

**APTAMER TEMELLİ AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİYLE  
PROTEİN C SAFLAŞTIRILMASININ ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PROTEIN C PURIFICATION BY  
APTAMER BASED AFFINITY CHROMATOGRAPHY**

**NİLUFER ALİYEVA**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

## ÖZET

# APTAMER TEMELLİ AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİYLE PROTEİN C SAFLAŞTIRILMASININ ARAŞTIRILMASI

**Nilufer ALIYEVA**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**Aralık 2021, 82 sayfa**

Protein C (PC), K vitaminine bağımlı bir plazma proteindir. Aktive Protein C (APC) protein C'den türeyen bir glikoproteindir. Trombin bağılı trombomodulin (T-TM) kompleksi tarafından bir aktivasyon peptidinin kırılmasıyla oluşur. Aktive Protein C güçlü bir antikoagülanıdır ve kan pıhtısının parçalanmasını kolaylaştırır. Aktive Protein C pıhtılaşma kaskadında kofaktörlerini (FVa ve FVIIIa) inhibe ederek antikoagülan özelliği gösterir. PC kanda 4 µg/mL derişime sahip eser bir proteindir. Kandaki PC seviyesi azaldığında ciddi problemler gözlenir. Protein C eksikliği hastaları DVT (derin damar trombozu) riskine ve hayati tehdit oluşturabilecek doku oksijeninde azalmaya neden olan pıhtılaşma komplikasyonları riski altındadır. Bu kan pıhtıları kan akışına karışırsa kalp krizi, inme ve pulmoner emboliyi tetikler. Protein C'nin etkin ve ekonomik bir yöntemle saflaştırılması son derece önemlidir. Kriyojeller, monomer veya polimer başlatıcıların kısmi olarak dondurulmuş çözeltilerde hazırlanmış jel matrisleridir. Birbirleri ile bağlantılı makro gözeneklerden oluşurlar ve ozmotik, kimyasal ve

mekanik özellikleri sayesinde birçok biyolojik uygulamada kullanılırlar. Kriyojellerin uygulama alanları; doku iskelesi olarak, biyomoleküllerin, hücrelerin vb. immobilizasyonunda taşıyıcı olarak, proteinlerin, mikroorganizmaların, hücrelerin vb. kromatografik ayırma işlemlerinde kullanılır.

Bu tez çalışmasında, afinite tekniğinden faydalanarak farklı oranlarda Aktive Protein C (APC) spesifik DNA aptamer temelli kriyojel membranlar sentezlenmiştir. Aptamer temelli kriyojeller protein C saflaştırma ve ayırma işlemleri için uygulanmıştır. Üç farklı oranda DNA aptamer takılı kriyojel membranlar hazırlanmıştır. Sentezlenen APC spesifik DNA aptamer kriyojeller Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), tarama elektron mikroskobu (SEM), şişme testi ve yüzey alanı analizi ile karakterize edilmiştir. Kriyojellerin makrogözenekli yapıları SEM analizi görüntüleri ile verilmiştir. Protein C adsorpsiyonuna pH'nın, Protein C derişiminin, sıcaklığın, iyonik şiddetin etkileri ve tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Maksimum PC adsorpsiyonu en yüksek oranda DNA aptamer takılı kriyojel membran ile 89.02 g/mg olarak bulunmuştur. Kriyojellere ardarda on defa adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması uygulandığında adsorpsiyon kapasitesindeki kararlılık %96.11 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca aptamer temelli kriyojel membranların farklı proteinlere karşı olan seçiciliği araştırılmıştır. Sonuç olarak PC'ye karşı yüksek seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasının son kısmında yapay plazma ortamından Protein C saflaştırılması sodyum-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak saflaştırıldığı analiz edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer Ligand, Afinite Kromatografisi, Kriyojel, Aktive Protein C, Protein Saflaştırması.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF PROTEIN C PURIFICATION BY APTAMER BASED AFFINITY CHROMATOGRAPHY**

**Nilufer ALIYEVA**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**December 2021, 82 pages**

Protein C (PC) is a vitamin K-dependent plasma protein. Activated Protein C (APC) is a glycoprotein derived from protein C. It is formed by cleavage of an activation peptide by the thrombin-linked thrombomodulin (T-TM) complex. Activated Protein C (APC) is a powerful anticoagulant and facilitates the breakdown of blood clots. Activated Protein C (APC) shows anticoagulant properties by inhibiting cofactors (FVa and FVIIIa) in the coagulation cascade. PC is a trace protein with a concentration of 4 µg/mL in blood. Serious problems are observed when the PC level in the blood decreases. Patients with protein C deficiency are at risk of DVT (deep vein thrombosis) and clotting complications that cause a life-threatening decrease in tissue oxygen. If these blood clots get into the bloodstream, they trigger a heart attack, stroke, and pulmonary

embolism. The purification of protein C by an effective and economical method is highly important. Cryogels, are gel matrices of monomer or polymer initiators prepared in partially frozen solutions. They consist of interconnected macropores and are used in many biological applications thanks to their osmotic, chemical and mechanical properties. Application areas of cryogenic; As a tissue scaffold, biomolecules, cells, etc. As a carrier in the immobilization of proteins, microorganisms, cells and so on. Used in chromatographic separation processes.

In this thesis, Activated Protein C (APC) specific DNA aptamer-based cryogels at different rates were synthesized using the affinity technique and applied for Protein C purification and separation processes. Cryogel membranes with DNA aptamer in three different ratios were prepared. The synthesized APC-specific DNA aptamer cryogels were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), swelling test, surface area, and contact angle analysis. The macroporous structures of the cryogels are given by SEM analysis images. The effects of pH, protein C concentration, temperature, ionic strength on Protein C adsorption and their reusability were investigated. Maximum PC adsorption was found to be 89.02 mg/g with the DNA aptamer attached cryogel membrane at the highest rate. When adsorption-desorption studies were applied to cryogels ten times in succession, the stability in adsorption capacity was calculated as 96.11%. In addition, the selectivity of aptamer-based cryogel membranes against different proteins was investigated. As a result, it was determined that it showed high selectivity against PC. In the last part of the thesis, Protein C purification from an artificial plasma medium was analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

**Keywords:** Aptamer Ligand, Affinity Chromatography, Cryogel, Activated Protein C, Protein Purification.

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűrecinde bana bilgi ve tecrűbeleriyle yol gűsteren, desteęini esirgemedenden paylaőan sayın danıőmanım Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye

alıőmalarımnda emeğini ve yardımlarını devamlı hissettiğim, birlikte çalıőmaktan mutlu olduğum sevgili hocam Dr. Semra AKGÖNÜLLÜ'ye

Tez çalıőmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaőtıęım, birçok konuda yardımlarını ve desteklerini hissettiğim BİOREG ailesine,

Buęűnlere gelmemi saęlayan, bana bu yolda baőından beri inanan kıymetli Anneme,

Sonsuz teőekkűrlerimi sunuyorum.

Nilufer Aliyeva

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Aptamerler .....	5
2.1.1. SELEX Tekniği .....	7
2.1.2. Aptamer ve Antibadi Arasındaki Farklılıklar .....	10
2.1.3. Aptamer Ligand .....	14
2.2 Protein Saflaştırılması .....	15
2.3. Aktive Protein C .....	16
2.4. Kriyojeller .....	18
2.4.1 Biyomoleküllerin Saflaştırmasında ve Ayrılmasında Kriyojeller .....	20
2.5. Afinite Kromatografisi .....	20
2.5.1. Afinite Kromatografisinde Aptamer Ligandlarının Ortaya Çıkışı .....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	28
3.1. Kimyasal Malzemeler .....	28
3.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Sentezi .....	28
3.2.1. Spesifik DNA Aptamer Temelli Kriyojellerin Hazırlanması .....	28
3.3. Karakterizasyon Çalışmaları .....	29
3.3.1. FTIR Analizi .....	29
3.3.2. Şişme Testi .....	29
3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	30

3.3.4. Yüzey Alanı Ölçümleri (BET) .....	30
3.4. Protein C Adsorpsiyon Çalışmaları .....	30
3.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik .....	30
3.6. Seçicilik Deneyleri .....	31
3.7. Yapay Plazma Ortamında Protein C Safılaştırma ve SDS-PAGE Analizi	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	33
4.1. Poli(HEMA) Kriyojellerin Sentezi .....	33
4.2. Aptamer Temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) Kriyojellerin Sentezi .....	33
4.3. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	34
4.3.1. FTIR-ATR Analizi .....	34
4.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi .....	36
4.4.1 pH'nın Etkisi .....	42
4.4.2. Akış Hızı .....	42
4.4.3. Başlangıç Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi .....	43
4.4.4. Zamanın Adsorpsiyona Etkisi .....	45
4.4.5. Sıcaklığın Etkisi .....	46
4.4.6. İyonik Şiddetin Etkisi .....	47
4.5. Adsorpsiyon İzoterm Sonuçları .....	48
4.6. Adsorpsiyon Kinetiği Sonuçları.....	51
4.7. Seçicilik Çalışmaları .....	55
4.8. Yapay Plazmadan Protein C Safılaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE İle Görüntüleme.....	56
4.9. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması .....	57
4.10. Literatür Karşılaştırması .....	57
5. YORUM.....	59
6. KAYNAKLAR .....	63
EKLER .....	81
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	8F
ÖZGEÇMİŞ .....	8G

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aptamerin hedefe bağlanması [20].	5
Şekil 2.2. Genel SELEX yönteminin şematik gösterimi [42].	10
Şekil 2.3. Aptamer temelli afinite kromatografisi yöntemleri [59].	15
Şekil 2.4. Kriyojel hazırlama aşamaları: (i) bir çapraz bağlayıcıya sahip monomerlerin veya polimerlerin bir çözeltisi, (ii) donma, (iii) sıfır altı sıcaklıkta kriyojelasyonu ve (iv) doğal hidrasyon durumunda (v) makro gözenekli kriyojel oluşturmak üzere çözünmesi [76].	19
Şekil 2.5. İmmobilize aptamer ligand ve protein molekülü arasındaki moleküler bağlanmanın şematik gösterimi [59].	22
Şekil 2.6. Afinite kromatografisi temel prensibi.	24
Şekil 3.1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) deney düzeneği.	32
Şekil 4.1. Poli(HEMA-GMA) kriyojel sentezi görüntüsü.	33
Şekil 4.2. Poli(HEMA) kriyojelin FTIR-ATR spekturumu.	35
Şekil 4.3. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin FTIR-ATR spekturumu.	35
Şekil 4.4. Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojelin FTIR-ATR spekturumu.	36
Şekil 4.5. Poli(HEMA) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.	37
Şekil 4.6. Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.	38
Şekil 4.7. Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.	39
Şekil 4.8. (a) Kriyojel membranlar; (b) Şişmiş polimer; (c) Polimerin sıkılması; (d) sıkılmış polimer.	41
Şekil 4.9. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-2) kriyojellerin Protein C adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. T: 25°C, PC derişimi: 1.0 mg/mL, m <sub>kuru kriyojel</sub> : 19.0 mg.	42
Şekil 4.10. Akış hızının adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Çalışma tamponu: pH 7.4; PC derişimi: 1.0 mg/mL; T: 25°C; m <sub>kuru kriyojel</sub> : 19 mg.	43
Şekil 4.11. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların Protein C adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi; Çalışma tamponu: pH 7.4, T: 25°C, m <sub>kuru kriyojel</sub> : 19 mg.	44

Şekil 4.12. Adsorpsiyon zamanının PC adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Çalışma tamponu: pH 7.4; PC derişimi: 1.5 mg/mL; T: 25°C; m <sub>kuru kriyojel</sub> : 19 mg.....	45
Şekil 4.13. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Çalışma tamponu: 0.1 M pH: 7.4; APC derişimi: 1.5 mg/mL, m <sub>kuru mikrokriyojel</sub> : 19 mg. ....	46
Şekil 4.14. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Çalışma tamponu: 0.1 M pH: 7.4; T: 25°C; APC derişimi: 1.5 mg/mL, m <sub>kuru mikrokriyojel</sub> : 19.0 mg.....	47
Şekil 4.15. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranları için Langmuir adsorpsiyon izoterm doğrusal grafiğı. ....	50
Şekil 4.16. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranları için Freundlich adsorpsiyon izoterm doğrusal grafiğı. ....	50
Şekil 4.17. Deneysel verilerin izoterm ile karşılaştırılması. ....	51
Şekil 4.18. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların birinci dereceden kinetiğı. ....	53
Şekil 4.19. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların ikinci dereceden kinetiğı. ....	54
Şekil 4.20. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin kalıp (Protein C) ve yarışmacı (BSA ve LYZ) proteinleri adsorpsiyonu. Çalışma tamponu: pH 7.4, T: 37°C, protein derişimleri: 1.5 mg/mL, m <sub>kuru kriyojel</sub> : 19 mg.....	55
Şekil 4.21. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Standart Protein C solüsyonu, Sıra 1. Protein C saflaştırılmasından önce plazma, Sıra 2. Protein C saflaştırılmasından sonra plazma, Sıra 3. desorpsiyon numunesi. Sıra 4. Biobelirteç (Fermentas)...	56
Şekil 4.22. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin tekrar kullanılabilirliğı. Aktive Protein C derişimi: 1.5 mg/mL; Adsorpsiyon pH: 7.4; Desorpsiyon ajanı: 0.1 M NaCl; T: 25°C.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aptamer ve antibadi ligand ve afinite kromatografisinin ayırma aracı olarak karşılaştırmalı özellikleri [59].	13
Çizelge 2.2. Teşhis ve afinite kromatografisinde kullanılabilen aptamerler arasındaki temel farklar [59].	26
Çizelge 4.1. Poli(HEMA-GMA) ve P(HEMA) kriyojel membranların yüzey alanı sonuçları.	40
Çizelge 4.2. Poli(HEMA) kriyojel membranların şişme ve makrogözeneklilik oranları.	41
Çizelge 4.3'de Langmuir ve Freundlich izoterm modeli sonuçları gösterilmektedir. Değerlere bakıldığında korelasyon katsayıları bakımından karşılaştırdığımızda bu çalışma Şekil 4.15'den de görüleceği gibi Langmuir izoterm modeli yaklaşımına daha fazla uygun olduğu söylenebilir. Maksimum PC adsorpsiyon değeri deneysel olarak elde edilen maksimum PC adsorpsiyon değerlerine daha yakındır.	49
Çizelge 4.3. Langmuir ve Freundlich izoterm modeli sabitleri.	51
Çizelge 4.4. DNA-Aptamer temelli kriyojel membranlar için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik denge sabitleri sonuçları (PC derişimi: 4.0 mg/mL).	54
Çizelge 4.5. Protein C saflaştırılması için yapılan çalışmaların literatür karşılaştırılması çizelgesi.	58

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

Q	Adsorpsiyon kapasitesi
$k_a$	Bağlanma hız sabiti
$k_d$	Ayrılma hız sabiti
$K_A$	Bağlanma sabiti
$K_D$	Ayrılma sabiti
kDa	Kilo Dalton
Da	Dalton
Ca	Kalsiyum
NaCl	Sodyum Klorür
$KH_2PO_4$	Potasyum Dihidrojen Fosfat
$Na_2PO_4$	Disodyum Hidrojen Fosfat

### Kısaltmalar

PC	Protein C
APC	Aktive Protein C
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
APT	Aptamer
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (Üssel zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi)

EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SDS-PAGE	Sodyum Dedosil-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
BSA	Sığır Serum Albümin
LYZ	Lizozim
IgG	Immunoglobülin G
APS	Amonyum Persülfat
TEMED	Tetrametiletildiamin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
LNA	Locked Nükleik Asit
mAb	Monoklonal Antibadi
AMC	Aptamer Magnetic Capture
GMA	Glisidil Metakrilat
PEGDA	Polietilen Glikol Dimetakrilat
AuNPs	Altın Nanopartiküller
IMAC	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

# 1. GİRİŞ

Serin proteazın K vitaminine bağımlı bir proenzimi olan Protein C (PC) seviyesi birçok sağlık sorunlarının teşhisi için önemli bir unsur olmak ile eksikliği veya fazlalığı bulunması durumlarında birçok tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadır. Bu proteinin oldukça yüksek saflıkta elde edilmesi bilimsel çalışmalar açısından oldukça önemlidir. Aktive Protein C (APC) spesifik DNA aptameri kriyojellerin hazırlanarak Protein C aptamerlerinin belirlenen yöntemler doğrultusunda afinite-aptamer ilişkisiyle yüksek saflık ve seçicilikte ayrılması amaçlarımızdandır. Ayrıca polimerizasyonun optimum şartlarda hazırlanarak hedef moleküllerin yüksek afiniteyle bağlanması ve en saf şekilde ayırma sağlanması ve yüksek miktarda Protein C makromolekülünün elde edilmesi hedeflerimizdir. Sonuç olarak bu çeşit benzersiz amino asit dizilerine özgün olarak bağlanabilen tamamlayıcı bileşenler bulmak ve oluşan kompleks yapısı bozulmadan (denatüre olmadan) doğal ortamından saflaştırmak oldukça önemlidir [1].

