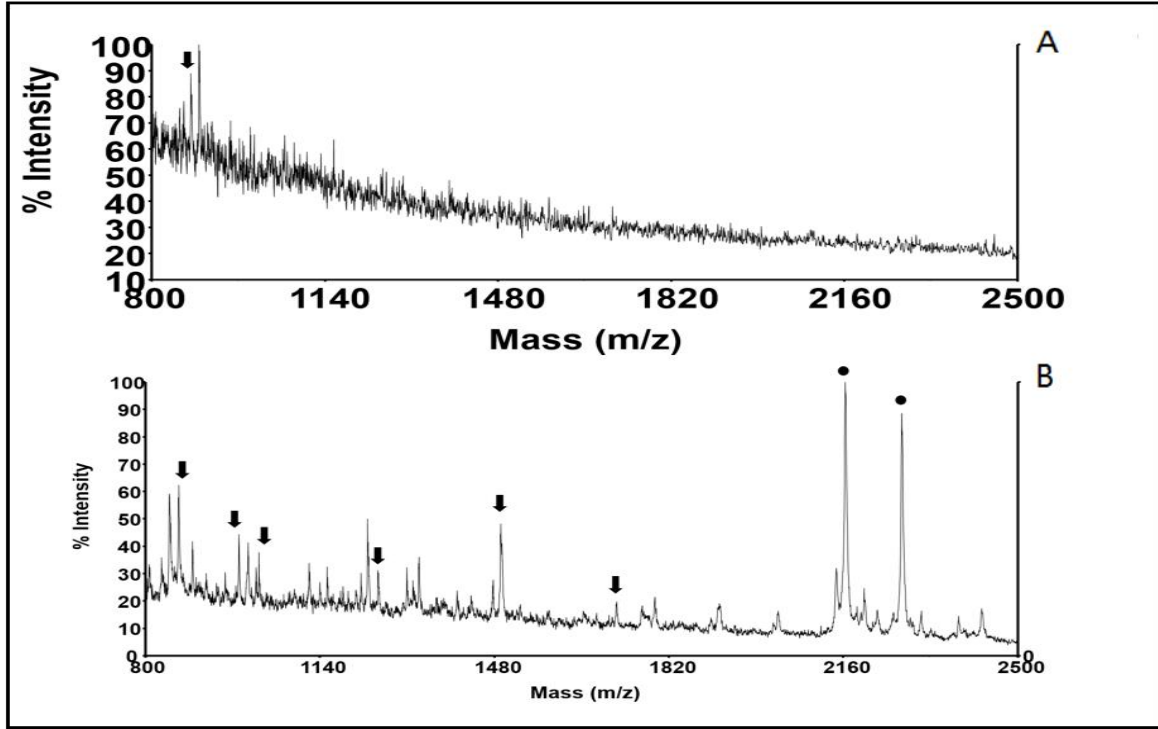
VEGF proteinine ait peptitler spektrumlarda “↓” ile belirtilmiş olup bu fragmentlerin kütleleri Çizelge 4.3. de verilmiştir.



Şekil 4.25. (A) 1.0 pmol/μL, (B) 0.2 pmol/μL, (C) 0.02 pmol/μL ve (D) 0.002 pmol/μL derişimlerine sahip olan VEGF protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 4.26. Aptamer bağlı yüzeyde, (A) 1.0 pmol/µL, (B) 0.2 pmol/µL, (C) 0.02 pmol/µL ve (D) 0.002 pmol/µL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen peptit fragmentlerine ait pozitif mod MALDI-TOF-MS spektrumları.



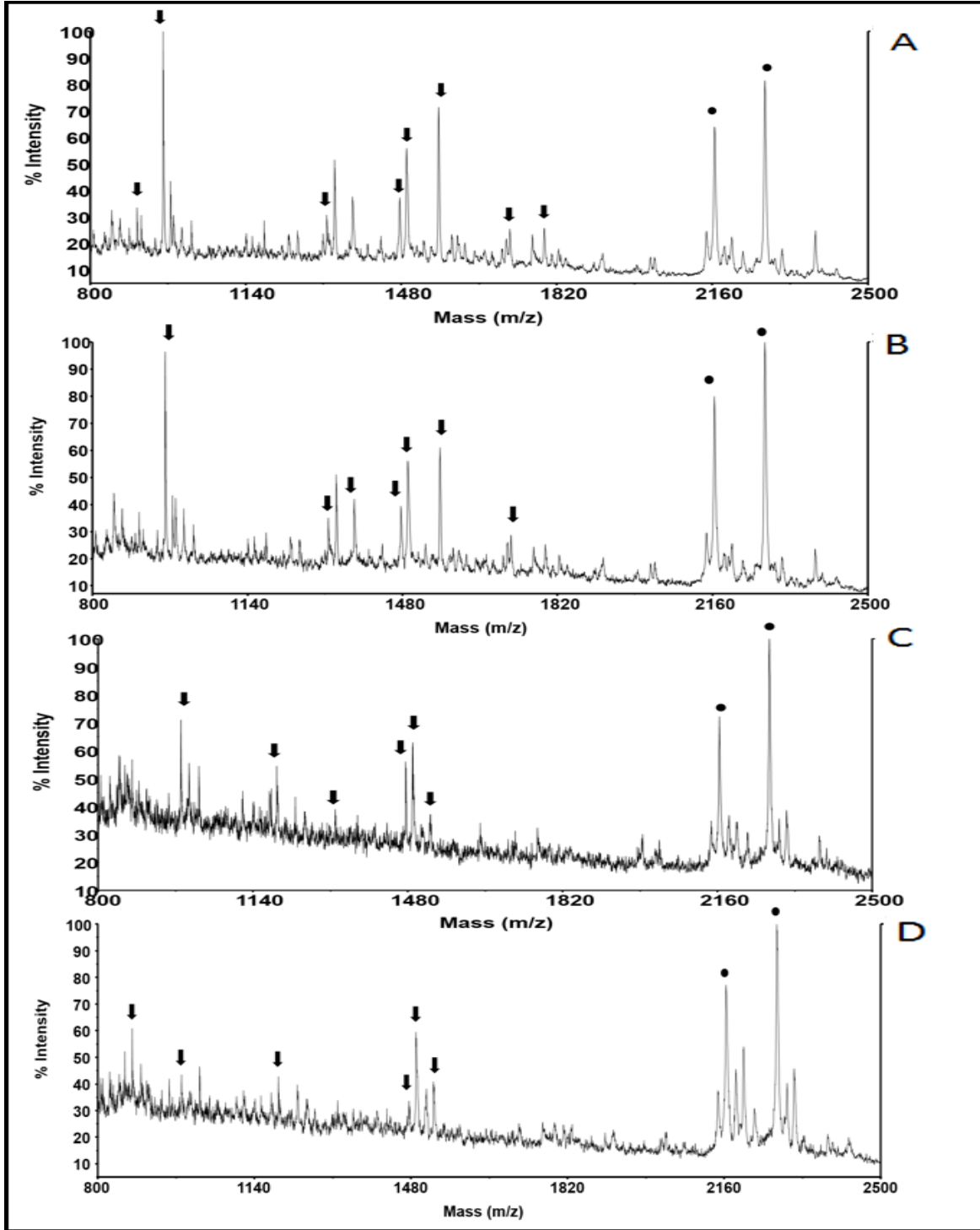
Şekil 4.27. (A) 0.002 pmol/μL derişimlerine sahip olan VEGF protein çözeltilerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) 0.002 pmol/μL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen peptitlerin pozitif iyon modu MALDI-TOF-MS spektrumu.

VEGF				
863.42	901.47	958.44	979.43	1315.67
1373.65	1477.69	1489.70	1529.66	1558.81
1588.79	1719.87	1794.79	1912.18	

Çizelge 4.3. Tripsin ile parçalanmış VEGF proteinine ait peptit fragmentlerinin kütleleri.