Biyokimyasal araştırma, proteomiks ve biyoteknolojideki önemli bir adımlardan birisi de proteinler için saflaştırma teknoloji yöntemlerinin büyük ölçüde gelişmiş olmasıdır. Gen ürünleri, ilgili proteinlerin genellikle çok karmaşık ortamların bir parçası olduğu bilindiği gibi karmaşık bir alan olan lokalizasyonları, yapıları ve fonksiyonları ile ilgili çok sayıda araştırmanın da ilk amacıdır. Proteinler küresel ve makroskopik olarak birbirine benzerler ve İki düzine amino asitten oluşurlar. Dahası, amino asitlerin sayısına ve bunların dizisine göre işlevleri de çok farklıdır. Amino asitlerin sahip oldukları hidrofilik, hidrofobik, alkalın veya asidik yan grup yapısından dolayı proteinler iyon değişim etkisi veya hidrofobik birleşmelerle parçalanabilir. Bu ilgiçekici özelliklerden en çok sıvı kromatografisi (LC) tekniğinde faydalanılır, ancak bununla birlikte tek adımda çok nadir yüksek oranda saf proteinler saflaştırılır. Afinite kromatografisinin protein saflaştırılması gerçek prensibi bu şekildedir. Bu tekniğin çeşitleri mevcut olsa bile ana konu saflaştırılmak istenen (hedef) proteini karmaşık bir ham ekstraktan ayrıştırılması için olağanüstü bir spesifik ligandın nasıl tasarlanması gerektiğidir. Doğada bilinen etkileşimlerden esinlenen moleküler tanımayaya dayalı olarak birçok deneme deneysel olarak gerçekleştirilmiştir. Protein etkileşimi için antibadi-

antijen bağlanması en önemlilerinden biridir. Proteinlerin küçük moleküllerinin lipid veya hormon gibi çeşitli rolleri vardır. Etkileşim analogunun kimyasal olarak bir kromatografik desteğe bağlandığı afinite kromatografisinde ayrıştırılan substratların çok spesifik enzimatik modifikasyonları da yapılabilir. Bu dikkate değer yaklaşımlar olmasına rağmen, protein saflaştırılması spesifik afinite ligandlarının çok nadir bulunabilirliği nedeniyle çok sınırlıdır.

Protein C amonyum sülfat çökeltme, iyon değişim kromatografisi, baryum sitrat adsorpsiyonu ve elüsyonu, preparatif elektroforez ve dekstran sülfat agaroz kromatografisi gibi geleneksel analitik yöntemlerle sitratlanmış kan plazmasından saflaştırılabilir. Monoklonal antibadiler (Mab), immünoafinite kromatografisiyle (IAC) kolay saflaştırmaya izin vermiştir. Rekombinant Protein C, hücre soylarında ve ayrıca transgenik hayvanlarda üretilmiştir. Hem plazmadan hem de rekombinant olarak türetilmiş APC'nin ayırt edilemez katalitik aktiviteleri vardır. Bu tez çalışmasında, henüz sistemde çok aktif olmayan Aptamer-afinite etkileşimiyle kriyojeller yardımıyla Protein C'nin kromatografik olarak saf bir şekilde saflaştırılmasını önermektedir [2].

Kan pıhtılaşma faktörü olan PC'nin insan kan plazmasındaki derişimi 3.9 µg/mL -5.9 µg/mL aralığındadır ve *in vivo* yarı ömrü ise 6 saat kadardır [3-5]. İnsan kanında PC derişimi 4 µg/mL'nin altında olduğu zaman aşırı pıhtılaşma ve tromboz gibi çok ciddi sorunlarla karşılaşılabilir. PC eksikliği bulunan kritik hastalar, klinik olarak soğuk donmuş plazma, protrombin kompleks konsantresi, heparin veya oral antikoagülanlar ile tedavi edilir. Bu ilaçların kullanımı aşırı iç kanama, cilt nekrozu, felç (inme) veya organ yetmezliğine sebebiyet verebilir. Buna karşılık, PC'nin bilinen herhangi bir yan etkisinin bulunmaması terapötik kullanımı için umut vaad etmektedir.

Bu proteinin oldukça yüksek saflıkta elde edilmesi bilimsel çalışmalar açısından oldukça önemlidir. Bu sebeple tez başarıyla gerçekleştiğinde APC spesifik DNA aptamer immobilize kriyojeller hazırlanarak APC aptamerlerinin belirlenen yöntemler doğrultusunda afinite-aptamer ilişkisiyle yüksek saflık ve seçicilikte ayrılmasında model bir çalışma olacağı öngörülmektedir. Yapılan son çalışmalarda aptamerlerin ve fajların monolitler üzerinde ligand olarak

uygulanması görülmektedir [6]. Aptamerler kısa, tek sarmallı yapay oligonükleotit DNA veya RNA'dır. Aptamerler, monoklonal antibadilere rakip olan hedef moleküllere spesifik bağlanma yetenekleri olan, yaklaşık 25-80 baz uzunluğundaki tek iplikli oligonükleotit dizileridir [7]. Sarmallar ve tek iplikli ilmekler oluşturma eğilimleri nedeniyle çeşitli şekiller alırlar. Bir DNA-aptamer/hedef kompleksinin ayrışma sabiti ( $K_d$ ), yüksek oranda hedef analite bağımlı olan pikomolar seviyeden mikromolar seviyeye kadar değişir. Aptamerler, antibadilere rakip olan afinitelere ek olarak, *in vitro* seçim mekanizmaları nedeniyle antibadileri elde edilmesi zor olan (metal iyonları ve ölümcül toksinler gibi) maddeler için emsalsiz reseptörlerdir. Ayrıca, oligonükleotitler olarak aptamerlerin sentezlenmesi, sıralı olarak tasarlanması, bölgeye yönelik etiketlenmesi ve uzun süreli depolanması kolaydır [8] Analitik tespit ve teşhis uygulamaları için aptamer gelişimi, Tuerk ve Gold, 1990, Ellington ve Szostak, 1990 tarafından bağımsız olarak ilk kez tanıtılmasından bu yana son birkaç yılda artmıştır. Çok yüksek afinite ve seçicilik ile bir hedef bileşene/analite bağlanabilir veya reaksiyona girebilirler. SELEX (Üssel zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi) adı verilen yinelemeli bir seçim işlemiyle *in vitro* olarak tanımlanırlar. Aptamerler ayrıca tıbbi teşhis, çevresel izleme ve biyolojik analizde kullanım için uygun hale getiren mükemmel kararlılık ve geniş uygulanabilirlik sergilerler [9].

Monolitik sabit fazlar, şüphesiz bu alanda hem temel hem de uygulamalı olarak daha zorlu araştırmaları teşvik edebilmektedir. Bir tür hidrojel olan kriyojeller, biyomedikal uygulamalar için vazgeçilmez alternatif matrisler olarak ortaya çıkmaktadır. Bir çözücü içinde çözülmüş polimerik/monomerik öncüllerin kontrollü bir kriyotropik jel oluşumunu içeren kriyojelasyon işlemiyle oluşturulurlar ve böylece "kriyojeller" adını verirler [10]. Geleneksel kromatografi matrislerine iyi bir alternatif sunarak makro gözenekli yapılara sahip kriyojeller çok düşük akış direnci sergilerler. Makro-moleküler baskı durumunda, sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon proteinleri sıcaklıklarda konformasyonel değişikliklerden korur ve yüksek seçiciliğe sahip boşluklara yeniden bağlamaya yol açar. Bu yapılar saf polimerik malzemeler olarak kullanılabilir. Katı mikro/nanopartiküller gömülmüş veya spesifik fonksiyonel gruplar elde etmek için

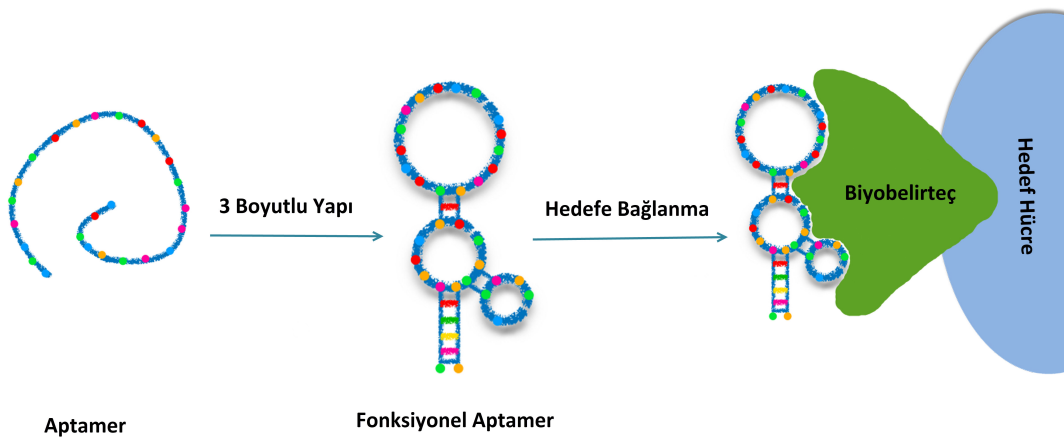
tasarlanabilirler. Buna ek olarak, kriyojellerin hazırlanması için uygun maliyetli adsorbanlar olarak görülebilir [11].

Sunulan bu tez çalışmasında, afinite tekniğinden faydalanarak farklı oranlarda Aktive Protein C (APC) spesifik DNA aptamer temelli kriyojeller sentezlenmiştir. Protein C saflaştırma ve ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen Aktive Protein C (APC) spesifik DNA aptamer kriyojeller Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), tarama elektron mikroskobu, şişme testi ve kriyojel yüzey alanı analizi ile Karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Protein C adsorpsiyonuna pH'nın, Protein C derişiminin, akış hızının, sıcaklığın, iyonik şiddetin etkileri ve tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir. 0.1 M NaCl desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Sığır serum albumin, lizozim ve Immunoglobülin G kullanılarak seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan Protein C'nin saflık kontrolü sodyum-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membran ile yapılan PC adsorpsiyon kapasitesi 89.02 mg/g bulunmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Aptamerler

1990'da piyasaya sürüldüklerinden beri, tek sarmallı DNA'nın kullanımı ve RNA aptamerleri biyoanalitik uygulamalarda sürekli olarak büyümüştür [12]. Aptamer sentezi, ligandların üstel zenginleştirme (SELEX) yoluyla sistematik evrimi olarak bilinen ve birkaç tekrarlanan bağlanma, bölme ve amplifikasyon (zenginleştirme) adımlarından oluşan bir *in vitro* işleme yapılır [12,13]. Aptamerlerin, antiadilere göre (i) daha yüksek kararlılık, (ii) uygun maliyetli üretim ve (iii) çok çeşitli hedefler gibi çeşitli faydalar göstermelerine rağmen, monoklonal antiadilere (mAb) benzer bir afinite ve özgüllük sergiledikleri kanıtlanmıştır [14,15]. Aptamerlerin molekül ağırlıkları 3 ile 20 Kda'dur. Bu immobilizasyon işlemi sırasında oluşan sterik engellerin azalmasına ve yüzey alanının artmasına neden olur. Şu anda, terminal biyotin, amin ve tiyol grupları ile işlevselleştirilmiş aptamerler ticari olarak mevcuttur. Aptamerler, adenzin gibi küçük molekülleri veya peptitler ve proteinler gibi diğer makro biyomolekülleri izole edebildikleri için büyük ölçüde tercih edilmektedirler. Aptamerlerin testlerinden, trombin bağlanması, bu ligandların yüksek potansiyelini göstermek için kullanılan model sistem olarak yaygın olarak kullanılmıştır [16-19].



Şekil 2.1. Aptamerin hedefe bağlanması [20].

Aptamerlerin benzersiz özelliklerinden yararlanan bu moleküller, afinite monolitik kromatografisinde kullanımları ve mikro ekstraksiyon tekniklerinde ayırma, saflaştırma ve/veya ön-deriştirme amaçları için monolitik desteklere dahil edilmiştir [21-22]. Aptamerler, glisidil metakrilat (GMA) temelli polimerlerin epoksi gruplarının reaksiyonları, fonksiyonelleştirilmiş silika monolitleri ile tiyol-en tıklama (thiol-ene click) reaksiyonları ve hibrit organik-inorganik silikanın terminal aminiyle reaksiyon yoluyla monolitik kolonlar üzerinde immobilize edilmiştir [15]. Bu nedenle, proteinlerin ayrılması için ilk aptamer takılı monolitik kolon, 2008'de Le's grubu tarafından kapiler formatta (85 mm 100 mm i.d.) hazırlanmıştır [21-22]. Bu çalışmada bir Poli(GMA-kotrimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)) monolit sentezlendi ve streptavidin ile işlevselleştirilmiştir. Streptavidin ve biotin arasındaki yüksek afinite kullanılarak sitokrom C'yi hedefleyen biyotinlenmiş bir DNA aptameri immobilize edilmiştir. Bu kolon, Sitokrom C ve Trombin'i güçlü bir şekilde bağlayarak, karşılıklı ayrılmalarını da sağlamıştır. Kolonda seçici olarak yakalanan ve konsantre edilen proteinler, mobil fazın iyonik kuvveti artırılarak kolayca ayrıştırılmıştır.

Başka bir çalışmada, Han ve ark. [23] bir poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) HPLC monolitik kolon, termal olarak başlatılan radikal polimerizasyon ile sentezlediler. Etilendiamin ve glutaraldehit ile modifiye edilen monolitik kolona 50-NH<sub>2</sub> etiketli anti-lizozim aptamere kovalent olarak bağlanmasını aldehit grupları sağlamıştır [24]. Geliştirilen destek materyal, iyi bir seçicilik ve kararlılık ile yumurta beyazından lizozim ekstrakte edilmiştir. Yine başka bir çalışmada, tiyol (-SH) grubu ve altın nanopartiküller (AuNP) arasındaki yüksek afinite Chen ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [25]. Burada, insan a-trombinin insan plazmasından spesifik olarak zenginleştirilmesi ve saptanması için aptamer işlevselleştirilmiş hidrofilik polimer monolitinin yeni bir türü geliştirilmiştir. 5' terminalinde modifiye edilmiş tiyol grubu ile insan a-trombin aptameri, altın nanopartiküller (AuNP'ler) ile modifiye edilmiş poli(glisidil metakrilat-ko-poli(etilen glikol) diakrilat) monolitik kolon üzerinde immobilize edilmiştir. Bağlama kapasitesi 277.1 µmol/L olarak rapor edilmiştir. Elde edilen afinite monolitik kapiler kolon, önemli bir verimlilik kaybı olmaksızın 100 defa yeniden kullanılabilir.

Organik polimerlere ek olarak, silika monolitleri aptamerlerle (genellikle "tiyol-en" tıklama kimyası yoluyla) fonksiyonelleştirilmiştir ve okratoksin A (OTA) veya trombin gibi farklı analitleri seçici olarak ekstrakte etmek için kullanılmıştır. Örneğin, Marechal ve ark. [26] bir silika monolitinin yüzeyine viniltrimetoksisilan ile modifikasyonu sonrası tiyol grupları ile modifiye edilmiş bir aptamer tutturulmuştur. Aptamer-fotoklikli silika monolitten oluşan kapiler, OTA'nın ayrılması için kullanılmıştır. Bira ve beyaz şarap numunelerinde 2.0 mg/L kadar düşük OTA derişim seviyelerinde yüksek geri kazanım ve hassasiyetle tespit edilebileceğini göstermiştir

Önceki paragraflarda açıklanan aptamerlerle modifiye edilmiş monolitlerin hazırlanması, bazıları aptamer immobilizasyonundan önce ana monolit kimyasal modifikasyonlarını gerektiren birçok aşamayı içeriyordu. Aptamer bazlı hibrit monolitlerin hazırlanmasını basitleştirmek için "tek kap (onu-pot)" stratejisi önerilmiş ve hibrit afinite monolitlerinin hızlı hazırlanmasına iyi bir erişim sağlanmıştır. Bu amaçla Chen ve ark. [27] yeni bir aptamer temelli polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) içeren hibrit afinite monoliti, serbest radikal polimerizasyon ve tiyol-en tıklama reaksiyonu yoluyla aynı anda kolay bir "tek kap" yöntemi ile hazırlanmış ve OTA'yı eş zamanlı izlemek için kullanılmıştır. Aptamer ile modifiye edilmiş monolitlerde seçici tanımayı arttırmak için, aynı yazarlar yakın zamanda, gelişmiş hidrofilik özelliklerin veya aptamer bağlanmasını teşvik etmek için etkili bağlantı reaktifleri (2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin, TCT gibi) kullanmışlardır [28]. Tüm bu destekler, spesifik OTA ayrımı için uygulanmış olup, son iki yaklaşımın bu mikotoksine karşı daha önce bildirilenlerden [27, 29, 30] daha iyi bir spesifik tanıma olduğunu göstermiştir [31].

### **2.1.1. SELEX Tekniğı**

Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX Üssel zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi) Ellington&Szostak (1990) ve Tuerk&Gold (1990) iki araştırma grup tarafından bağımsız olarak ortaya çıkmıştır. O zamandan beri çok sayıda değişiklik ve iyileştirme geçirmiştir. Geleneksel SELEX, iyi tanımlanmış bir teknolojidir [32]. Bu yöntemi kullanarak "Aptamer" üretimi birkaç haftadan bir aya kadar sürer. Spesifik olarak aptamer seçimi için

genellikle kimyasal olarak sentezlenmiş bir oligonükleotid kütüphanesi kullanılmaktadır. Bu kütüphane, genellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sırasında primerleri yakalamak için kullanılan, kısa sabit bölgelerle çevrili rastgele bölgede 60'a kadar oligonükleotit içerir. İstenen aptamerin tipine göre geleneksel SELEX sırasında birkaç seçim adımı uygulanır. Kimyasal olarak sentezlenmiş DNA kütüphanesi ile hedef analitler bir araya getirilerek Spesifik DNA aptamerleri seçimi gerçekleştirilir. Daha sonra bağlanmamış bileşikler ortamdaki uzaklaştırılır. Hedef analit/DNA kompleksi ayrılır. PCR ile serbest bırakılan DNA dizileri çoğaltılır ve ek-seçim turu gerçekleştirilir. Spesifik RNA aptamer seçiminde ise *in vitro* transkripsiyon ve ters transkripsiyon adımları dahil edilerek gerçekleştirilir. Böylece, kimyasal olarak sentezlenmiş bir DNA kütüphanesi, DNA aptamerlerine benzer bir seçime tabi tutulan bir RNA kütüphanesine kopyalanır. Çoğaltılmış DNA molekülleri, RNA'ya geri kopyalanır ve yeni bir seçim turu baştan başlar. Spesifik aptamerlerin yüksek afinitiyeye sahip olmaları için genellikle 20'ye kadar seçim turu gerçekleştirilmektedir [32-33].

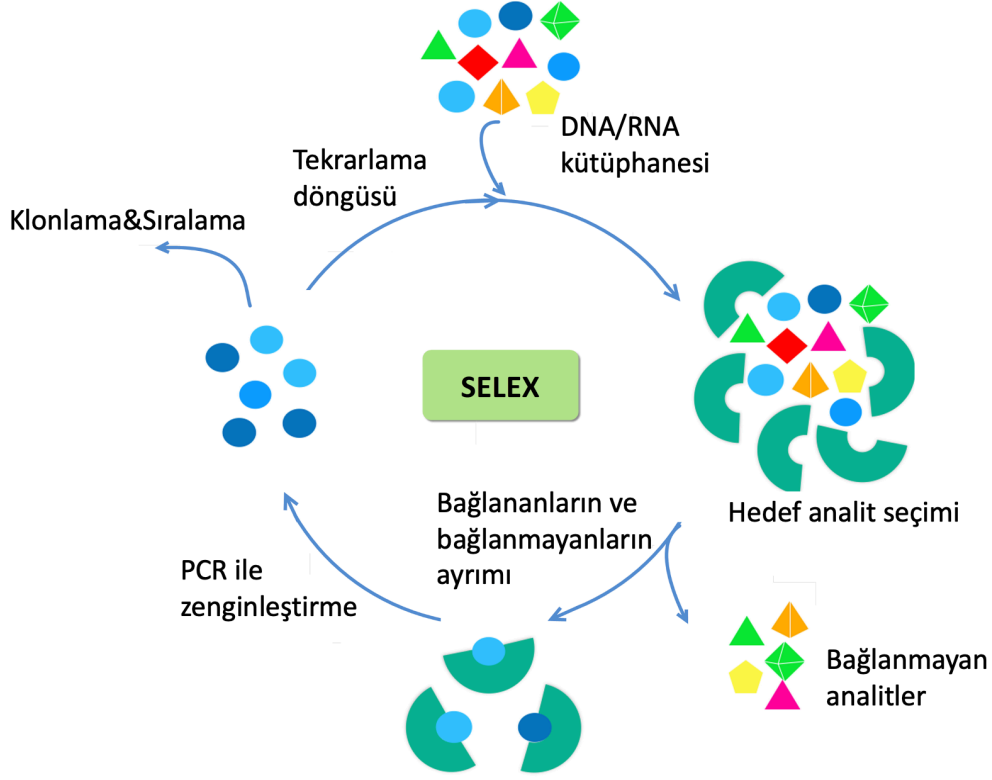
Bir laboratuvar çalışmasında kurulacak bir SELEX protokolü seçilirken, aşağıdakiler gibi çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır: RNA ile çalışmak için tasarlanmış alanın mevcudiyeti (genellikle RNA aptamerleri tercih edilir), aptamer hazırlığı için mevcut ekipman, test ve arzu edilen SELEX modifikasyonlarına, elde edilen aptamerlerin tercih edilen  $K_d$ 'sine, hedefin doğasına, seçilen SELEX protokolünün zaman ve maliyet verimliliğine, seçilen aptamerlerin SELEX sonrası modifikasyon ve saflaştırma vb. ihtiyacına göre değişir. Böylece, bir seçim sürecini başlatmak için, araştırmacılar yaklaşık 1015 diziden oluşan devasa bir DNA oligonükleotid kütüphanesini sentezlemek zorundadır [34]. Çoğu zaman, spesifik RNA aptamerleri, daha karmaşık üç boyutlu yapılara katlanabilme yetenekleri nedeniyle DNA'lara göre daha fazla tercih edilmektedir. Bu durumda, ilk DNA kütüphanesi, yalnızca üretim maliyetini değil, aynı zamanda uzunluğunu da artıran *in vitro* transkripsiyon yoluyla RNA'ya dönüştürülmelidir.

Aptamerlerin tasarımında seçim süresini en aza indirmek için, araştırmacılar SELEX işleminin otomasyonunu bile sunan birkaç SELEX modifikasyon yöntemi geliştirilmiştir [35-36]. Otomatizasyon tekniği ile aptamer seçimi önemli avantajlar sağlayabilir ve büyük ölçekli yeni aptamerlerin üretimini mümkün kılar dahası seçim süresini kısaltabilir. Ancak bu tür otomatik seçimi sağlayan esnek cihazlar

henüz ticari olarak üretilmemiştir, dolayısıyla her araştırma grubunun bu tür cihazları kendi başına üretmesi gerekir ki bu da zahmetli ve pahalı bir işlemdir.

SELEX tekniğinin bir diğer önemli rolü, seçilen aptamerlerin sahip olduğu afinitesidir. SELEX protokolünün çeşitli modifikasyonları, pM ila mM derişimleri arasında değişen  $K_d$  değerlerine sahiptir ve elde edilen aptamerlerin farklı afiniteleri sağlar [37-39]. Aptamerlere pM ve nM derişimlerinde  $K_d$  sağlayan SELEX modifikasyonları genellikle tercih edilse de, mM  $K_d$ 'li aptamerler üreten SELEX protokolü, aptamer seçimi için zaman ve maliyet verimliliği sınırlayıcı faktörler olduğunda bir seçim yöntemi olabilir. Aptamer ve SELEX'in Andrew Ellington ve Larry Gold tarafından bağımsız olarak tanımlanmasından bu yana neredeyse 30 yıl geçti. Aptamerlerin büyük avantajlarına dayanarak, terapötik ve analitik araçlar olarak aktif olarak uygulanan çeşitli hedefler için çok sayıda izole aptamer olmuştur. Aptamerler veya SELEX ile ilgili 2.000'den fazla makale yayınlanmış olup, aptamerlerin geniş kullanılabilirliğini ve uygulanabilirliğini doğrulamaktadır. SELEX yöntemleri, otomasyon dahil olmak üzere emek ve zaman açısından daha verimli yöntemlerle daha yüksek afinite ve seçiciliğe sahip aptamer izolasyonunu sağlamak için yıllar içinde değiştirilmiş veya yeniden oluşturulmuştur. Başlangıçta aptamerlerle ilgili çalışmaların çoğu, vücutta fizyolojik işlevleri olan protein hedeflerine ve bunların terapötik ajanlar veya teşhis için reseptörler olarak uygulamalarına odaklanmıştır [38].

Bir hedefin türü ve saflığı da aptamer seçimi için kritik öneme sahiptir. Genellikle, SELEX hedefleri, prokaryotik veya ökaryotik hücrelerde ekspresyon ve ardından kromatografi saflaştırmasıyla elde edilir. Bu, ikinci hücrelerde translasyon sonrası modifikasyonların olmaması nedeniyle ortaya çıkabilir [40]. Örneğin, aptamer üretimi için kullanılan bir süspansiyonda ölü hücrelerin varlığı, bu hücreler tarafından oligonükleotitlerin spesifik olmayan alımına veya bağlanmasına yol açarak tüm seçim sürecini olumsuz yönde etkilemektedir [41]. Cansız hücrelerin uzaklaştırılması için mikro/nanopartüküller olası bir çözüm yolu olmaktadır. Bu uzaklaştırma yöntemi ile hücre-SELEX yoluyla üretilen spesifik olmayan aptamerlerin sayısını azaltmaya yardımcı olabilir. Sonuç olarak uygun maliyetli alternatif yöntemlerin geliştirilmesi spesifik olmayan aptamerlerin sayısını azaltmak için gereklidir.



Şekil 2.2. Genel SELEX yönteminin şematik gösterimi [42].

### 2.1.2. Aptamer ve Antibadi Arasındaki Farklılıklar

Aptamerler genellikle protein hedeflerini tanımak için olağanüstü seçici molekül olarak antibadilerle karşılaştırılır. Bu nedenle, bu iki özel afinite ligandının sahip oldukları özellikleri analiz etmek ve daha sonra performanslarını değerlendirmek afinite adsorbentleri olarak karşılaştırmayı sağlar. Fonksiyonel bir bakış açısıyla, DNA veya RNA aptamerleri, düşük nanomolardan pikomolar aralığa ayrışma sabitleri ile antibadilere kıyasla nispeten benzer ligandlar olarak tanımlanır veya daha yüksek proteinleri hedeflemek için afiniteler sergiler [14]. Antibadiler proteinlerdir; ham ekstraktlarda sıklıkla bulunan proteazlara duyarlıdır. Asidik koşullar, pH'ya bağlı olarak çoğu zaman geri dönüşümlü olan kısmi denatürasyona neden olabilir, aynı zamanda antibadi agregasyonuna da katkıda bulunabilir. Ayrıca antibadiler, ağır ve hafif zincirlerden oluşan yapılardır.

Başka bir karşılaştırma, antibadilerin ve aptamerlerin üretim şeklidir. Bir antibadi ligandının seçimi, en uygun antibadisi üretebilen hibridoma hücre taraması ile gerçekleştirilir. SELEX metodu ile bu seçim işlemi doğrudan karşılaştırılabilir.