4.2.4. Zenginleştirme sonrası elde edilen farklı derişimlerde VEGF peptitlerine ziptip işleminin uygulanması




VEGF çözeltilisinin ve zenginleştirme çözeltilisinin miktar olarak azlığından dolayı ziptip işlemi ile elde edilen peptit sinyallerinin arttırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yüzeyde aptamer sayesinde zenginleşen proteinlere ait peptitlere ziptip protokolü uygulanmıştır. Ziptip yöntemi sayesinde ortamdaki tuzların uzaklaşması ve peptitlerin daha derişik olması sağlanmıştır. Yüzeyde zenginleştirme yapılan farklı derişimlerdeki VEGF çözeltilerine enzimatik parçalanma sonrası ziptip uygulanmıştır (Şekil 4.28.). Ziptip uygulanmayan ve ziptip uygulanmış zenginleştirilmiş farklı derişimlerdeki VEGF proteinine ait peptit fragmentlerinin kütle spektrumları karşılaştırıldığında peptit sinyallerinde beklenildiği üzere çok fazla bir artış gözlemlenememiştir (Şekil 4.26. ile Şekil 4.28. karşılaştırıldığında).

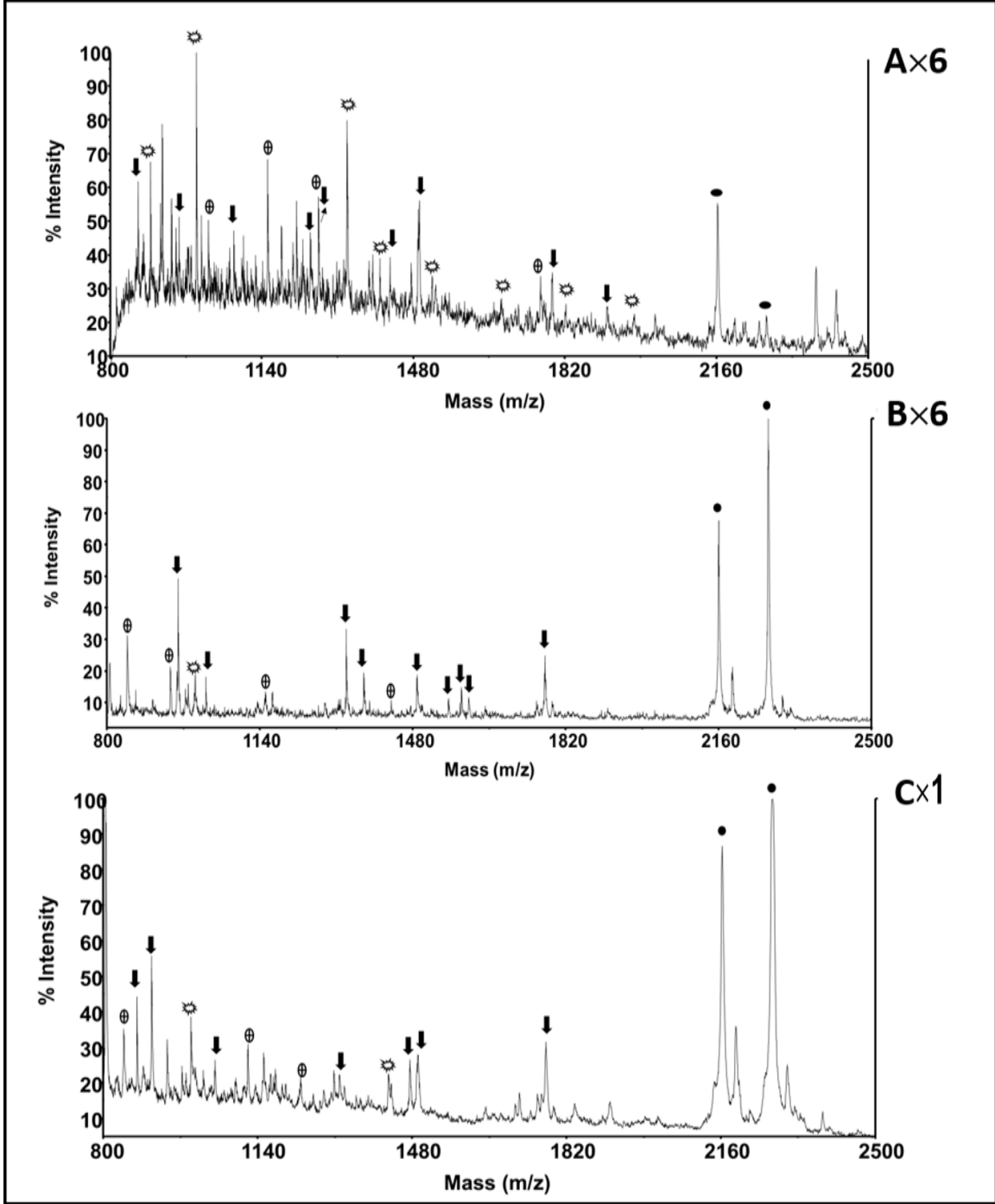


Şekil 4.28. Aptamer bağlı yüzeyde (A) 1.0 pmol/μL, (B) 0.2 pmol/μL, (C) 0.02 pmol/μL ve (D) 0.002 pmol/μL derişimlerine sahip olan VEGF proteinlerinin zenginleştirilmesinin ardından ziptip uygulanması ile elde edilen peptitlerin pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.2.5. Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında VEGF proteinin zenginleştirilmesi



VEGF proteinine özgü sentezlenen aptamer yapısının başka proteinler varlığında özgünlüğünün kontrolü amaçlı yapılan çalışmada 1.0 pmol/ μ L derişimlerdeki 5 μ L Lizozim, 5 μ L Sitokrom C, ve 2 pmol/ μ L derişimindeki VEGF çözeltilisinden 10 μ L alınarak bir protein karışım çözeltilisi hazırlanmıştır. Bu protein çözeltilisi hiçbir zenginleştirme yapmadan doğrudan enzimatik parçalamaya uğratılmıştır (Şekil 4.29.A). Elde edilen kütle spektrumuna bakıldığında 3 farklı proteinden gelen peptit fragmentlerinin yoğunluğu ve sitokrom C ve lizozim peptit fragmentlerinin baskınlığı göze çarpmaktadır. Ayrı bir deney olarak, protein miktarlarına bağlı olarak polimerik yüzey, bağlanan çapraz bağlayıcı ve aptamer miktarları yarıya indirilerek yüzeye yüklenmiştir. Gerekli yıkamalar ve bekleme sürelerinin ardından derişimleri ilk protein karışım çözeltilisi ile aynı olan eş protein karışımı yüzeye yüklenmiştir. VEGF aptameri ile proteini için uygun etkişim sağlamak için 2 saat kadar bekletildikten sonra enzimatik parçalama yapıp analiz edilmiştir (Şekil 4.29.B). Analiz sonucunda karışım çözeltilisindeki derişimi 1.0 pmol/ μ L olan VEGF proteini zenginleştiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.29.A ve Şekil 4.29.B karşılaştırıldığında VEGF sinyallerinin dikkate değer şekilde şiddetlendiği ve lizozim ve sitokrom C proteinlerine ait peptit fragmentlerinin sinyal şiddetlerinin düşmesi VEGF aptamerinin VEGF proteinine seçicilik gösterdiğini işaret etmektedir. Yapılan bu deneyde VEGF' e özgü sentezlenen aptamerin diğer proteinler varlığında bile VEGF proteinine bağlandığı söylenebilmektedir. Daha seyreltik ortamda aptamerin özgünlüğünün kontrolü için derişimler azaltılarak (1 pmol/ μ L derişimlerdeki 10 μ L Lizozim, 10 μ L sitokrom C ve 0.02 pmol/ μ L derişimindeki VEGF çözeltilisinden 2 μ L karıştırılarak) deney tekrarlanmıştır (Şekil 4.29.C). Bu deneyden elde edilen analizler sonucunda da VEGF aptamerinin VEGF proteinine yüksek özgünlükte bağlandığı gözlemlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumlarında ortamdaki VEGF protein derişimi düşük olmasına rağmen VEGF'e ait peptit sinyallerinin diğer protein sinyallerine göre oldukça şiddetli olduğu görülmektedir.