Moleküler tanıma işlemi, antibadi taraması ile fizyolojik koşullar altında gerçekleştirilirken, aptamerlerin seçimi, organik çözücülerin varlığı da dahil olmak üzere çeşitli fizikokimyasal koşullar altında gerçekleşebilir [43]. SELEX protokolü çok yönlüdür. Bu sayede, antibadi temelli ligandlarla protein-aptamer ayrışmasının durumunun belirlenmesine de izin verir. Aksine, immünoafinite kromatografisindeki elüsyon çoğu zaman asidik sulu tamponlar kullanılarak elde edilir. Hücre kültürü ile bir antibadi üretimi son derece karmaşıktır. İzole edildikten sonra bir dizi kromatografik işlemle ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması gerekir. Küresel olarak, hücre taraması, antibadi üretimi ve katı bir desteğe bağlanmadan önce saflaştırma, belirli bir immünoadsorbentin hazırlanması için çok zahmetli adımlardır [44,45]. Bu işlemler, aptamer ligandları için bir avantajdır ve genel nihai ligand maliyetlerini etkiler.

Song tarafından aptamerlerin antibadilere karşı diğer avantajları tartışılmıştır [46]. Araştırmacılar tarafından üretilen aptamerler için önemli bir diğer özellik, antibadi denatürasyonunun geri dönülemez olduğu gerçeğine karşı, tekrarlanan denatürasyon-renatürasyon döngüsünden sonra yapılarını korudukları için kararlılıklarıdır. Ayrıca, bozunma enzimlerine (örneğin; nükleazlara) karşı kararlılıkları, çeşitli kimyasal reaksiyonlarla ve kimyasal modifikasyonlarla arttırılabilir [47].

Antibadilere göre yukarıda tarif edilen tüm avantajlardan dolayı, aptamerler afinite kromatografisi uygulamaları için oldukça iyi uyarlanmış ligandlar olarak görünmektedir. Antibadilerden daha küçük yapılarda olsalar bile oligonükleotitler nispeten büyüktür ve proteinler için yüksek bağlanma kapasitelerine uygun değildir. Küçük molekül yapısında aptamerlerin seçilmesi gerekir. Antibadiler 150-160 kDa ve 10-40 kDa kadar aptamerlerden çok daha büyüktür ve proteinlerin etkileşimi için büyük bağlanma kapasitesine sahip değildir [48-50].

Afinite kromatografi adsorbentlerinin hazırlanmasına ilişkin önemli bir konudur. Hedef protein ile optimize edilmiş bir kenetlenme için ligandın doğru yönelimi önemlidir. Bu bağlamda, en yüksek antibadi tanıma kapasitesini korumak için, antibadinin doğru yönlendirilmiş bir hareketsizleştirilmesi önerilmiştir. Yaklaşım, geçici aldehit grupları oluşturan, Fc fragmanının glikanının ilk hafif oksidasyonunun ve ardından birincil aminden türetilmiş katı bir destek [51] üzerinde bir reaksiyonun gerekli olduğu karmaşık bir kimyasal işlemi içermektedir

[52]. Antibadinin doğru oryantasyonunu korumak için başka girişimlerde bulunulmuştur. Örneğin, katı yüzeyler üzerinde antibadilerin bölgeye özgü hareketsizleştirilmesine yardımcı olmak için Protein A'nın kullanılması verilebilir [53-55]. Aksine, iki terminal ucundan birine yerleştirilmiş bir aracı içeren aptamer, tanıma odaklıdır ve proteinler için afinite kromatografisinde rekabetçi bir avantaj sağlamaktadır.

Kromatografi yönteminde yükleme, elüsyon ve yıkama/rejenerasyon aşamaları kritik noktalardır. Yüklenen ham protein özütünde, olası bozunma enzimlerinin (nükleazlar veya proteazlar) varlığı, sırasıyla aptameri veya antibadi ligandlarını aşamalı olarak hidrolize edebilir. İmmünoadsorbentler söz konusu olduğunda, ham özütlerde proteazların potansiyel varlığı, bunun sonucunda performansın bozulmasıyla birlikte antibadinin bütünlüğüne zarar verir.

Protein-ligand kompleksi elüsyon adımı hafif fizikokimyasal koşulların kullanılmasını gerektirir. İmmünoadsorbentler için çoğunlukla asidik pH tamponları kullanılır; bu elüsyon adımı, antibadi ligandının çok az geri dönüşümlü denatürasyona uğramasına neden olur. Aptamerler için en yaygın elüsyon adımı şelatlama ajanlarını içeren tamponlarla yıkamaktır ve bu yöntem ile aptamer-protein kompleksini kararlı kılan kalsiyum uzaklaştırılır. Bu desorpsiyon ajanı, hem spesifik afinite ligandı hem de hedef proteini için zararlı olmayan çok hafif bir yöntemdir [56-57].

Diğer bir kritik aşama, temizleme amaçları için ayırma döngüsünün sonunda ve spesifik olmayan tüm adsorbe olmayan materyalleri ortadan kaldırmak için gerekli olan temizleme -afinite adsorbent'in rejenerasyonudur. Sıvı kromatografide bu işlem için en popüler kimyasal madde, 0.1 M ila 1.0 M arasında değişen bir derişimde sodyum hidroksittir (NaOH). Çok sayıda safsızlığı gidermek için çok etkili olmasına rağmen, kostik çözeltiler, afinite ligandlarına karşı çok agresiftir. Antibadiler bu tedavilere karşı dayanıklı değildir ve temizlenmesi sorunludur. Bununla birlikte, RNA aptamerleri alkali koşullara duyarlıdır, ancak farklı kimyasal yollarla stabilize edilebilirler [58]. Çizelge 2.1'de aptamer ve antibadi ligand ve afinite kromatografisinin ayırma aracı olarak karşılaştırmalı özellikleri verilmektedir [59].

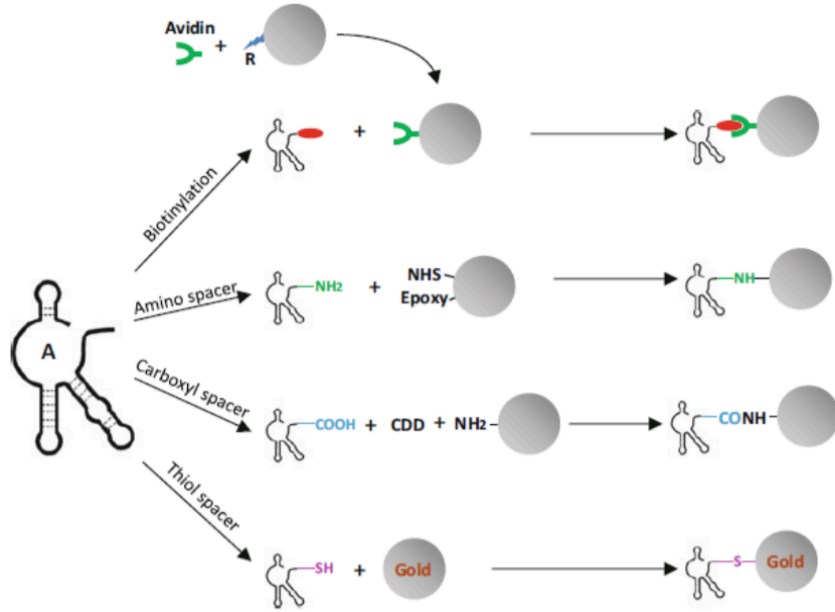
Çizelge 2.1. Aptamer ve antibadi ligand ve afinite kromatografisinin ayırma aracı olarak karşılaştırmalı özellikleri [59].

	Aptamer		Antibadi	
	Avantajları	Dezavantajları	Avantajları	Dezavantajları
<b>Serbest ligand</b>	Seçmesi kolay	Kimyasal modifikasyon	İyi bilinen özellikler	Yüksek moleküler kütle
	Hazırlanması kolay	Katlama tekrarlanabilirliği		Yüksek özgüllük
	Kısıtlı moleküler ağırlık	RNA aptamerlerinin kararsızlığı	Nötr moleküller	Proteazlara duyarlı
	Yüksek spesifik özellikler	RNA aptamerlerinin stabilizasyonu	Nükleazlara karşı stabil	Deamidasyon ve oksidasyon
	<i>In vitro</i> seçim	Nükleazlara duyarlı	Hücre kültür ile üretim	<i>In vivo</i> seçim
	Kimyasal sentez ile üretim	Asidik moleküller		Geniş saflaştırma prosesleri
	Saflaştırma kolaylığı	Zayıf hidrofobik etkileşimler	Proteazlara duyarlı	Zor kimyasal modifikasyonlar
	Proteazlara karşı dayanıklı			Sıcağa karşı kararsız immünojenik etki
	Kolay kimyasal modifikasyonlar			
	Termostabil (Isıl kararlı)			
İmmünojenik etki yok				
<b>Afinite adsorbent</b>	Yüksek bağlanma kapasitesi	Tekrar katlanma hataları	İyi bilinen teknoloji	Kısıtlı ligand yoğunluğu
	Sert yıkama koşullarında kararlı	Nükleaz duyarlılığı	Kolay immobilizasyon	Düşük Bağlanma kapasitesi
	Kolay ligand oryantasyonu	NSB'yi önlemek için yıkama tanımı	Salınan malzemelerin kolay tayini	Sert yıkama koşullarında kararsız
	Kolay immobilizasyon	Elektrostatik etkiler	Sabit elüsyon koşulları	Zor ligand oryantasyonu
Yönetilebilir elüsyon koşulları	Kısıtlı ligand yoğunluğu			

### 2.1.3. Aptamer Ligand

“Aptamerler” terimi oligonükleotitlere dayanan protein olmayan ve çok umut verici bir afinite ligand kütüphanesidir. Bunlar çeşitli yapılara kendiliğinden katlanan kısa tek sarmallı RNA veya DNA oligonükleotitleridir, böylece protein hedefleri için yüksek afinite ve spesifikliğe sahip alanlar yaratan benzersiz üç boyutlu şekillere sahiptir. Elektrostatik etkileşimleri, hidrofobik etkileşimleri, hidrojen bağı, Van der Waals kuvveti ile yüksek düzeyde afinite ile seçilen hedef protein epitoplarına kenetlenebilirler. İkincil ve üçüncül yapıları olan aptamer örnekleri, Aptamer afinite ligandları, tuzlar, küçük moleküller, proteinler, karbonhidratlar, hücreler ve virüsler gibi her türlü hedef için büyük rastgele kütüphanelerden alınabilir. Teşhis, terapötik uygulamalar, proteomik, biyosensörler ve kromatografik uygulamalar gibi çeşitli moleküler tanıma alanlarında, yüksek seçicilik dereceleri ve ayarlanabilir ayrılma sabitleri gibi diğer ligandlara göre avantajları sayesinde kolay uygulanırlar. Aptamer temelli afinite ligandları, çok büyük oligonükleotit kütüphanelerinden tanımlanır ve sekans belirlendikten sonra, doğrudan kimyasal sentez ile düşük bir maliyetle üretilirler.

Aptamerler genellikle daha küçük bir moleküler boyutuna sahip olsada yüksek seçiciliklerinden dolayı aşırı kromatografik koşullarda iyi bir kararlılık gösterirler, tersinir denatürasyon gibi diğer bazı avantajlara sahip antibadilerle karşılaştırıldığında, proteazların varlığında da kararlıdır ve daha fazla kimyasal modifikasyona uyarlanabilir. Aptamerler toksik değildirler, nispeten düşük maliyetle üretilebilirler ve antibadi ligandlarında olduğu gibi immünojenisite problemleri göstermezler. Ayrıca, katı destekler üzerinde yönlendirilmiş bir şekilde hareketsiz hale getirilebilirler. Birçok özelliklerine rağmen, bugüne kadar sadece aptamer ligandlarını içeren sınırlı sayıda protein afinite kromatografisi yayınlanmıştır. Bununla birlikte, yayınlanan makalelerden ve araştırma laboratuvarından elde edilen sonuçlar oldukça iyidir [60]. Şekil 2.3’de aptamer temelli afinite kromatografisi yöntemlerinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. Aptamer temelli afinite kromatografisi yöntemleri [59].

## 2.2 Protein Saflaştırılması

Proteinler, besleyici işlevleri ve insan sağlığına faydaları nedeniyle ilgi çekicidir. Proteinlerin ayırma ve saflaştırma yöntemi, biyokimya, tıp ve gıda sektöründe oldukça ilgi görmektedir. Protein saflaştırması için yaygın olarak kullanılan teknikler ultrafiltrasyon, çöktürme, santrifüjleme kromatografi, ve diyaliz olup, zaman alıcı ön işlemler gerektiren, pahalı enstrümantasyon veya yetenekli operatörler gibi bazı sınırlamaları vardır. Manyetik ayırma, geleneksel olanlarla karşılaştırıldığında manyetik nanopartikülleri kullanarak çeşitli avantajlara sahip olan eski ama aynı zamanda gelişmekte olan bir tekniktir. Zaman kazandıran, ölçeklenebilir, hassas, kolay otomatikleştirilmiş ve ham numunelerden hedef bileşikleri uzaklaştırmak için doğrudan kullanılabilir. Protein saflaştırılması için manyetik nanopartiküller genellikle hedef proteine afinitesi olduğu kanıtlanmış ligandlarla (örneğin afinite veya yapay afinite ligandı, iyon değişim grubu) hareketsizleştirilir [61]. Monolitik kolonlar bir tür kriyojeldir ve süpermakropor türleri, kısa kalma süresi, kısa difüzyon yolu ve düşük basınç düşüşü gibi birçok avantajı ile protein saflaştırması için özel bir adsorban grubu oluşturur [62].