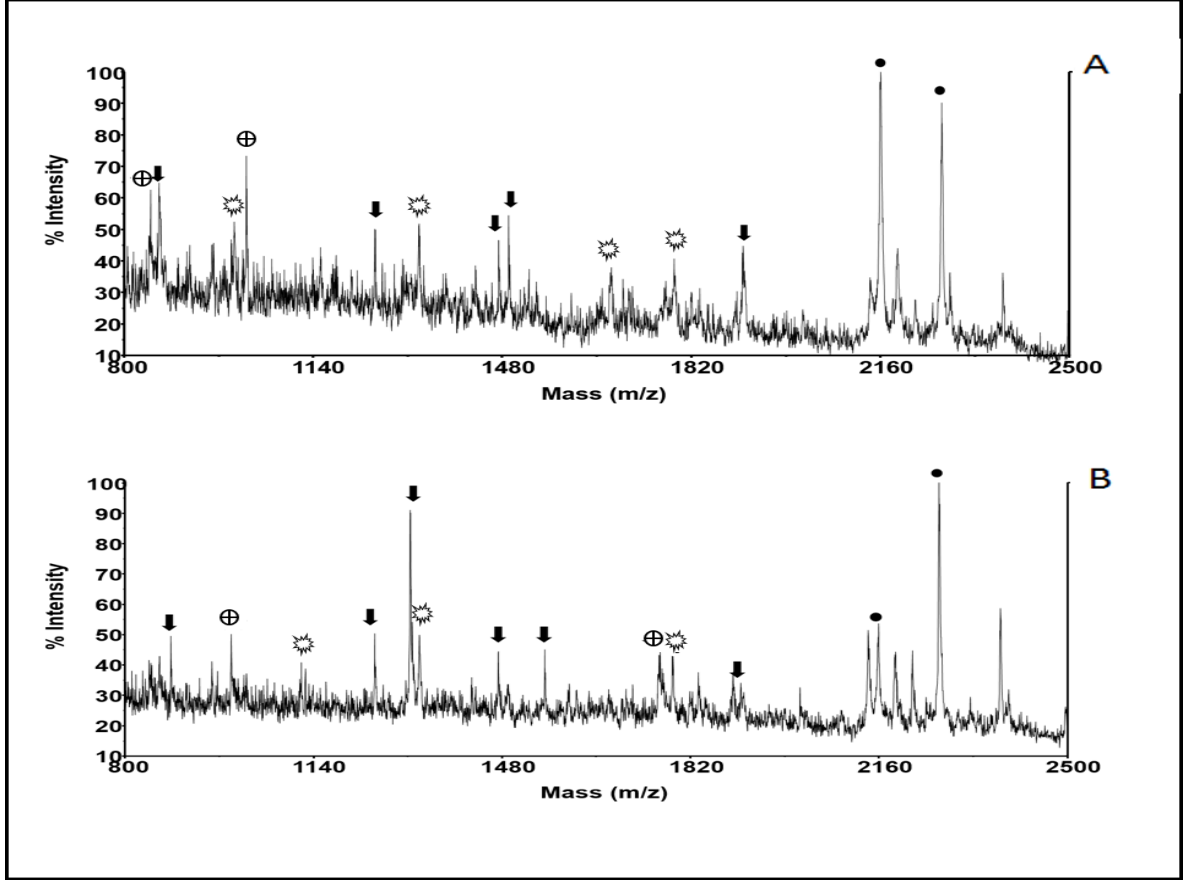
Spektrumlarda Lizozime ait peptit sinyalleri “” işareti ile sitokrom C proteinine ait peptit sinyalleri “ \oplus ” işareti ile, VEGF' e ait peptit sinyalleri “” işareti ile, tripsine ait otokataliz ürünleri “” ile gösterilmiştir. Lizozim ve sitokrom C ye ait peptit fragmentleri Çizelge 4.2. de, tripsine ait otokataliz ürünleri Çizelge 4.1 de, VEGF peptit fragmentlerine ait sinyaller Çizelge 4.3. de verilmiştir.



Şekil 4.29. (A) Aynı çözelti ortamında bulunan Lizozim, sitokrom C ve VEGF proteinlerinin hiçbir zenginleştirme yapılmadan enzimatik parçalamaya uğratılarak oluşan peptitlerin pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları, (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 1.0 pmol/ μ L derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu ve (C) Lizozim ve sitokrom C proteinleri varlığında 0.002 pmol/ μ L derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda elde edilmiş MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.2.6. Lizozim ve Sitokrom C proteinleri varlığında zenginleştirilen VEGF proteininin peptitlerine ziptip işleminin uygulanması

Yüzeye kovalent bağ ile bağlanan VEGF aptameri sayesinde zenginleşen VEGF proteinine ait peptitlere ziptip protokolü uygulanmıştır. Ziptip yöntemi sayesinde ortamdaki tuzların uzaklaşması ve peptitlerin daha derişik olması amaçlanmıştır. Karışım ortamındaki derişimi 1.0 pmol/μL ve 0.002 pmol/μL olan VEGF proteinlerine zenginleştirme işlemleri uygulandıktan sonra ziptip uygulanmıştır. Ziptip işlemleri sonrası yapılan analizler sonucu elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde bu işlemler sayesinde VEGF ait peptit sinyallerinde artış gözlemlenirken beraber Lizozim ve sitokrom C proteinlerine ait peptitlerin sinyallerinde de artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.29. ve Şekil 4.30. karşılaştırıldığında). Spektrumlarda Lizozime ait peptit sinyalleri “” işareti ile sitokrom C proteinine ait peptit sinyalleri “ \oplus ” işareti ile, VEGF'e ait peptit sinyalleri “ \ominus ” işareti ile, tripsine ait otokataliz ürünleri “” ile gösterilmiştir. Lizozim ve sitokrom C ya ait peptit fragmentleri Çizelge 4.2. de, tripsine ait otokataliz ürünleri Çizelge 4.1 de, VEGF peptit fragmentlerine ait sinyaller Çizelge 4.3. de verilmiştir.



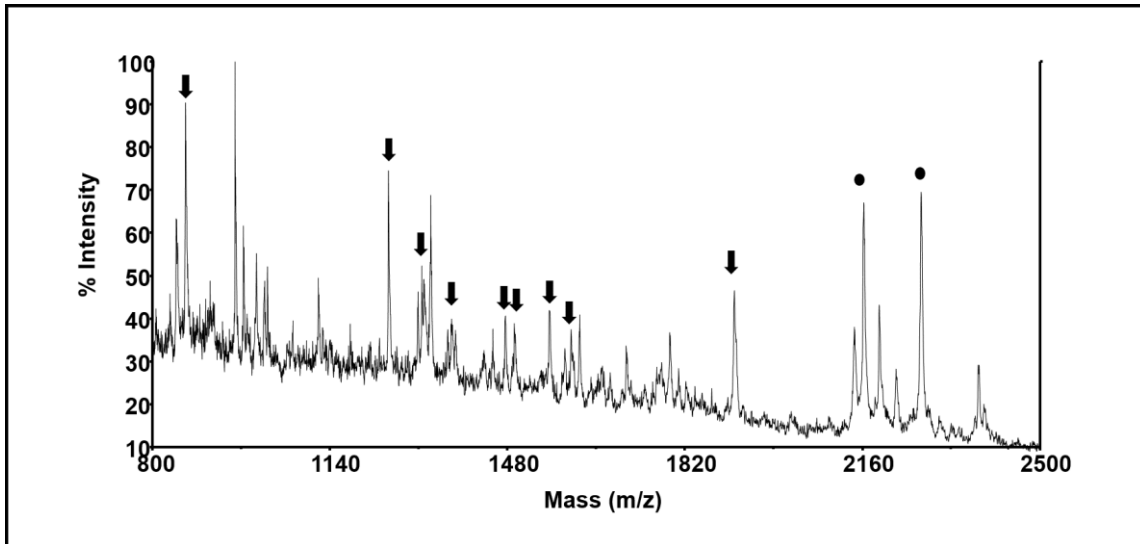
Şekil 4.30. (A) Lizozim ve sitokrom C varlığında 0.002 pmol/μL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi ve ziptip uygulanmasının ardından elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu ve (B) Lizozim ve sitokrom C varlığında 1.0 pmol/μL derişimindeki VEGF proteinin zenginleştirilmesi ve ziptip uygulanmasının ardından elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS spektrumu.