### 2.3. Aktive Protein C

Aktive Protein C (APC), aktive olmayan öncüsü Protein C (PC) 'den türeyen bir serin proteaz olup, Va ve VIIIa faktörlerini inaktif ederek güçlü bir doğal antikoagülan görevi görür [63]. Normal Aktive PC üretimi, trombin, trombomodulin, PC ve endotelial hücre PC reseptörünün (EPCR) endotelial hücrelerin yüzeyinde hassas bir şekilde toplanmasına bağlıdır. PC ve Aktive PC'nin obezite, pnömoni, yayılmış intravasküler pıhtılaşma, sepsis, kutanöz yara iyileşmesi, preeklampsi veya kronik böbrek yetmezliği gibi diğer klinik durumlarla ilişkili olduğunu göstermiştir [1]. Ayrıca Aktive PC, pıhtılaşma sistemi içinde bir geri besleme inhibisyonu sağlayan bir plazma serin proteazdır. Diyabetik hastalarda düşük APC düzeyleri, varisler ve karotis aterosklerozu gibi vasküler komplikasyonlarla ilişkilidir [64]. APC'nin sitoprotektif ve antikoagülan özelliklerinin fonksiyonel olarak ayrılması, APC bazlı terapötik yaklaşımların kronik hastalıklarda adaptasyonuna yönelik önemli bir adımdır. PC yolunun genetik modülasyonunun pıhtı oluşumu, fibrinoliz ve fibrinojenoliz üzerindeki etkilerini anlamak için murin travma kanama modelinde APC'nin rolünü mekanik olarak doğrulamaların amaçlanması gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır [65]. Protein C vücudun ev sahibi savunma sistemlerinin, doku homeostazını korumak ve hem yabancı cisimlerden hem de konakçıdan gelen hasarı en aza indirmek için gelişen önemli bir makromoleküldür. Protein C'nin insandaki fonksiyonları hakkındaki ilk temel bulgular insan kalıtsal eksikliklerinin olduğu özellikle şiddetli Protein C eksikliği, agresif olarak tedavi edilmedikçe ölümcül olan yenidoğan purpura fulminansına neden olmaktadır. Ayrıca, perinatal ölümcüllüğe neden olur. Kısacası, klinik ve murin çalışmalarından elde edilen sonuçlar, protein C'nin temel fizyolojik rollerini antitrombotik ve antiinflamatuvar bir faktör olarak belgelemektedir. İnme nöronal hasar APC tarafından büyük ölçüde azaltılır. APC travmatik beyin hasarını takiben beyin hasarını azaltır. Hücre sinyal mekanizmaları APC'nin nöroprotektif aktivitelerine aracılık eder. Tüm bunlardan anlaşılacağı üzere Protein C saf bir şekilde doğal yoldan eldesi insan sağlığı için önemli olmakla birlikte teröpotik ilaçlarda ve analizlerde bir etmenddir. Protein C, birden fazla alandan oluşan serin proteazın K vitaminine bağımlı bir proenzimidir. Amino asit dizisi ve etki alanı yapısı, diğer K vitaminine bağımlı serin proteaz öncüllerine, faktör VII'ye (kimlik% 41), faktör IX'a (kimlik% 38) ve faktör X'e (kimlik

% 39) benzerdir. Faktör VII, plazmada 50 kDa'lık tek zincirli bir glikoproteindir. Faktör IX, 55 kDa'lık tek zincirli bir glikoproteindir. Faktör X, hafif zincir (16.2 kDa) ve ağır zincir (42 kDa) içeren 58 kDa'lık iki zincirli bir proteindir. İndirgeyici koşullar altında Protein C, SDS-PAG'deki faktör VII ve IX'dan kolayca ayırt edilir, çünkü iki zincir halinde göç eder. Protein C'ye karşı monoklonal ve poliklonal antibadiler, Protein C'yi faktör X ve diğer K vitaminine bağımlı proteinlerden ayırır. İnsan Protein C'sine karşı tavşan poliklonal antibadilerden edilebilir ve monoklonal antibadiler çeşitli ticari kaynaklardan elde edilebilir [66].

Bir pıhtılaşma inhibitörü olan Protein C (PC), insan pıhtılaşma mekanizmasının en önemli antikoagülan ve antitrombotik ajanıdır (insan kanında 4 µg/mL konsantrasyonda). İnsan PC'si plazmada (zimojen olarak) dolaşır. Endotel hücrelerinin zarlarında trombomoduline bağlı trombin tarafından spesifik bölünme ile aktive edilmiş PC'ye dönüştürülür. Aktive protein C (APC), PC yolunun anahtar enzimidir [67-70]. Bu nedenle, PC yolundaki dikkat ve gerçek zamanlı, hızlı, düşük tespit limiti, uygun maliyetli ve güvenilir bir yaklaşımla izlenmesi nedeniyle APC'nin tanımlanması için oldukça hassas ve seçici tespit yöntemleri geliştirilmektedir [71].

PC'nin kan pıhtılaşmasının düzenlenmesindeki fizyolojik önemi, hem kalıtsal PC eksikliği hem de düşük dolaşımdaki APC seviyeleri ile ilişkili venöz tromboembolizm (VTE) riskindeki artışın tanımlanmasından kaynaklanmaktadır. Kofaktörü Protein S (PS) tarafından aktive edilen PC, kanın pıhtılaşmasını düzenlemekte ve trombosit oluşumu engellenmektedir [72].

Protein C, genetik hafif veya şiddetli eksiklikleri sırasıyla venöz tromboz veya neonatal purpura fulminans riski ile bağlantılı olan K vitaminine bağlı bir plazma proteini zimojendir. Geçmiş on yıllardaki çalışmalar, aktive protein C'nin (APC), trombin oluşumunu azaltmak için faktörleri (F) Va ve VIIIa'yı etkisiz hale getirdiğini göstermiştir. APC ile ilgili daha yeni temel ve klinik öncesi araştırmalar, APC'nin gen ekspresyon profili değişiklikleri, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik aktiviteler ve endotel bariyer stabilizasyonunu içeren doğrudan sitoprotektif etkilerini karakterize etmiştir. Bu eylemler genellikle endotel hücre proteini C reseptörü (EPCR) ve proteaz aktive reseptör-1 gerektirir. Bu doğrudan sitoprotektif etkiler nedeniyle, APC, murin endotoksemisi ve şiddetli sepsis modellerinde ölüm oranını (mortalite) azaltır ve murin iskemik inme modellerinde nöroprotektif

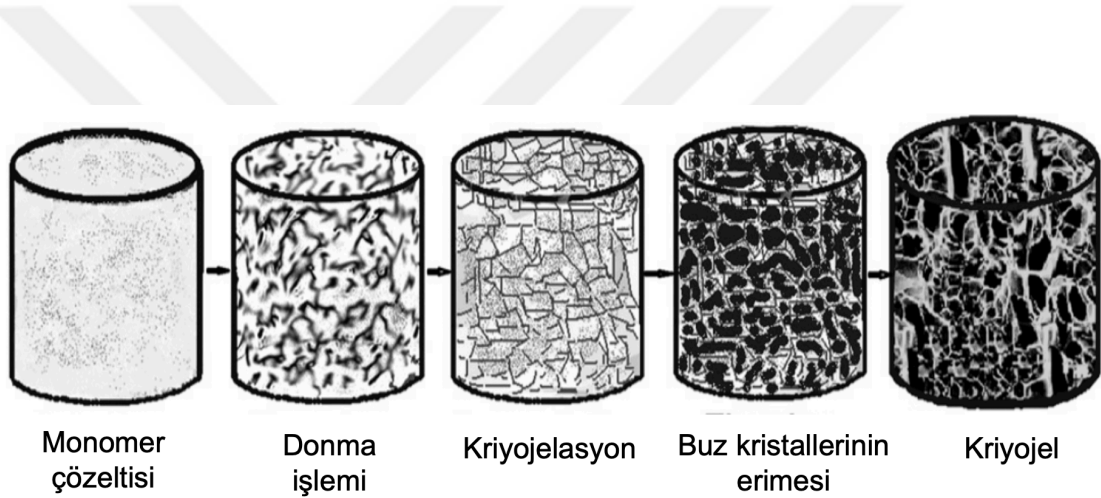
faydalar sağlar. Dahası, APC şiddetli sepsisli hastalarda ölüm oranını azaltır. APC'nin çeşitli hücre tipleri üzerindeki doğrudan etkilerine ilişkin mekanizmalar hakkında açıklığa kavuşturulması gereken çok şey olmasına rağmen, APC'nin antitrombotik etkisini belirleyen moleküler özelliklerinin, sitoprotektif eylemler sağlayanlardan kısmen farklı olduğu açıktır. Çünkü biz, antikoagülan veya sitoprotektif aktiviteleri seçici olarak azaltan veya koruyan rekombinant APC varyantları tasarladık. Çeşitli terapötik uygulamalar için bu tür APC varyantları nispeten gelişmiş seviyelerde sitoprotektif veya antikoagülan aktivite sağlayabilir. Antikoagülan etkisi azaltılmış ancak normal sitoprotektif etkileri olan APC varyantlarının, hücreler üzerindeki doğrudan sitoprotektif etkilere dayalı mortaliteyi azaltırken, zayıflatılmış antikoagülan aktivite nedeniyle kanama riskini azaltma vaadini taşıdığını tahmin ediyoruz [73]. Stenflo protein C'yi sıgır plazmasından saflaştırmıştır. Aktive protein C trombin tarafından proteolitik aktivasyon ile protein C zimojeninden üretilir. Plazmadaki protein C derişimi 70 nM'dir, aktive formu APC ise 40 pM'dir [74-75].

#### **2.4. Kriyojeller**

Çeşitli polimerik, protein ve kompleks polimer/protein sistemleri, doğal malzemelerdeki yüksek su içeriği nedeniyle "hidrojel" olarak adlandırılır. Hidrojeller sıfırın altı sıcaklıklarda sentezlenirse, bunlara "kriyojel" denebilir. Kriyojel yunancada "krio" kelimesinden gelmektedir. Anlamı soğuk veya buzdur. Bunların en tipik özellikleri birbiri ile bağlantılı makro gözenekleri ve süngerimsi morfolojiye sahip olmasıdır. Bu malzemeler, yüksek biyoyumlulukları ve doğal yumuşak dokulara benzer kauçuksu yapıları nedeniyle çok sayıda biyomedikal, doku mühendisliği, biyoreaktör, kozmetik ve farmasötik uygulamada kullanılmaktadır. Genel olarak kriyojellerin sentezlenmesinde çözücü madde olarak su kullanılır. Monomerler suda çözünerek kriyojenik formlara dönüşürler. Kriyojenik formlara dönüşme sebebi buz kristallerinin yapısal özellikleri yüzündendir. Bunun dışında kriyojelleri oluşturmak için dioksan ve formamid gibi sistemler de kullanılabilir. Kriyojeller, yarı dondurulmuş koşullar altında sentezlenir, burada buz kristalleri, porojenler olarak işlev görür ve buz kristallerinin eriyiklerinde birbirine bağlı gözenekler ağı oluşturulur. Hidrojellerin aksine, kriyojeller büyük gözeneklere ( $d > 1 \text{ mm}$ ), kısa difüzyon yollarına,

genellikle iyi biyouyumluluğa ve yüksek mekanik mukavemete ve iç kısımlarındaki su tutma kapasitesine izin veren makro gözenekli yapıları ile tanımlanır [76-77].

Geleneksel kromatografi adsorbentlerine iyi bir alternatif olan makro gözenekli yapılara sahip kriyojeller, çok düşük akış direnci sergilerler. Makro-moleküler baskılama durumunda, sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon proteinleri konformasyonel değişikliklerden korur ve yüksek seçiciliğe sahip boşluklara yeniden bağlanmasına yol açar. Bu saf polimerik malzemelere katı mikro/nanoparçacıklarla doldurulabilir veya fonksiyonel gruplar elde etmek için modifiye edilebilir. Buna ek olarak, kriyojellerin hazırlanması uygun maliyetli adsorbanlar olarak görülebilir [78].



Şekil 2.4. Kriyojel hazırlama aşamaları: (i) bir çapraz bağlayıcıya sahip monomerlerin veya polimerlerin bir çözeltisi, (ii) donma, (iii) sıfır altı sıcaklıkta kriyojelasyonu ve (iv) doğal hidrasyon durumunda (v) makro gözenekli kriyojel oluşturmak üzere çözünmesi [76].

Kriyojeller genellikle  $-5$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda hazırlanır (Şekil 2.4). Monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar içeren çözelti dondurulur. Reaksiyon karışımı donarken, karışım iki ana kısımdan oluşur; buz kristalleri ve buz kristalleri arasında dondurulmamış bir sıvı mikrofaz bulunur. Donmuş olmayan bu sıvı mikrofazda teknik bir reaksiyon gerçekleşir. Buz kristalleri donma sırasında artmaya devam eder ve birbirine bağlı buz kristallerinin tamamen donmuş bir çerçevesi oluşana kadar diğer kristallerle birleşirler. Uygun bir

kriyojelasyon süresinin sonunda, donmuş kriyojel oda sıcaklığına getirilir. Buz kristalleri oda sıcaklığında erimesinden sonra, sürekli birbirine bağlı makro gözenekli polimer ağı içeren bir matris elde edilir. Oluşan gözeneklerin şeklini ve boyutunu, buz kristallerinin şekli ve boyutu belirler. Çapraz bağlayıcının tipi ve derecesi, jel oluşturucu çözeltilerin birleşimi, jelleşme sıcaklığı ve donma oranı gibi çeşitli parametreler oluşan kriyojellerin fiziksel özelliklerini etkiler. Gözenek boyutu bu değişikliklerden en fazla etkilenen parametredir. Çapraz bağlama sadece kriyojellerin sertliğini etkilemez, bu malzemelerin şişme derecesini de etkiler [77].

#### **2.4.1 Biyomoleküllerin Saflaştırmasında ve Ayrılmasında Kriyojeller**

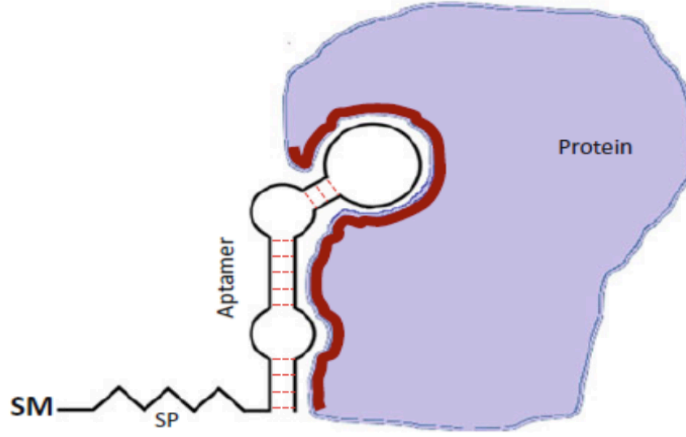
Biyomoleküllerin afinite kromatografisi ile saflaştırması ve ayrılmasında, tipik olarak spesifik tanıma özelliğine sahip bir molekül, destek matrisi olarak makro gözenekli bir kriyojelle immobilize edilir. Saflaştırılacak hedef analiti içeren çözelti karışımı uygun şartlarda kriyojel kolonundan basitçe geçirerek tamamlayıcı ligand tarafından seçici olarak yakalanır. Daha sonra hedef analitler özellikle yarışmacı bir ligand kullanılarak veya iyonik şiddet pH veya sıcaklık ayarlanarak spesifik olmayan bir şekilde elde edilir ve hedef analit saflaştırılarak elde edilir. Afinite tanınma alanları daha sonra daha fazla kullanım için denge tamponu ile yeniden dengelenebilir. Afinite saflaştırma teknikleri çok çeşitli olarak günümüzde mevcuttur. Bunlar arasında, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), boronat afinite kromatografisi ve boya afinite kromatografisi protein saflaştırmasında en çok kullanılan yöntemlerdir. Bir proteinin saflaştırılması tekniğinde: moleküler boyutu, hidrofobiklik, net yük, biyospesifik özellikler gibi biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri önemli parametrelerdir [78].

#### **2.5. Afinite Kromatografisi**

Afinite kromatografisi, moleküller ile ligandların arasındaki özel etkileşimlere dayanmaktadır. “Afinite” terimi “yakın ilişkili” anlamına gelen Latince “afinitas” kelimesinden gelmektedir [79]. Afinite kromatografisinde aptamer-protein etkileşimleri ile ilgili literatür neredeyse yoktur. Afinite ligandı olarak kullanılan bir

spesifik aptamer tanıma işlevselliği, nükleer bazların lineer dizisine yalnızca marjinal olarak bağlıdır, fakat daha da önemlisi çift sarmal bölgelerin organizasyonunun yanı sıra yüksek oranda katlanmış tek sarmallı uzantılara da bağlıdır. Bu karmaşık konfigürasyon, afinite kromatografisinin temeli olan moleküler tanıma, belirli protein epitopları üzerindeki tamamlayıcı moleküler etkileşimlerin üzerinden gerçekleşir. Bir nükleik asit ve bir protein arasında üçüncül bir yapının oluşmasını sağlayan süreç karşılaştırıldığında, tek ortak itici gücün suya maruz kalmayı en aza indirmek olduğu söylenebilir [59].

Bir DNA veya RNA molekülü sadece basit bir lineer primer yapısı değildir, aynı zamanda ikincil ve üçüncül konfigürasyonlara sahip makromoleküllerdir. Hedef proteinler için spesifik tanıma elemanı aptamer ligandlarının üçüncül yapısıdır. Spesifik DNA-Aptamerler ve proteinler arasındaki etkileşim, birkaç eşzamanlı temel etkileşim ile gelişmektedir. Örneğin proteinlerde, peptit zincirini oluşturan amino asitler arasındaki ikincil amid bağları hidrojen bağına katkıda bulunur. Amino asitlerin yan zincir grupları, çeşitlilik ve güç açısından çeşitli etkileşimleri geliştirmek için özellikle aktiftir. Bu nedenle, hedef proteinin uzaysal konfigürasyonundan sorumlu olan moleküler etkileşimlerin aptamer ile tanıma aşaması boyunca bozulmadan kalması önemlidir. Aptamer ve hedef protein arasındaki bağlar zayıf etkileşimler olarak kabul edilir. Bunlar iyon-iyon, hidrojen bağı, hidrofobik birleşmeler ve dipol-dipol olarak gruplandırılabilir, bunlar genellikle van der Waals etkileşimleri adı altında gruplandırılır. Tüm bu moleküler etkileşimler birlikte ele alındığı zaman kompleksin konformasyon enerjisini en aza indirmek için atomların veya atom gruplarının birbirlerine nasıl çekildiğini veya itildiğini açıklamaktadır. Spesifik bir aptamer ve karşılık gelen afinite proteini arasındaki etkileşimin özgüllüğünü açıklamaya çalışmak için, çoğu zaman mevcut olan üç ana etkileşim kuvvetini, yani elektrostatik etkileşimleri, hidrojen bağı ve hidrofobik ilişkileri göz önünde bulundurulur [60]. Şekil 2.5'de immobilize aptamer ve protein arasındaki moleküler kenetlenmenin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.5. İmmobilize aptamer ligand ve protein molekülü arasındaki moleküler bağlanmanın şematik gösterimi [59].

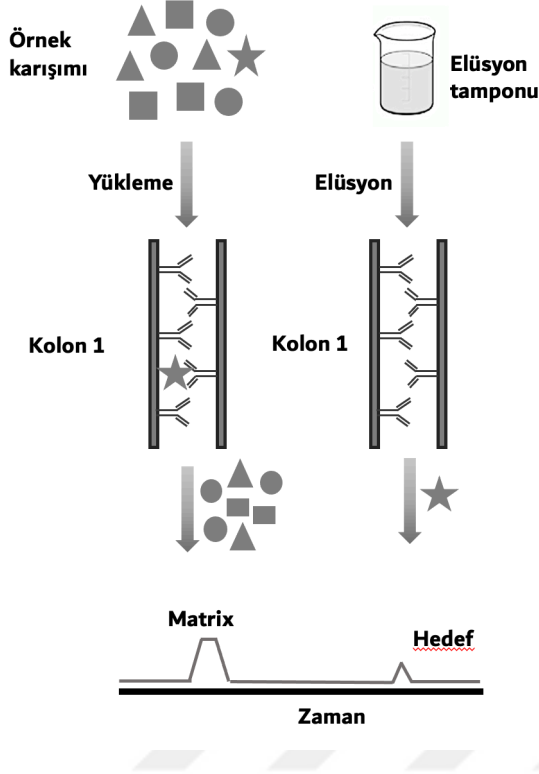
Afinite kromatografisi tekniği bir proteinin doğal veya yapay ligandları tanıma yeteneğini kullanmaktadır. Bu özellik, saflaştırılacak proteine özgü ligandın kimyasal olarak doğrudan veya bir aralayıcı vasıtasıyla bağlandığı afinite sorbentlerinin hazırlanmasından yararlanır. Proteinin ligand ile etkileşimi; özgüllüğü, moleküler eşleşmeler (ayrılacak protein ve ligand) arasındaki etkileşimin her birinin derişiminin artmasıyla ne kadar hızlı gerçekleştiğini gösteren afinite ayrılma sabitine bağlıdır. Böyle bir protein saflaştırma sisteminde birleşme oranı (ayrılma sabitinin tersi) sadece yükleme aşamasında kompleks protein ligandını hızlı bir şekilde elde etmek için değil, aynı zamanda derişimi ortamdaki hedef proteini de sifıra yakın azalır. Bununla birlikte, kompleks yakalanan proteini geri kazanmak için ayrıştırılabilir olmalıdır; bu genellikle deforme edici ajanlar ve çeşitli fizikokimyasal koşullar (pH, iyonik güç, sıcaklık) kullanılarak elde edilir. Bu temel zorunluluklardan, en kritik noktanın, her afinite kromatografisi durumu için spesifik olan uygun ligandın seçimi olduğu açıktır. Aslında iyon değişim kromatografisinin veya hidrofobik etkileşim kromatografisinin aksine, afinite sistemleri, lektin ligandları olan glikoproteinler, fosfoproteinler veya immobilize metal iyonu afinite ligandları olan fosfopeptitler gibi grup ayrımı haricinde genel uygulamalar değildir. Diğer birçok durumda, özel ligandlar özel olarak seçilmelidir. Afinite kromatografi sistemlerinin özgüllüğü göz önüne alındığında, çok sayıda farklı proteinin ayrılmasını tatmin etmek için çok büyük bir ligand panelinin mevcut olması gerektiği hemen anlaşılmaktadır. Hali

hazırda mevcut olan spesifik ligandların varlığı azdır. Biyokimyasal ve terapötik uygulamalar için özelleştirilmiş proteinler üretebilen protein ekspresyon sistemlerinin ortaya çıkmasıyla, karmaşık ortamlardan etkili saflaştırma işlemleri kaçınılmaz işlemler haline gelmiştir [60].

Afinite kromatografisi birçok biyolojik etkileşimde meydana gelen seçici ve geri dönüşümlü bağlanmadan yararlanarak belirli hedeflerin izolasyonu ve saflaştırılması için onlarca yıldır kullanılmaktadır. Bu spesifik etkileşimlerin en bilinen örnekleri, bir enzim ve substrat, bir antibiyotik ve antijen, bir hormon ve reseptör arasında meydana gelenlerdir. Afinite kromatografisi, etkileşen çiftlerden birini bir kromatografik katı destek malzemesi üzerinde hareketsiz hale getirilmesi ile tasarlanmaktadır. Destek malzeme üzerine immobilize edilen spesifik ajan "afinite ligandı" olarak adlandırılır. Karmaşık bir matris ortamında bu spesifik ligand tamamlayıcı hedef analiti seçici olarak bağlama/yakalama kabiliyetine sahiptir [81-87].

Şekil 2.6'da afinite kromatografisi için en basit ve en yaygın tasarım formayı gösterilmektedir. Bu format açma/kapama modu olarak adlandırılmaktadır [84]. Bu teknikde, öncelikle spesifik ligandı hedefi yakalayıp tutabilmesi için bir sütuna geçirmek gerekmektedir, burada bu işlem için uygulama tamponu kullanılır. Uygulama tamponu genellikle afinite ligandının tamamen aktif olduğu ve hedefe en güçlü bağlanmasına sahip olduğu pH ve iyonik gücü taklit eder [86,88]. Uygulama tamponunun varlığında, diğer numune bileşenleri çok az veya hiç bağlanma ile ayrıştırılırken hedef korunur. Güçlü bir mobil faz veya elüsyon tamponu daha sonra toplama veya analiz için hedefi serbest bırakmak üzere kolondan geçirilir. Elüsyon tamponu, bir adım değişikliği veya gradyan kullanılarak uygulanabilir. pH, iyonik kuvvet veya mobil faz bileşimini değiştirerek hedefin serbest bırakılması, spesifik olmayan elüsyon olarak bilinir [84]. Elüsyon için alternatif bir yaklaşım, hedefin yerini kitle hareketi yoluyla değiştiren rakip bir ajan kullanmaktır. Hedef sütundan serbest bırakıldığında, sistem uygulama arabelleği ile yeniden dengelenebilir ve işlem tekrarlanır. Bazı durumlarda, uygulama ve elüsyon tamponları aynı çözüm olabilir ve izokratik koşullar altında yürütülen bir yöntem sağlar. Bu son durum, hedefleri için zayıf ila orta derecede bağlanma gücüne sahip afinite ligandlarını kullanan zayıf afinite kromatografisi

(WAC) yönteminde ortaya çıkar (yani,  $10^5$ - $10^6$  M<sup>-1</sup>'den daha az birleşim denge sabitleri) [84-90].



Şekil 2.6. Afinite kromatografisi temel prensibi.

Afinite kromatografisinin seçiciliği ve basitliği, bu yöntemi birçok biyomolekül, biyo-eczacılık ve diğer ajanların saflaştırılmasında faydalı kılmıştır [81-86]. Afinite kromatografisi hem numune hazırlama hem de biyolojik, klinik ve çevresel numunelerdeki belirli hedeflerin izolasyonu veya ölçümü için analitik bir araç olarak kullanılmıştır [81-85]. Ek olarak, bu yöntem biyolojik etkileşimleri incelemek ve karakterize etmek için bir araç olarak kullanılmıştır [81,91-105].

Belirli hedefleri izole etmek için hareketsiz biyolojik ajanların kullanılması kavramı, 20. yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır [87,96,97]. Bu yaklaşımın ilk bildirilen kullanımı 1910'da Emil Starkenstein [96,98] tarafından, Michael Tswett [99] tarafından kolon sıvı kromatografisinin geliştirilmesinden sadece birkaç yıl sonra olmuştur. Starkenstein, çözünmeyen nişastayı hem durağan faz hem de

ayrılması için destek olarak kullanarak  $\alpha$ -amilazı saflaştırdığında bir enzim ile onun substratı arasında oluşan bağlanmadan yararlanmıştır [87,96,98]. Amilaz ve ilgili enzimleri izole etmek için bu genel yaklaşımı kullanarak 1920'lerden 1940'lara kadar birkaç ek çalışma yapılmıştır [56,100-103]. Toz haline getirilmiş stearik asit kullanılarak lipazın zenginleştirilmesi için enzim saflaştırması için hareketsizleştirilmiş bir substrat kullanma ilkesi benimsenmiştir [104-107].

Aynı zaman diliminde, biyolojik etkileşimlere dayalı kromatografik ayrımlar, antibadilerin saflaştırılmasına kadar genişletilmiştir [96]. 1930'ların ortalarındaki ilk çalışmalar, antibadi saflaştırması için adsorbe edilmiş antijenlere sahip kömür ve kaolin gibi destekler kullanılmıştır [108,109]. Diazo birleştirme yöntemi, 1936'da Landsteiner ve van der Scheer tarafından hapteneri tavuk eritrosit stromasına bağlamak için kullanıldı, daha sonra bu haptenerlere bağlanabilen antibadiler izole etmek için kullanılmıştır [110]. 1951'de; çalışmalarında, diazotize p-aminobenzil-selüloza birleştirilmiş BSA'yı kullanarak sığır serum albüminine (BSA) tavşan antibadileri izole etmişlerdir [111]. Bu tekniğin varyasyonları, antibadilerin saflaştırması için hareketsizleştirilmiş haptenerlerle veya enzim saflaştırması için hareketsizleştirilmiş substrat analogları veya inhibitörleri ile yapılmıştır [99]. İkinci uygulamanın örnekleri arasında, p-azofenol ile süstitüe edilmiş selüloz üzerinde mantar tirozinazının saflaştırılması ve flavin ile süstitüe edilmiş selülozlar üzerinde karaciğer flavokinaz veya diğer flavin mononükleotidine (FMN) bağımlı enzimlerin izolasyonu yer almıştır [112,113]. Selüloz türevleri ayrıca nükleik asitlerin, transfer RNA'nın ve nükleotitlerin spesifik zincirlerinin saflaştırılmasına da uygulandı. Destekler ve immobilizasyon yöntemlerinde bir sonraki büyük ilerlemeler 1960'larda meydana geldi. Bu gelişmelerden biri, bir destek olarak boncuklu agarozun geliştirilmesiydi [87,96]. Bu destek, sıvı kromatografisinde selüloz bazlı desteklerle meydana gelen mekanik stabilite sorunlarının çoğunu önlemiştir [114]. Siyanojen bromür (CNBr) immobilizasyon yöntemi ikinci büyük ilerlemedir [115]. Bu yöntem, peptitlerin ve proteinlerin protonlanmamış amin grupları aracılığıyla CNBr ile aktive edilmiş agarozla bağlanması için nispeten kolay bir yol sundu [97]. Bu iki ilerleme 1968'de Cuatrecasas, Anfinsen ve Wilchek tarafından nükleaz inhibitörlerinin boncuklu agarozla immobilizasyonu için birleştirildi ve daha sonra nükleaz saflaştırması için kullanılmıştır. Ortaya çıkan kağıt, hedef ayırma veya izolasyon için spesifik bir

araç olarak bir kolonda biyolojik bir ajan kullanan bu yöntem “afinite kromatografisi” adının verildiği ilk çalışmadır [116].

### 2.5.1. Afinite Kromatografisinde Aptamer Ligandlarının Ortaya Çıkışı

Oligonükleotitlerin afinite kromatografisi ligandları olarak ortaya çıkışı, bu ayırma teknolojisinin teknolojik gelişmelerinde tekil bir momentumu işaret eder. Aptamer terimi iki farklı kelimeden türetilmiştir: birincisi Latince “aptus” dan uygun bir şey ifade eder ve ikincisi Yunanca “mearos” kelimesinden bir parçacık anlamına gelir [33]. Böylece uyan parçacık “aptamer” oldu. Bu makromoleküllerin afinite özellikleri, keşiflerinin başlangıcından itibaren ilgi çekici görünse de afinite kromatografisine uygulamaları daha sonra geldi [33,117]. Bu Romig ve ark. [118] yazarlar, bir rekombinant hücre kültürü süpernatantından bir L-selektin-Ig füzyon proteininin saflaştırılması için kullanılan insan L-selektine karşı bir aptamer kullanımını yayınlamıştır. Bu çalışmada bir aptamer temelli afinite kromatografi kolonunun, %83'lük bir verim ile yaklaşık 1.500 kat saflaştırma derecesini artırabildiği gösterilmiştir. Daha sonra, bu teknoloji, protein saflaştırmasının aptamerlerin kullanımı ile etkili bir şekilde kolaylaştırıldığıının altını çizen son makalelere kadar yavaş yavaş gelişti [119.120]. Aptamer ligandlarına olan ilgiyi göstermek için, yıllar boyunca olağanüstü bir ilerlemeyi temsil eder. Bu veriler doğal olarak hepsini içerir.