4.2.7. Kan plazmasından VEGF zenginleştirilmesi

VEGF başta kan damarları olmak üzere vasküler sistemin büyümesinde aktif rol alan önemli bir proteindir. Son dönemde yapılan çeşitli araştırmalarda kanserli bölgede VEGF protein miktarının aşırı miktarda artış gösterdiği bulunmuştur [120]. Aptamer ve VEGF proteini ile ilgili en önemli çalışma macugen olmuştur. 2004 yılının aralık ayında Ulusal Gıda Denetleme Örgütü penagtanip sodyumunu (macugen), anti-vasküler büyüme faktörü RNA aptameri, yaşa bağlı macugen dejenerasyonlarının (age related degeneration-AMD) bütün tipleri için tedavi edici ajan olarak kabul etmiştir. Penagtanip aptamerlerin insanların hastalıklarını tedavi amaçlı kullanılabileceğini göstermek açısından dönüm noktası olmuştur. Macugen vücut içerisinde bulunan VEGF yapısına

bağlanarak proteinin fonksiyonunu yerine getirmesini engellemektedir. Bu sayede fonksiyonunu yerine getiremeyen protein hücrelerin çoğalmasını sağlayamayarak aşırı büyümenin önüne geçilmiştir.

Sağlıklı insan serumunda VEGF proteinin derişimi 2.44×10^{-6} pmol/ μ L olup karaciğer hastalarının serumunda bu miktar 2.90×10^{-6} pmol/ μ L e yükselmektedir [133]. Akciğer kanseri hastalarda bu değer 1.38×10^{-5} pmol/ μ L ölçülmüştür [134]. En yüksek seviye akciğer hastalarında bulunmasına rağmen, solunum yollarını sürekli daraltan akciğer hastalığı (COPD) ile akciğer kanserinin birbirini tetiklediğini düşünen bir grup araştırmacının yaptığı çalışmada VEGF seviyesi 2.65×10^{-4} pmol/ μ L e kadar yükselmektedir [135]. Bu derişimler çalışma aralığımızın dışında olmasına rağmen kan plazması gibi birçok çeşitli örnek barındıran örnek içinde VEGF aptamerinin seçiciliğini incelemek için çapraz bağlayıcı ve aptamer bağlı yüzeye derişimi 1.0 pmol/ μ L olacak VEGF eklenmiş 100 μ L kan plazma örneği yüzeye eklenmiştir. Gerekli yıkama ve enzimatik parçalama sonucu elde edilen sepktrumlarda VEGF proteinine ait peptit fragmentleri gözlemlenmektedir (Şekil 4.31.). Bu sepktrumlardan VEGF aptamerinin büyük küçük birçok protein, vitamin, moleköl ve çeşitli yapıların olduğu ortamdaki VEGF proteinin yüksek seçicilik ile bağladığı ve uygulanan zenginleştirme yönteminin VEGF proteinin insan kan plazmasında teşhisi alanında bir önçalışma niteliğinde olabileceği düşünölmektedir.



Şekil 4.31. Kan plazmasında 1.0 pmol/ μ L derişiminde VEGF proteini zenginleştirilmesi sonucu elde edilen pozitif iyon modunda alınmış MALDI-TOF-MS sepktrumu.

5. SONUÇLAR

- IFN- γ protein çözeltilisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiş olup gerek proteinin '+1' yüklü sinyalinin gerek dimerinin '+1' yüklü sinyalinin gözlemlenmesi açısından en uygun matriksin SA olduğu tespit edilmiştir.
- IFN- γ protein aptamerinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif iyon modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiş olup IFN- γ protein için uygun olan SA matriksinin aptamerin iyonlaşması için uygun olmadığı görülmüştür. IFN- γ aptamerin hem çift protonlanmış moleküler iyon sinyalinin hem de dimerinin '+1' yüklü moleküler iyon sinyalinin gözlenebildiği matriks THAP olduğu için aptamer için THAP ' in en uygun matriks olduğu düşünülmektedir.
- Zenginleştirme işleminde sırası ile önce polimerik yüzeye çapraz bağlayıcı, aptamer, protein eklenmektedir. Eklenen yapının ortamdaki bağlanması gereken yapıya bağlanıp bağlanmadığının kontrolü için MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiştir. Polimerik yüzeye eklenen çapraz bağlayıcının ardından IFN- γ proteinine ait aptamerin eklenmeden önceki ve sonraki spektrumları karşılaştırıldığında aptamerin büyük bir kısmının çapraz bağlayıcıya bağlandığı gözlemlenmiştir.
- Yüzeye çapraz bağlayıcı ile bağlanan aptamerin ardından eklenen IFN- γ proteininin bağıllığının kontrolü, eklenme öncesinde ve sonrasında alınan spektrumlarla sağlanmıştır. Spektrumlar karşılaştırıldığında IFN- γ proteininin yüzeydeki aptamere büyük oranda bağlandığı gözlemlenmiştir.
- Oluşan IFN- γ proteini-aptamer kompleksinin bütün halde gözlenebilmesinin kontrolü için çeşitli matrikslerle MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiştir. Literatürde uygun gösterilen ATT matriksinde bile gözlemlenemeyen bu kompleksin derişimin düşük olması ve lazerin kompleksteki kovalent olmayan etkileşimleri bozması nedeniyle kompleks gözlenememiştir.
- Kompleksin bütün halinde gözlemlenememesi, çalışmaları bağlanan IFN- γ proteinini enzimatik parçalama işlemine tabi tutmaya yöneltmiştir.
- Çalışma aralığı olarak seçilen 0.007-7 pmol/ μ L derişimlerindeki IFN- γ protein çözeltileri hiçbir zenginleştirmeye uğratılmadan enzimatik parçalama işlemi

sonrası elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumlarındaki IFN- γ proteinine ait peptit fragmentlerinin iyon sinyallerinin çok şiddetli olmadığı 0.07 pmol/ μ L derişimine ait spektrumda ise iyon sinyalleri neredeyse hiç gözlemlenememiştir.

- Çalışma aralığındaki derişimlerdeki protein çözeltileri zenginleştirme işlemine uğratarak spektrumlar karşılaştırılmıştır. Zenginleştirme sonrası alınan spektrumlarda peptit fragmentlerine ait sinyallerin yüksek şiddette olduğu gözlemlenmiştir. Zenginleştirme olmadan ve zenginleştirme sonrası spektrumlar karşılaştırıldığında aptamer yapısının IFN- γ proteinine yüksek özgünlükte bağlanarak zenginleştirme sağladığı tespit edilmiştir.
- Zenginleştirme olmadan alınan spektrumunda 0.07 pmol/ μ L derişimindeki IFN- γ proteinine ait peptit fragmentleri gözlemlenemezken aptamer yapıları sayesinde 10 kat seyreltik olan 0.007 pmol/ μ L derişimindeki IFN- γ proteinine ait peptit fragmentlerinin analiz edilebildiği görülmüştür.
- Zenginleştirme için yüzeye eklenen IFN- γ proteinin ortamda bulunan aptamer dışındaki diğer yapılar ile kovalent olmayan etkileşimini kontrol etmek için MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiştir. Spektrumlarda IFN- γ proteinin ne yüzeye ne de çapraz bağlayıcıya bağlandığına dair şiddetli peptit fragmentlerine rastlanmamıştır.
- Enzimatik parçalanma sonrası bütün peptit fragmentlerinin çözelti formuna geçtiği düşünülmektedir. Enzimatik parçalama sonrası katı formuna bağlı olan peptitlerin kontrolü için parçalama sonrası çözelti formu uzaklaştırılıp elüsyon çözeltisi ile muamele edilen yüzeye ait spektrumlar incelenmiş yüzeyde dikkate değer miktarda peptit fragmenti olmadığı tespit edilmiştir.
- Zenginleştirme işlemine bekleme ve enzimatik parçalama sürelerinin etkisini kontrol etmek için belirlenen bekleme ve enzimatik parçalama süreleri iki katına çıkarıldığında alınan spektrumlara bakılarak süreleri arttırmanın zenginleştirmeye çarpıcı bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.
- Literatürde kullanılan çeşitli tampon çözeltilerinin tasarlanan zenginleştirme işlemindeki etkisine bakılan spektrumlarda 100 mM lık tris-HCl tamponunun sadece yıkamalar sırasında kullanıldığında en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- Zenginleştirme işleminde kullanılan polimerik yüzeyin miktarının bu zenginleştirme işlemine olumlu/ olumsuz etkileri 7.0 pmol/ μ L ve 0.7 pmol/ μ L IFN- γ protein çözeltilerde katı polimerik yüzeyin miktarı değiştirilerek kontrol

edilmiş ve MALDI-TOF-MS spektrumları alınmıştır. Alınan spektrumlar incelendiğinde optimum miktarın hem yüksek hem düşük derişim için yaklaşık 10 mg olduğu tespit edilmiştir.