Çizelge 2.2. Teşhis ve afinite kromatografisinde kullanılabilen aptamerler arasındaki temel farklar [59].

	Teşhis Uygulamaları	Afinite Kromatografisi Uygulamaları
Kostik işlemler altında karalılık	İlgisiz	Tekrarlanan işlemlerle kararlı
Aptamer boyutu	Çoğunlukla ilgisiz	Olabildiğince küçük
Tekrarlanan yeniden katlamalar	Gerekli değil	Gerekli
Spesifiklik	Yüksek	Yüksek

Afinite bağlanma sabiti	Yüksek	Orta ile yüksek ( $10^{-7}$ ve $10^{-9}$ mol/ml)
Uzatma kolu uygulaması	Gerekli değil	Kimyasal aşılama için zorunlu



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasal Malzemeler

Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), glycidyl methacrylate (GMA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), Protein C ve seçicilik çalışmalarında kullanılan kullanılan proteinler sığır serum albumin (BSA), lizozim (LYZ) ve immünglobülin G (IgG) Sigma firmasından temin edilmiştir (St. Louis, ABD). Aktive protein C (APC) spesifik DNA aptameri Ella Biotech (Berlin, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Amonyum persülfat (APS, %98), sodyum klorür (NaCl) ve Tetrametilendiamin (TEMED) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) ve disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2PO_4$ ), Merck firmasından temin edilmiştir (Darmstadt, Almanya).

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalar için kullanılan saf su, ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® ünitesi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma ünitesi ve iyon değişimi dolgulu kolon sistemi ile yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile artıldı. Saf suyun iletkenliği 18.2 MΩ/cm olarak kullanılmıştır.

#### 3.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Sentezi

##### 3.2.1. Spesifik DNA Aptamer Temelli Kriyojellerin Hazırlanması

Aktive PC spesifik aptamer kriyojellere immobilizasyonu öncesinde PHEMA-GMA kriyojeller şu şekilde hazırlanmıştır; 0.283 g metilenbisakrilamid 10 ml su içerinden çözünmüştür. 1.3 ml 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve 382.25 µl glycidyl methacrylate (GMA) monomer karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra çapraz bağlayıcı/monomer karışımına 25 µL Tetrametilendiamin (TEMED) ve 20 mg amonyum persülfat (APS) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım iki cam arasına dökülmüştür ve polimerizasyon -14°C donma noktası altında 24 saat boyunca gerçekleşmesi sağlanmıştır. Polimerizasyon tamamlanma saati sonunda oda sıcaklığına getirildikten sonra membranları hazırlamak için sentezlenen kriyojel disk şeklinde eşit boyutlarda kesilmiştir. Kesilen disk şeklindeki membranlar saf su ile gün boyu yıkanmıştır.

PHEMA-GMA kriyojel membranlar hazırlandıktan sonra Aktive protein C (APC) spesifik DNA aptameri immobilize çalışmalarına geçilmiştir. Üç farklı DNA aptamer derişiminde kriyojellere bağlanma işlemleri yapılmıştır. 10-50-100 mg/mL derişiminde spesifik DNA-Apt çözeltileri hazırlanmıştır. Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranları üç derişim için ayrı ayrı pH 9.8'de oda sıcaklığında kriyojel diskler ile spesifik DNA-Apt immobilize çalışmaları yürütülmüştür. Aptamer temelli kriyojeller [poli(HEMA-GMA/DNA-Apt)] başarılı bir şekilde hazırlanmıştır.

### 3.3. Karakterizasyon Çalışmaları

#### 3.3.1. FTIR Analizi

Poli(HEMA), Poli(HEMA-GMA) ve Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranları zayıflatılmış toplam yansımali Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (ATR-FTIR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile karakterize edilmiştir. KBr ile hazırlanan peletler cihaz örnek yerine yerleştirilerek  $400 \text{ cm}^{-1} - 4000 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedilmiştir.

#### 3.3.2. Şişme Testi

Sentezlenen kriyojellerin şişme derecesinin tayini için kriyojeller öncelikle dondurulmuştur ve daha sonra liyofilizatör cihazı kullanılarak 24 saat boyunca kurutulma işlemi uygulanmıştır. Kurumuş kriyojellerin tartımı yapıp, ardından saf su içerisinde bekletilmiştir ( $25^\circ\text{C}$ 'de) ve belirli zaman aralıklarında absorpladıkları su miktarları ölçülüp kriyojelin şişme karakteri ve makrogözeneklilik oranları incelenmiştir. Kriyojelin şişme derecesi ve makrogözeneklilik derecesi aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{Şişme derecesi (\%)} = (m_{\text{şişmiş polimer}} - m_{\text{kuru polimer}}) / m_{\text{kuru polimer}} \quad 3.1$$

$$\text{Makrogözeneklilik (\%)} = \frac{W_{\text{şişmiş polimer}} - W_{\text{sıkılmış polimer}}}{W_{\text{sıkılmış polimer}}} \quad 3.2$$

### **3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranların yüzey morfolojisi ve makrogözenek boyut yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir. Kuru form halindeki polimerin SEM ölçümleri Odaklanmış İyon Demeti – Taramalı Elektron Mikroskop Sistemi (FIB-SEM) TESCAN marka GAIA3 model kullanılarak karakterize edilmiştir.

### **3.3.4. Yüzey Alanı Ölçümleri (BET)**

Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranların Brunauer, Emmet ve Teller (BET) yöntemi ile yüzey alanı karakterize edilmiştir (Quantochrome, Nova 2200e, USA).

### **3.4. Protein C Adsorpsiyon Çalışmaları**

Öncelikle Protein C adsorpsiyonuna pH'nın etkisi incelenmiştir. Bu amaç için 4.0-8.0 aralığında geniş bir pH taraması yapılmıştır. Protein C ölçümleri UV-spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Adsorpsiyon deneylerinde üç farklı oranda spesifik DNA-Apt içeren Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranlar kullanarak 0.5 mg/mL- 4 mg/mL aralığında başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Daha sonra en yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip kriyojel ile sıcaklık değişiminin etkisi (4°C - 45°C), zamana bağlı değişimin etkisi ve iyonik şiddet değişiminin etkisinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Her bir adsorpsiyon çalışmalarda Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) 4 adet membran disk kullanılmıştır.

### **3.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik**

1.0 M NaCl çözeltisi Protein C'nin desorpsiyonu için kullanılmıştır. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların desorpsiyon işlemleri kesikli sistemde incelenmiştir. Protein C 1.0 M NaCl desorpsiyon çalışması 25°C sıcaklıkda 2 saat boyunca 90 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon oranı hesaplaması için Eşitlik 3.3 kullanılmıştır:

$$\text{Desorpsiyon oranı} = \frac{\text{desorprbe edilen PC}}{\text{adsroplanan PC}} \times 100$$

Eşitlik 3.3

Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi, tekrar kullanılabilirliğin belirlenmesi için art arda on kez tekrarlanmıştır. Her bir işlem sonrası başlangıç ve sonuç örnekleri 280 nm dalga boyunda UV-spektrofotometre ile ölçülmüştür. Daha sonra adsorpsiyon kapasitesindeki değişim hesaplanmıştır.

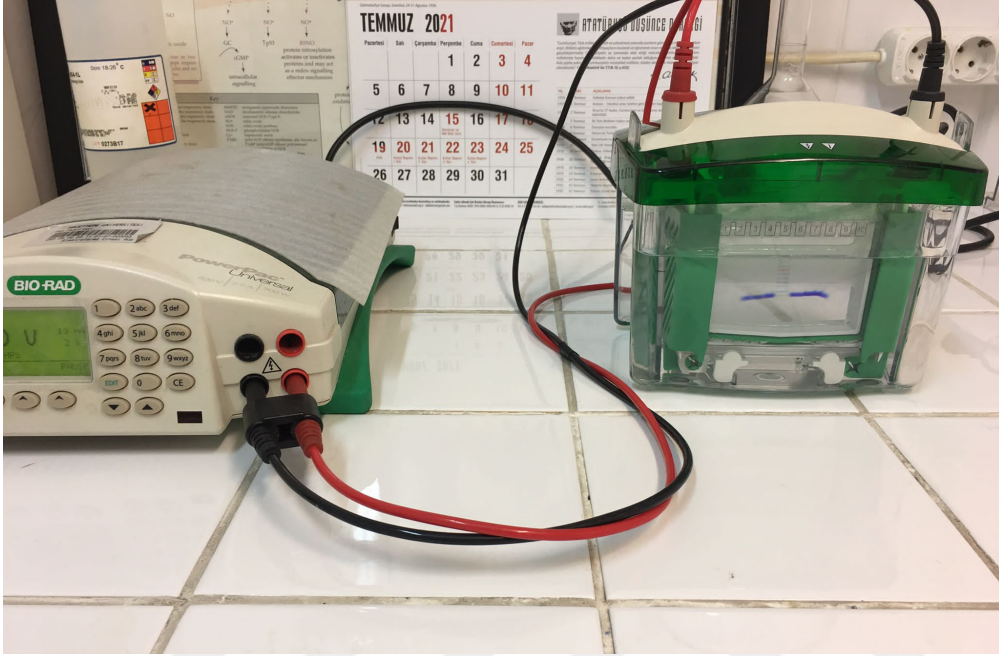
### 3.6. Seçicilik Deneyleri

Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların PC'ye karşı seçiciliğini incelemek amacıyla yarışmacı proteinler varlığında seçicilik deneyleri 1.0 mg/mL derişiminde pH 7.4 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon 2 saat boyunca sürmüştür. Başlangıç ve sonuç örnekleri toplanarak adsorplanmış protein derişim miktarları (mg/g) belirlenmiştir. Yarışmacı protein ajanları olarak molekül yapıları ve moleküler kütleleri birbirine yakın olduğundan sığır serum albümin (BSA), lizozim (LYZ) ve Immunoglobülün G (IgG) proteinleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Protein C için tanıma mekanizmasının hem kimyasal hem de fiziksel etkileşimlere dayandığını göstermektedir.

### 3.7. Yapay Plazma Ortamında Protein C Saflaştırma ve SDS-PAGE Analizi

Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranlar kullanılarak Protein C saflaştırılması yapay plazma ortamında gerçekleştirilmiştir. Yapay plazma kimyasalı Tokra Medical (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Toplam protein derişimi 1.0 mg/mL olacak şekilde yapay plazma çözeltisi içerisine proteinler eklenmiştir. Protein C'nin saflaştırılması sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) kullanılarak incelenmiştir. SDS-PAGE jel olarak mini-protein TGX Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad Laboratories - Dubai Branch) kullanılmıştır. 3 mL protein içeren yapay plazma çözeltisi hazırlanmıştır. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranlar ile 2 saat boyunca adsorpsiyon işlemi yürütülmüştür. Başlangıç derişimleri ve adsorpsiyon

sonrası final çözelti plazma örnekleri toplanmıştır. Desorpsiyon işlemi sonrası örneklerde ayrıca toplanmıştır. Örneklerden 10 µL kuyucuklara yerleştirilerek SDS-PAGE elektroforezde yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) deney düzeneği.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

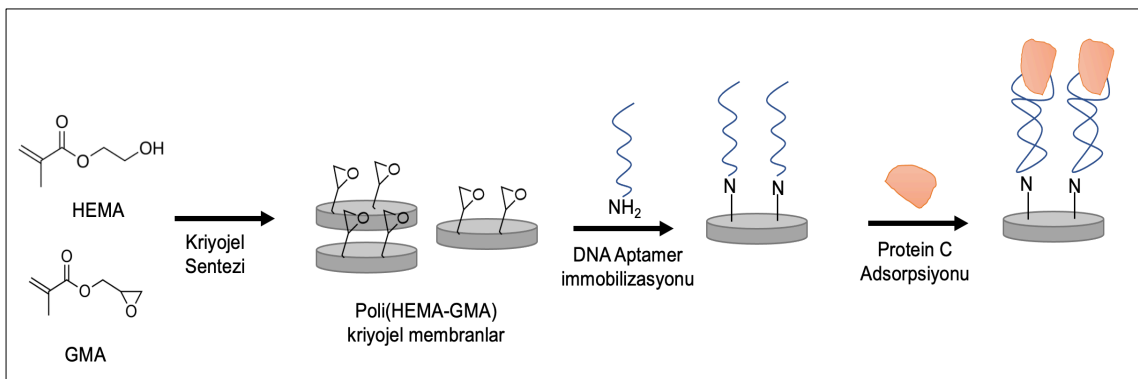
Sunulan tez çalışması beş temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda (i) Poli(HEMA-GMA) makrogözenekli kriyojel membranların sentezlenmesi (ii) Aktive Protein C spesifik DNA takılı Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojellerin hazırlanması (iii) Aktive Protein C adsorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi ve (iv) Seçicilik ve tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının araştırılması (v) Protein C saflaştırılmasının SDS-PAGE ile incelenmesidir.

### 4.1. Poli(HEMA) Kriyojellerin Sentezi

Sadece HEMA monomeri kullanılarak hazırlanan Poli(HEMA) kriyojeller karakterizasyon çalışmaların kontrol grup olarak kullanılmıştır. Protein C adsorpsiyon çalışmalarında yer almamıştır.

### 4.2. Aptamer Temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) Kriyojellerin Sentezi

Poli(HEMA), Poli(HEMA-GMA) kriyojeller sentezlendikten sonra spesifik DNA Aptamer takılı kriyojeller üç farklı derişim oranında aptamerin immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır ve sonuçlar ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Şekil 4.1'de sentez aşamasının şematik bir gösterimi sunulmaktadır. Protein C spesifik DNA-Apt tarafından yüksek afinite ile bağlanmaktadır.