- Aptamer ve IFN- γ proteini dışarıda kompleks oluşturulup yüzeye eklenmesinin ardından bağlanan proteinin enzimatik parçalamasından sonra pozitif iyon modunda elde edilen MALDI-MS kütle spektrumu incelenmiş ve kompleks oluşum sırasında aptamer ve IFN- γ proteininde meydana gelen konformasyonel değişikliklerin yüzeydeki çapraz bağlayıcıya bağlanmada negatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- IFN- γ proteini aptamerinin başka proteinler varlığında hedef molekülü olan IFN- γ proteinine bağlanmasını kontrol etmek amaçlı lizozim ve sitokrom C proteinlerinin de olduğu protein karışımı yüzeye eklenerek zenginleştirme işlemi uygulanmış ve elde edilen spektrum hiçbir zenginleştirme yapılmamış spektrumla karşılaştırılmıştır. IFN- γ proteini aptamerinin başka proteinler varlığında bile hedef molekülle etkileşime girdiği peptit fragmentlerine ait sinyallerden anlaşılmıştır.
- Canlı sistem için oldukça önemli olan IFN- γ proteinin BSA uzaklaştırılmış kan plazma ortamında aptamer ile zenginleştirilmesi sonucu elde edilen spektrumda ortamda çok fazla biyolojik madde olmasına rağmen IFN- γ protein peptit fragment sinyalleri tespit edilmiştir. Bu spektrumdaki sinyaller IFN- γ proteininin teşhis uygulamalarında tez kapsamında kullanılan zenginleştirme işleminin kullanılması için küçük bir ön çalışma niteliğinde olduğu görülebilmektedir.
- VEGF protein çözeltisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiş olup proteinin '+1' yüklü moleküler iyon sinyaline göre 3HPA matriksi dışında diğer matrikslerin uygun olduğu tespit edilmiştir.
- VEGF proteinine özgü aptamer çözeltisinin çeşitli matrikslerde elde edilen pozitif modundaki MALDI-TOF-MS spektrumları incelenmiş olup VEGF proteinin aksine 3HPA ve THAP matriksinin bu aptamer için uygun olduğu tespit edilmiştir.
- Literatüre uygun olarak ATT matriksinde VEGF-aptamer kompleksine ait MALDI-TOF-MS spektrumunda az da olsa bu komplekse ait sinyal gözlenebilmiştir. Bu sinyalin çok düşük olması bunun yanında aptamere ve

proteine ait sinyallerin ayrı ayrı gözlemlenmesi yapının lazerin şiddetiyle gaz fazında ayrıldığını göstermektedir.

- VEGF-aptamer kompleksinin belirgin şekilde gözlemlenememesinin ardından zenginleştirme sonucu aptamere bağlanan proteinler enzimatik parçalanmaya uğratılarak elde edilen peptit fragmentleri analiz edilmiştir.
- VEGF proteini için seçilen 0.002^{-1} pmol/ μ L derişimlerine sahip protein çözeltileri hiçbir zenginleştirmeye uğramadan enzimatik parçalama işlemine tabi tutulduğunda peptit fragment sinyallerinin şiddetlerinin ayırma için oldukça düşük olduğu gözlemlenip 0.002 pmol/ μ L derişimine sahip VEGF protein çözeltilerinin parçalama sonrası spektrumunda fragmentlere ait sinyal gözlemlenememiştir.
- VEGF'e özgü aptamer yapısı kullanılarak çalışma aralığındaki protein çözeltilerine zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Zenginleştirme olan ve olmayan spektrumlar karşılaştırıldığında peptit sinyallerinin şiddetlerindeki artış göze çarpmaktadır. Bu durum zenginleşmenin başarılı olduğunu göstermektedir.
- Çok düşük derişimlerde (0.002 pmol/ μ L) VEGF proteinine ait peptit sinyalleri aptamer yapıları ile zenginleştirme sayesinde MALDI-TOF-MS spektrumunda gözlemlenmiştir.
- Var olan VEGF hacminin çok az olması sebebi ile ziptip yöntemi ile peptit sinyallerinin artış kontrolü yapılmış, elde edilen spektrumlar sonucu sinyallerde belirgin bir artış gözlemlenememiştir.
- VEGF proteini aptamerinin başka proteinler varlığında hedef molekölü olan VEGF proteinine bağlanmasını kontrol etmek amaçlı lizozim ve sitokrom C proteinlerinin de olduğu protein karışımı yüzeye eklenerek zenginleştirme işlemi uygulanmış ve elde edilen spektrum hiçbir zenginleştirme yapılmamış spektrumla karşılaştırılmıştır. VEGF proteini aptamerinin başka proteinler varlığında bile hedef molekülle etkileşime girdiği peptit fragmentlerine ait sinyallerden anlaşılmıştır.
- Lizozim, sitokrom C ve VEGF'in bulunduğu protein karışımına zenginleştirme uygulandıktan sonra sinyal arttırımı için ziptip işlemi uygulanmıştır. Elde edilen spektrumlar ile ziptip işleminin VEGF'e ait peptit sinyallerinin yanı sıra lizozim

ve sitokrom C proteinlerine ait peptit fragment sinyallerini arttırdığı tespit edilmiştir.

- Canlı sistem için oldukça önemli bir diğer protein olan VEGF'in BSA uzaklaşmış kan plazma ortamında iken aptamer ile zenginleştirilmesi sonucu elde edilen spektrumda ortamda çok fazla yabancı madde olmasına rağmen VEGF protein peptit fragment sinyalleri tespit edilmiştir. Bu spektrumdaki sinyaller birçok hastalığın belirteci olan VEGF proteininin teşhis uygulamalarında tez kapsamında kullanılan zenginleştirme işleminin kullanılması için küçük bir ön çalışma niteliğinde olduğu görülebilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., Thornton J.M., Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level, *Nucleic Acids Research*, 29, 2860–2874, **2001**.
- [2] Feigon, J., Dieckmann, T., Smith, F.W., Aptamer structures from A to ζ , *Chemistry and Biology*, 3, 611–617, **1996**.
- [3] Cho, E.J., Lee, J.W., Ellington, A.D., Applications of aptamers as sensors, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2, 241–264, **2009**.
- [4] Bunka, D.H.J., Platonova, O., Stockley, P.G., Development of aptamer therapeutics, *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 557–562, **2010**.
- [5] Chen, Y., Pui, T.S., Kongsuphol, P., Tang, K.C., Arya, S.K., Aptamer-based array electrodes for quantitative interferon- γ detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 257–562, **2014**.
- [6] Ferrara, N., Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor, *Journal of Molecular Medicine*, 77, 527–543, **1999**.
- [7] Zhang, X., Zhu, S., Xiong, Y., Deng, C., Zhang, X., Development of a MALDI-TOF MS strategy for the high-throughput analysis of biomarkers: on-target aptamer immobilization and laser-accelerated proteolysis, *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 6055–6058, **2013**.
- [8] Forterre, P., The origin of DNA genomes and DNA replication proteins, *Current Opinion in Microbiology*, 5, 525–532, **2002**.
- [9] Huang Z., Szostak, J.W., Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer, *RNA*, 9, 1456–1463, **2003**.
- [10] Radom, F., Jurek, P.M., Mazurek, M.P., Otlewski, J., Jeleń, F., Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnology Advances* 31, 1260–1274, **2013**.
- [11] Lin, Y., Isolation and Characterization of DNA Aptamers for Zinc Finger Proteins, Doktora Tezi, Berlin Üniversitesi, Berlin, **2009**.
- [12] Patel, D.J., Structural analysis of nucleic acid aptamers, *Current opinion in Chemical Biology*, 1, 32–46, **1997**.
- [13] Pendergrast, P.S., Marsh, H.N., Grate, D., Healy, J.M., Stanton, M., Nucleic Acid Aptamers for Target Validation and Therapeutic Applications, *Journal of Biomolecular Techniques*, 16, 224–234, **2005**.
- [14] Bayrac, A.T., Sefah, K., Parekh, P., Bayrac, C., Gulbakan, B., Oktem, H. A., Tan, W., In vitro selection of DNA aptamers to glioblastoma multiforme, *ACS Chemical Neuroscience*, 2, 175–181, **2011**.
- [15] Leung, K., He, B., Yang, C., Leung, C., Wang, D., Ma, D., Development of an Aptamer-based sensing platform for Metal Ions, Proteins, and Small Molecules through Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Induced G-Quadruplex Formation, *The American Chemical Society: Applied Material and Interfaces*, 7, 24046–24052, **2015**.

- [16] Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., Franciscis, V., Nucleic acid aptamers in cancer medicine, *Federation of European Biochemical Societies*, 528, 12–16, **2002**.
- [17] Bayrac, A.T., In Vitro Selection of DNA Aptamers To Glioblastoma Multiforme, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [18] Bunka D.H.J., Stockley, P.G., Aptamers come of age - at last, *Nature Reviews: Microbiology*, 4, 588–596, **2006**.
- [19] Chen, T., Shukoor, M.I., Chen, Y., Yuan, Q., Zhu, Z., Zhao, Z., Aptamer-conjugated nanomaterials for bioanalysis and biotechnology applications, *Royal Society of Chemistry: Nanoscale*, 3, 546–556, **2011**.
- [20] Jayasena, S.D., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry*, 45, 1628–1650, **1999**.
- [21] Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W., Dower, W.J., Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6378–6382, **1990**.
- [22] He, M., Taussig, M.J., Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites, *Nucleic Acids Research*, 25, 5132–5134, **1997**.
- [23] Kirkham, P.M., Neri, D., Winter, G., Towards the design of an antibody that recognises a given protein epitope, *Journal of Molecular Biology*, 285, 909–15, **1999**.
- [24] Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham E.T., Guyer D.R., Adamis, A. P., Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nature Review: Drug Discovery*, 5, 123–132, **2006**.
- [25] Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M., Diversity of oligonucleotide functions, *Annual Review Biochemistry*, 64, 763–797, **1995**.
- [26] Padmanabhan, K., Padmanabhan, K.P., Ferrara, J.D., Sadler, J.E., Tulinsky, A., The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 17651–17654, **1993**.
- [27] Schultze, P., Macaya, R.F., Feigon, J., Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *Journal of Molecular Biology*, 235, 1532–1547, **1994**.
- [28] Tuerk, C., MacDougall, S., Gold, L., RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6988–6992, **1992**.
- [29] Pileur, F., Andreola, M., Dausse, E., Michel, J., Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1, *Nucleic Acids Research*, 31, 19, 5776–5788, **2003**.
- [30] Green, L. S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M., Janjić, N., Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, *Chemistry & biology*, 2, 683–95, **1995**.
- [31] Famulok, M., Mayer, G., Blind, M., Nucleic acid aptamers-from selection in

- vitro to applications in vivo, *Accounts of chemical research*, 33, 591–599, **2000**.
- [32] Beigelman, L., McSwiggen, J., Draper, K., Gonzalez, C., Jensen, K., Karpeisky, A., Chemical Modification of Hammerhead Ribozymes, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 25702–25708, **1995**.
- [33] Chelliserrykattil, J., Ellington, A.D., Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA, *Nature Biotechnology*, 22, 1155–1160, **2004**.
- [34] Kato, Y., Minakawa, N., Komatsu, Y., Kamiya, H., Ogawa, N., Harashima, H., Matsuda, A., New NTP analogs: The synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX, *Nucleic Acids Research*, 33, 2942–2951, **2005**.
- [35] Romig, T.S., Bell, C., Drolet, D.W., Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 731, 275–284, **1999**.
- [36] Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., Peyrin, E., A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 8672–8679, **2003**.
- [37] Kotia, R.B., Li, L., McGown, L.B., Separation of nontarget compounds by DNA aptamers, *Analytical Chemistry*, 72, 827–831, **2000**.
- [38] Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., Franciscis, V., Nucleic acid aptamers in cancer medicine, *Federation of European Biochemical Societies*, 528, 12–16, **2002**.
- [39] Sefah, K., Tang, Z.W., Shangguan, D.H., Chen, H., Lopez-Colon, D., Li, Y., Parekh, P., Martin, J., Meng, L., Phillips, J.A., Kim, Y.M., Tan, W.H., Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers, *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America*, 23, 235–244, **2009**.
- [40] Tang, Z., Parekh, P., Turner, P., Moyer, R.W., Tan, W., Generating aptamers for recognition of virus-infected cells, *Clinical Chemistry*, 55, 813–822, **2009**.
- [41] Zhao, Z., Xu, L., Shi, X., Tan, W., Fang, X., Shangguan, D., Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells, *Royal society of Chemistry: Analyst*, 134, 1808–1814, **2009**.
- [42] Guo, K.T., SchAfer, R., Paul, A., Gerber, A., Ziemer, G., Wendel, H.P., A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers, *Stem Cells*, 24, 2220–2231, **2006**.
- [43] Hamula, C.L.A., Zhang, H., Guan, L.L., Li, X.F., Le, X.C., Selection of aptamers against live bacterial cells, *Analytical Chemistry*, 80, 7812–7819, **2008**.
- [44] Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J.M., Colli, W., In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion, *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 20756–20762, **2002**.
- [45] Joeng, C.B., Niazi, J.H., Lee, S.J., Gu, M.B., ssDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 5380–5387, **2009**.
- [46] Nonaka, Y., Sode, K., Ikebukuro, K., Screening and Improvement of an Anti-

- VEGF DNA Aptamer, *Molecules*, 15, 215–225, **2010**.
- [47] Choi, J.H., Chen, K.H., Han, J.H., Chaffee, A.M., Strano, M. S., DNA aptamer-passivated nanocrystal synthesis: A facile approach for nanoparticle-based cancer cell growth inhibition, *Small*, 5, 672–675, **2009**.
- [48] Dollins, C.M., Nair, S., Sullenger, B.A., Aptamers in immunotherapy, *Human Gene Therapy*, 19, 443–450, **2008**.
- [49] Larson, N.Li, T., Nguyen, H.H., Sokolov, K.V., Ellington, A.D., Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells, *Royal society of chemistry: Chemical Communications*, 46, 392–394, **2010**.
- [50] Zelada-Guillen, G.A., Riu, J., Düzgün, A., Rius, F.X., Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor, *Angewandte Chemie - International Edition*, 48, 7334–7337, **2009**.
- [51] Lee, S., Kim, Y.S., Jo, M., Jin, M., Lee, D., Kim, S., Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen, *Biochemical and biophysical research communications*, 358, 47–52, **2007**.
- [52] Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E., Gilboa, E., Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication, *Cell*, 63, 601–608, **1990**.
- [53] Sandberg, J.A., Parker, V.P., Blanchard, K.S., Sweedler, D., Powell, J.A., Kachensky, A., Bellon, L., Usman, N., Rossing, T., Borden, E., Blatt, L.M., Pharmacokinetics and tolerability of an antiangiogenic ribozyme (ANGIOZYME) in healthy volunteers, *Journal of clinical pharmacology*, 40, 1462–1469, **2000**.
- [54] Willis, M.C., Collins, B., Zhang, T., Green, L.S., Sebesta, D.P., Bell, C., Kellogg, E., Gill, S.C., Magallanez, A., Knauer, S., Bendele, R.A., Gill, P.S., Janjic, N., Liposome anchored vascular endothelial growth factor aptamers, *Bioconjugate Chemistry*, 9, 573–582, **1998**.
- [55] Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L., Janjić, N., 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165), *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 20556–20567, **1998**.
- [56] Dougan, H., Lyster, D.M., Vo, C.V., Stafford, A., Weitz, J.I., Hobbs, J.B., Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood, *Nuclear Medicine and Biology*, 27, 289–297, **2000**.
- [57] Takahashi, T., Tada, K., Mihara, H., RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (A β) inhibit the aggregation of A β , *Molecular bioSystems*, 5, 986–991, **2009**.
- [58] Duclair, S., Gautam, A., Ellington, A., Prasad, V.R., High-affinity RNA Aptamers Against the HIV-1 Protease Inhibit Both In Vitro Protease Activity and Late Events of Viral Replication, *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 4, 228, **2015**.
- [59] Dieckmann, T., Suzuki, E., Nakamura, G. K., Feigon, J., Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold, *RNA*, 2, 628–640, **1996**.

- [60] Hermann, T., Patel, D.J., Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science*, 287, 820–825, **2000**.
- [61] Jiang, L., Suri, A.K., Fiala, R., Patel, D.J., Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex, *Chemistry & Biology*, 4, 35–50, **1997**.
- [62] Campisi, D.M., Calabro, V., Frankel, A.D., Structure-based design of a dimeric RNA \pm peptide complex, *the EMBO Journal*, 20, 178-186, **2001**.
- [63] Yang, Q., Goldstein, I.J., Mei, H.Y., Engelke, D.R., DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5462–5467, **1998**.
- [64] Walter, F., Vicens, Q., Westhof, E., Aminoglycoside–RNA interactions, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 694–704, **1999**.
- [65] Wallis, M.G., Streicher, B., Wank, H., Ahsen, U., Clodi, E., Wallace, S.T., Famulok, M., Schroeder, R., In vitro selection of a viomycin-binding RNA pseudoknot, *Chemistry & Biology*, 4, 357–366, **1997**.
- [66] Wilson, S.D., Szostak, W.J., In Vitro Selection of Functional Nucleic Acids, *Annual Review of Biochemistry*, 51, 611-647, **2000**.
- [67] Yadav, S.K., Agrawal, B., Chandra, P., Goyal, R.N., In vitro chloramphenicol detection in a Haemophilus influenza model using an aptamer-polymer based electrochemical biosensor, *Biosensors & bioelectronics*, 55, 337–342, **2014**.
- [68] Xu, W., Ellington, A.D., Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7475–7480, **1996**.
- [69] Baskerville, S., Zapp, M., Ellington, A.D., Anti-Rex aptamers as mimics of the Rex-binding element, *Journal of virology*, 73, 4962–4971, **1999**.
- [70] Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D., Frankel, A. D., RNA recognition by an isolated α helix, *Cell*, 73, 1031–1040, **1993**.
- [71] Horn, W.T., Tars, K., Grahn, E., Helgstrand, C., Baron, A.J., Lago, H., Adams, C.J. Peabody, D.S., Phillips, S.E.V., Stonehouse, N.J., Liljas, L., Stockley, P.G., Structural basis of RNA binding discrimination between bacteriophages Qbeta and MS2, *Structure*, 14, 487–495, **2006**.
- [72] Hooker, A., James, D., Glycosylation Heterogeneity of Recombinant Human IFN- γ , *Journal Of Interferon And Cytokine Research*, 295, 287–295, **1998**.
- [73] Taşbakan, M.S., Sayiner, A., Tüberküloz Hastalığı ve İnfeksiyonunda Interferon Gamma Testlerinin Yeri, *Turkish Journal of Infection*, 22, 179–184, **2008**.
- [74] Liu, Y., Tuleouva, N., Ramanculov, E., Revzin, A., Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection, *Analytical chemistry*, 82, 8131–8136, **2010**.
- [75] Yan, G., Wang, Y., He, X., Wang, K., Liu, J., Du, Y., A highly sensitive label-free electrochemical aptasensor for interferon-gamma detection based on graphene controlled assembly and nuclease cleavage-assisted target recycling amplification, *Biosensors & bioelectronics*, 44, 57–63, **2013**.

- [76] Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A., Aptamers - Basic research, drug development, and clinical applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 367–374, **2005**.
- [77] Cao, B., Hu, Y., Duan, J., Ma, J., Xu, D., Yang X.D., Selection of a novel DNA aptamer for assay of intracellular interferon-gamma, *Plos one*, 9, 1-9, **2014**.
- [78] Data, C., Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Different Clinical Subtypes of Oral Lichen Planus, *Iranian Journal of Medical sciences*, 27, 157–160, **2007**.
- [79] Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *the FASEB Journal*, 13, 9–22, **1999**.
- [80] Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature*, 380, 435–439, **1996**.
- [81] Zhao S., Yang W., Lai, R. Y., A folding-based electrochemical aptasensor for detection of vascular endothelial growth factor in human whole blood,” *Biosensors & bioelectronics*, 26, 2442–7, **2011**.
- [82] Price, P., Standard definitions of terms relating to mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2, 336–48, **1991**.
- [83] McNeal, J.C., Macfarlane, D.R., Observation of a Fully Protected Oligonucleotide Dimer at m/z 12637 by Cf-Plasma Desorption Mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 103, 1609–1610, **1981**.
- [84] Griffiths, J., A brief history of mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 80, 5678–5683, **2008**.
- [85] Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications, *Annual review of biomedical engineering*, 11, 49–79, **2009**.
- [86] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 151–153, **1988**.
- [87] Rosu, F., Pauw, E., Gabelica, V., Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions, *Biochimie*, 90, 1074–87, **2008**.
- [88] Pihlainen, K., Grigoras, K., Franssila, S., Ketola, R., Kotiaho, T., Kostianen, R., Analysis of amphetamines and fentanyl by atmospheric pressure desorption/ionization on silicon mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and its application to forensic analysis of drug seizures, *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 539–545, **2005**.
- [89] Tavşanlı, B. Siyalik asit içeren glikopeptitlerin hızlı ve etkin kütle spektrometrik analizleri için geçiş metal oksitleri kullanılarak seçimli olarak zenginleştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.

- [90] Bleakney, W., A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor, *Physical Review*, 34, 157–160, **1929**.
- [91] Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry - Principles and Applications*, 3. Baskı, Wiley, **2007**.
- [92] Zaluzec E.J., Gage, D.A., Watson, J.T., Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization, *Protein expression and purification*, 6, 109–23, **1995**.
- [93] Karas, M., Krüger, R., Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism, *Chemical Reviews*, 103, 427–439, **2003**.
- [94] Dreisewerd K., The desorption process in MALDI, *Chemical Reviews* 103, 395-425, **2003**.
- [95] Vorm , O., Roepstorff, P., Mann, M., Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry*, 66, 3281–3287, **1994**.
- [96] Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F., 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111, 89–102, **1991**.
- [97] Beavis, R., Chaudhary, T., Chaid, B., α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix- assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry, *Organic Mass spectrometry*, 27, 156–158, **1992**.
- [98] Brown, R.S., Lennon, J.J., Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions, *Analytical Chemistry*, 67, 3990–3999, **1995**.
- [99] Manisali, I., Chen, D.D.Y., Schneider, B.B., Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 243–256, **2006**.
- [100] Güler, Ü., Trombin ve lizozimin özgün aptamer kullanılarak zenginleştirilmeleri ve kütle spektrometresi ile tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [101] Theel, E.S., Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates, *Mayo medical laboratories*, 38,1-8, **2013**.
- [102] Banerjee, S., Mazumdar, S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1–40, **2012**.
- [103] Cole, R.B., Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 763–772, **2000**.
- [104] Dawson, P.H., Quadrupole mass analyzers: Performance, design and some recent applications, *Mass Spectrometry Reviews*, 5, 1–37, **1986**.
- [105] Douglas, D.J., Applications of collision dynamics in quadrupole mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9, 101–113, **1998**.

- [106] Imrie, D.C., Pentney, J.M., Cottrell, J.S., A Faraday Cup Detector for High-mass Ions in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9,1293-1296, **1995**.
- [107] Moniatte, M., Van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., Van Dorsselaer, A., Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry, *The FEBS Journal*, 384, 269–272, **1996**.
- [108] Morris H.R., Biomolecular mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 45, 331–342, **1982**.
- [109] Cotter, R.J., Lasers and mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 56, 485-504, **1984**.
- [110] Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Müller, M., Petković, M., Spalteholz, H., Zschörnig, O., Arnold, K., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research, *Progress in lipid research*, 43, 449–488, **2004**.
- [111] Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q., Cheng, G., Mass spectrometry of peptides and proteins, *Methods*, 35, 211–222, **2005**.
- [112] Sasaki, G.L., Souza L.M., Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates, *Intech*, 4. bölüm, 81-115, **2013**.
- [113] Crain, P.F., McCloskey, J.A., Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids, *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 25–34, **1998**.
- [114] Witze E., Old, W., Resing, K., Ahn, N., Mapping Protein Post-Translational Modifications With Mass Spectrometry, *Nature methods*, 4, 798–806, **2007**.
- [115] Daniel, M.J., Friess, S.D., Rajagopalan, S., Wendt, S., Zenobi, R., Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, 216, 1-27, **2002**.
- [116] Martin, S.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Marto, J.A., Subfemtomole MS and MS / MS Peptide Sequence Analysis Using Nano-HPLC Micro-ESI Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 72, 4266–4274, **2000**.
- [117] Warren E.N., Elms, P.J., Parker, C.E., Borchers, C.H., Development of a protein chip: A MS-based method for quantitation of protein expression and modification levels using an immunoaffinity approach, *Analytical Chemistry*, 76, 4082–4092, **2004**.
- [118] Latham, M.P., Zimmermann G.R., Pardi, A., NMR Chemical Exchange as a Probe for Ligand-Binding Kinetics in a Theophylline-Binding RNA Aptamer, *JACS*, 131, 5052–5053, **2009**.
- [119] Hianik, T., Ostatná, V., Sonlajtnerova, M., Grman, I., Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin, *Bioelectrochemistry*, 70, 127–133, **2007**.

- [120] Braakman, I., Helenius, J., Helenius, A., Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum, *the EMBO Journal*, 11, 1717–1722, **1992**.
- [121] Anfinsen, C.B., Haber, E., Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds, *The Journal of biological chemistry*, 236, 1361–1363, **1961**.
- [122] Lin, S., Cotter, R.J., Woods, A.S., Detection of non-covalent interaction of single and double stranded DNA with peptides by MALDI-TOF, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 33, 12–21, **1998**.
- [123] Chen, F., Gülbakan, B., Zenobi, R., Direct access to aptamer–protein complexes via MALDI-MS, *The Royal society of Chemistry: Chemical Science*, 4, 4071-4078, **2013**.
- [124] Dick, L.W., McGown, L.B., Aptamer-enhanced laser desorption/ionization for affinity mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 76, 3037–3041, **2004**.
- [125] Vasilescu, A., Gaspar, S., Mihai, I., Tache, A., Litescu, S.C., Development of a label-free aptasensor for monitoring the self-association of lysozyme, *The Royal society of Chemistry: Analyst*, 138, 3530–3537, **2013**.
- [126] Treitz, G., Gronewold, T.M.A., Quandt, E., Zabe-Kühn, M., Combination of a SAW-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis, *Biosensors & bioelectronics*, 23, 1496–502, **2008**.
- [127] Gronewold, T.M.A., Baumgartner, A., Hierer, J., Sierra, S., Blind, M., Blu, J., Tillmann, T., Kiwitz, A., Kaiser, R., Zabe-kühn, M., Quandt, E., Famulok, M., Kinetic Binding Analysis of Aptamers Targeting HIV-1 Proteins by a Combination of a Microbalance Array and Mass Spectrometry (MAMS), *The Journal of proteome research*, 8, 3568–3577, **2009**.
- [128] Mairal, T., Özalp, V.C., Sánchez, P. L., Mir, M., Katakis, I., O’Sullivan, C.K., Aptamers: Molecular Tools For Analytical Applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 989–1007, **2008**.
- [129] Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., Sullenger, B. A., *Aptamers to Proteins*, The aptamer handbook, 6.bölüm, *Wiley*, 131-166, **2006**.
- [130] Tuleuova, N., Jones, C.N., Yan, J., Ramanculov, E., Yokobayashi, Y., Revzin, A., Development of an aptamer beacon for detection of interferon-gamma, *Analytical Chemistry*, 82, 1851–1857, **2010**.
- [131] Köksal, D., Unsal, E., Poyraz, B., Kaya, A., Savaş, H., Sipit, T., Gönüllü, U., The value of serum interferon-gamma level in the differential diagnosis of active and inactive pulmonary tuberculosis, *Tüberküloz ve Toraks*, 54, 17–21, **2006**.
- [132] Aoe, K., Hiraki, A., Murakami, T., Eda, R., Maeda, T., Sugi, K., Takeyama, H., Diagnostic significance of interferon-gamma in tuberculous pleural effusions, *Chest*, 123, 740–744, **2003**.
- [133] Demirci, U., Karaciğer hastalıklarında Vasküler Endotel Büyüme Faktör (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) Düzeyleri, *Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. İç hastalıkları Kliniği*, **2006**.

- [134] Salven, P., Ruotsalainen, T., Mattson, K., Joensuu, H., High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer, *International Journal of Cancer*, 79, 144–146, **1998**.
- [135] Balla, M.M.S., Desai, S., Purwar, P., Kumar, A., Bhandarkar, P., Shejul, Y.K., Pramesh, C.S., Laskar, S., Pandey, B.N., Differential diagnosis of lung cancer, its metastasis and chronic obstructive pulmonary disease based on serum Vegf, Il-8 and MMP-9, *Science Reports*, 6, 1-7, **2016**.
- [136] Otlu, B., Biyosensörler : Biyoreseptör Moleküller, *6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11)*, 16-18 Mayıs, Elazığ, Turkey, Biyosensörler: 16–18, **2011**.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:12/01/2017

Tez Başlığı / Konusu: **APTAMER BAĞLI YÜZEYLERDE VEGF VE INTERFERON- γ PROTEİNLERİNİN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE MALDI-MS İLE TAYİNLERİ**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 107 sayfalık kısmına ilişkin, 12/01/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: CANAN HÖÇÜK
Öğrenci No: N13220544
Anabilim Dalı: KİMYA
Programı: YÜKSEK LİSANS
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

12.01.2017

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Bekir SALİH

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik bilgileri

Adı Soyadı : Canan HÖÇÜK
Doğum Yeri : Çorum
Medeni Hali : Bekar
E-posta : hocukcanan@gmail.com
Adresi : Bayraktar mah. Akhisar sok. No16/16 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü (3.79/4.00- Bölüm Birinciliği-Fakülte İkinciliği)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalı (4.00/4.00)
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce ;YDS 76.25 (C) / IELTS 5.5 / ODTU IYS 67

İş Deneyimi

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi (Şubat 2015-...)

Deneyim Alanları

MALDI-TOF-MS, GC-MS, LC-MS cihazları, proteomiks, biyomoleküller.

Tezden üretilmiş Projeler ve Bütçesi

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

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

Höçük C., Güler Tokat Ü., Salih B.," Aptamer Bağlı Yüzeylede VEGF ve İnterferon – γ proteinlerinin Zenginleştirilmesi ve Kütle Spektrometrisi ile Tayini" (poster bildiri-Poster İkinciliği Ödülü), **16. Ulusal Spektroskopi Kongresi** , Elazığ, 29-31 Mayıs 2015.

Höçük C., Güler Tokat Ü., Salih B.," Enrichment Of Vegf Protein On The Aptamer Bind Surfaces And Detection via Mass Spectrometry" (poster bildirimi), **10th Agean Analytical Chemistry Days**, Çanakkale, 29 Eylül- Ekim 2016.