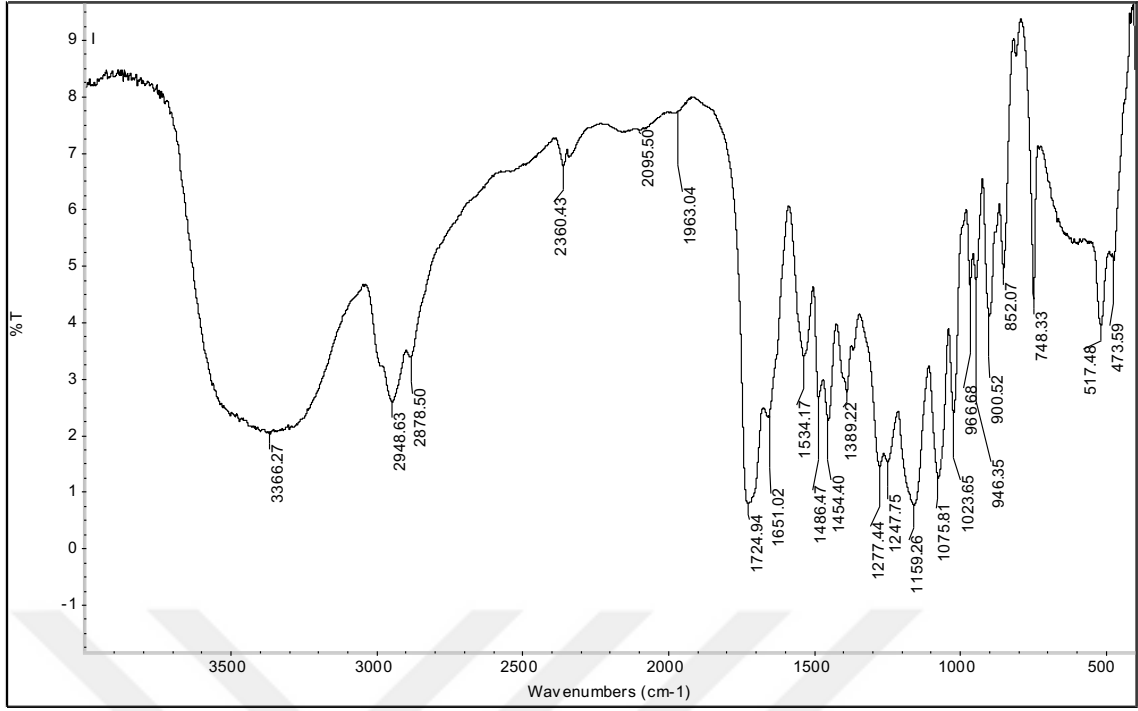
Şekil 4.1. Poli(HEMA-GMA) kriyojel sentezi görüntüsü.

### 4.3. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) Kriyojellerin Karakterizasyonu

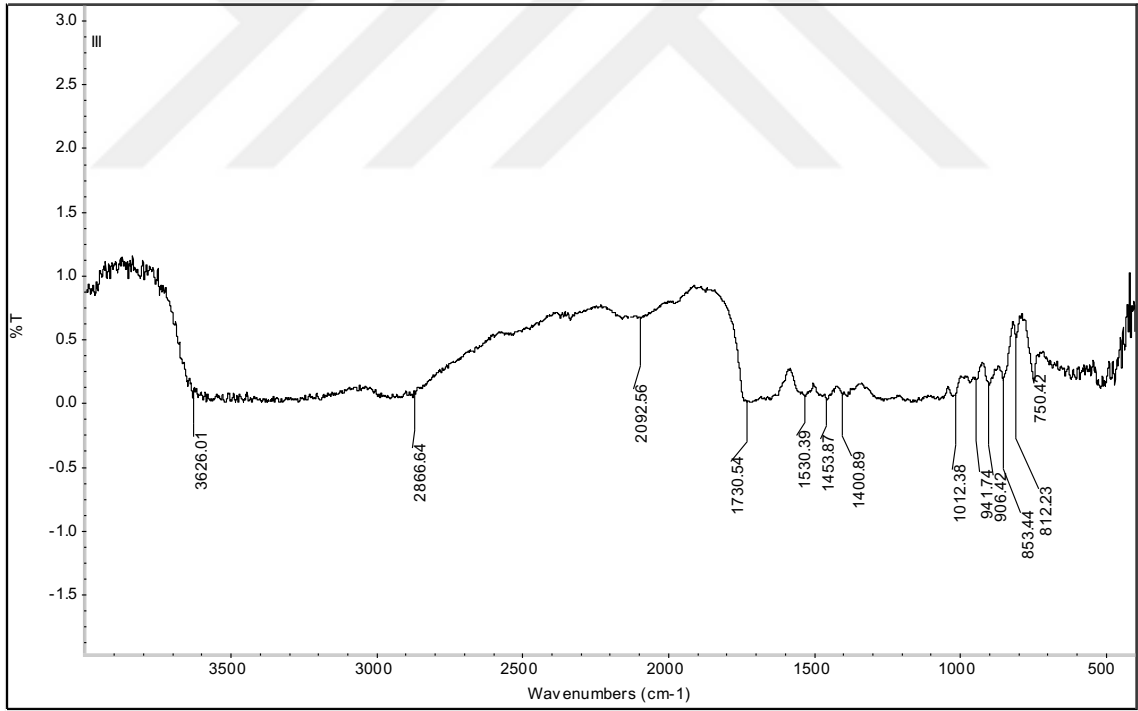
Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranlar kriyopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojellerin FTIR-ATR ve SEM analizi, şişme özellikleri ve yüzey alanı ölçümleri incelenerek karakterize edilmiştir.

#### 4.3.1. FTIR-ATR Analizi

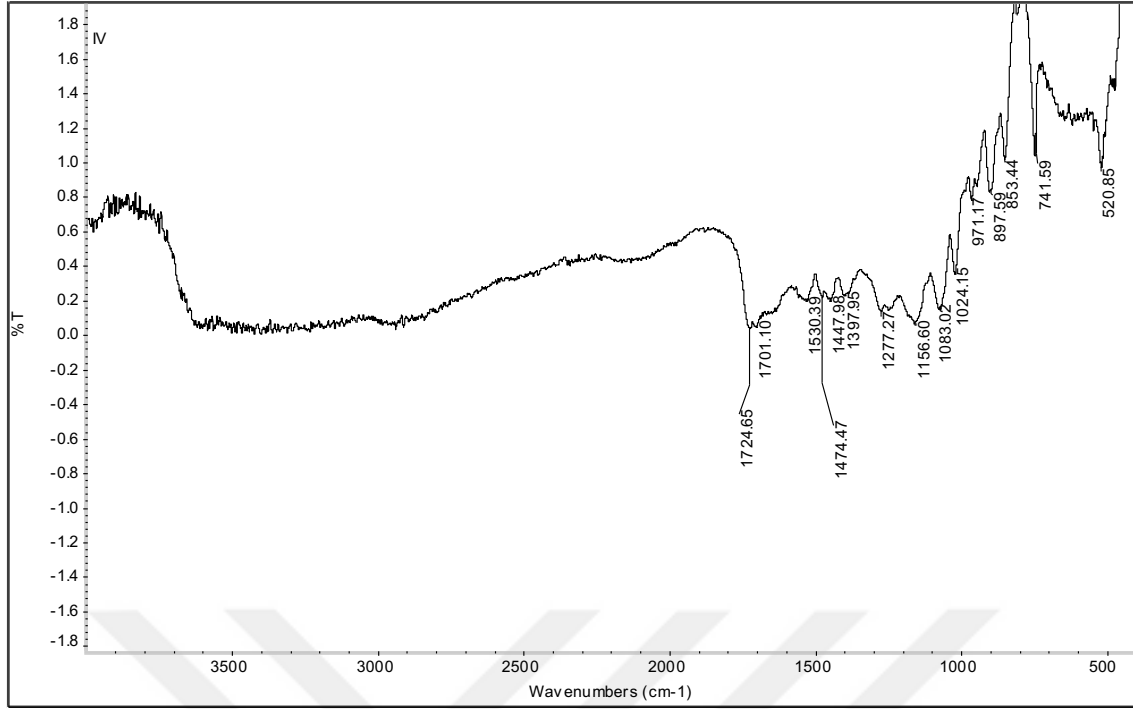
Tez kapsamında sentezlenen kriyojel membranların karakterize etmek için FTIR-ATR cihazı kullanılmıştır. Poli(HEMA-GMA) yapısını aydınlatmak için Poli(HEMA), Poli(HEMA-GMA) ve Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.2'de Poli(HEMA) FTIR-ATR spektrumu verilmiştir. FTIR-ATR verileri incelendiğinde  $3366\text{ cm}^{-1}$  -OH gerilme bandı açık şekilde görülmektedir.  $1724\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil grubuna (C=O) ait band görülmektedir.  $2948\text{ cm}^{-1}$ 'de alifatik zincire ait C-H bandı,  $1631\text{ cm}^{-1}$  ve  $1534\text{ cm}^{-1}$ 'de amid-I ve amid-II bantları yer almaktadır. Geniş hidroksil grubu bandı Poli(HEMA) kriyojelin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Şekil 4.3 ve 4.4'de Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranın FTIR-ATR spektrum sonucu verilmiştir. Sentezlenen kriyojel membranların FTIR spektrumları incelendiğinde Poli(HEMA-GMA) kriyojel yapısında bulunan bantların monomerde ve kompleksde bulunan piklere göre şiddetli olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. Poli(HEMA) kriyojelin FTIR-ATR spekturumu.



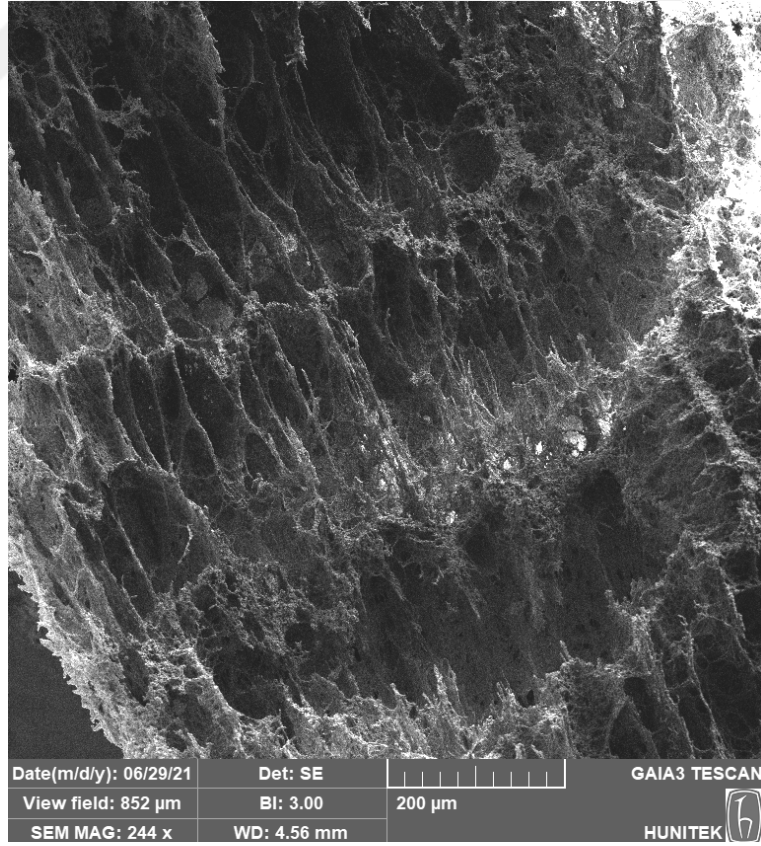
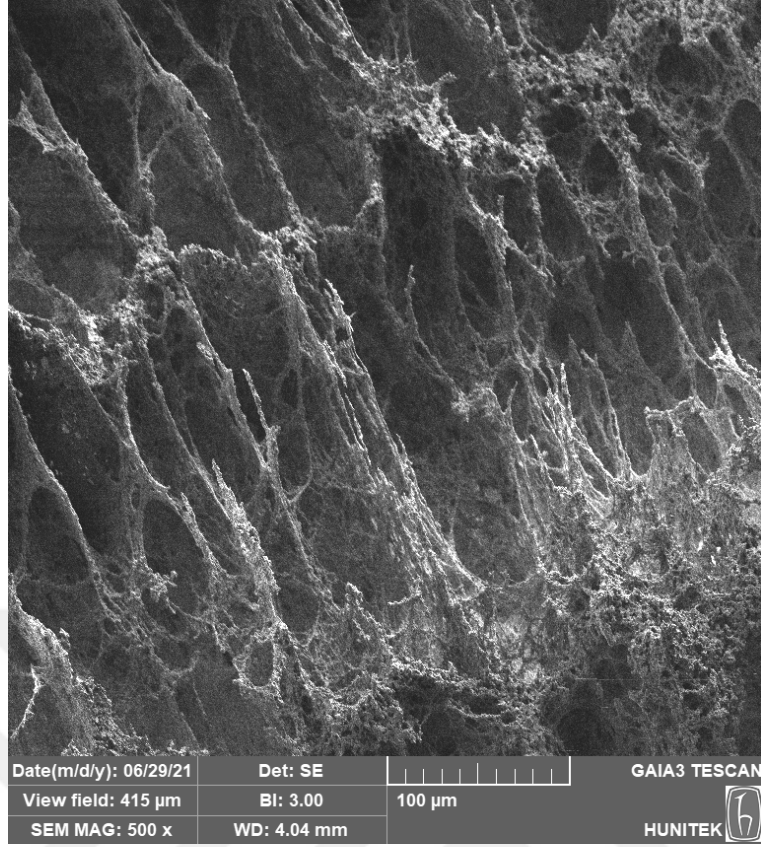
Şekil 4.3. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin FTIR-ATR spekturumu.



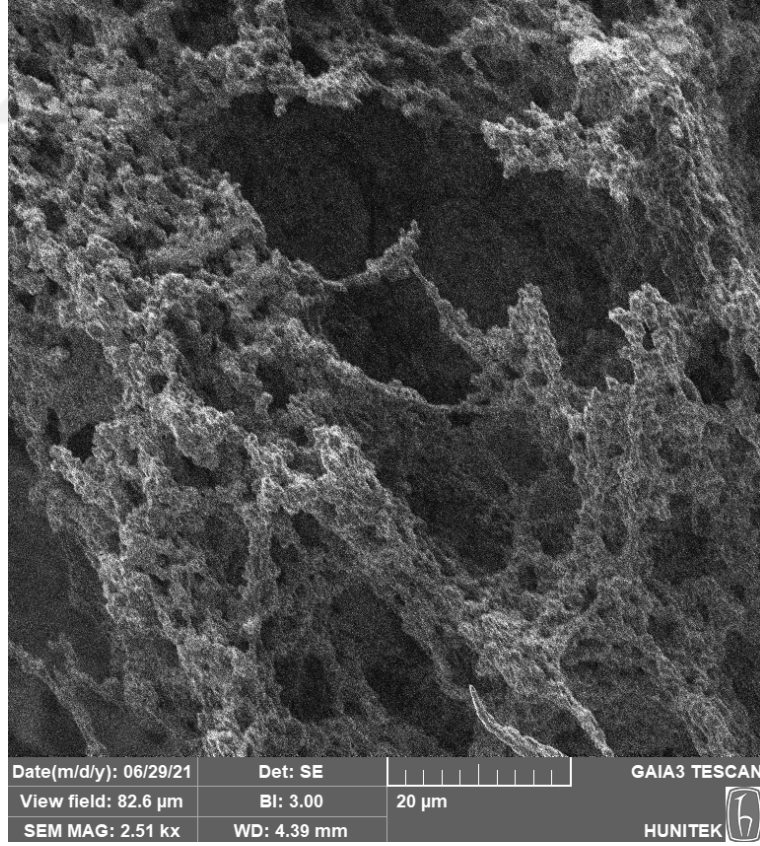
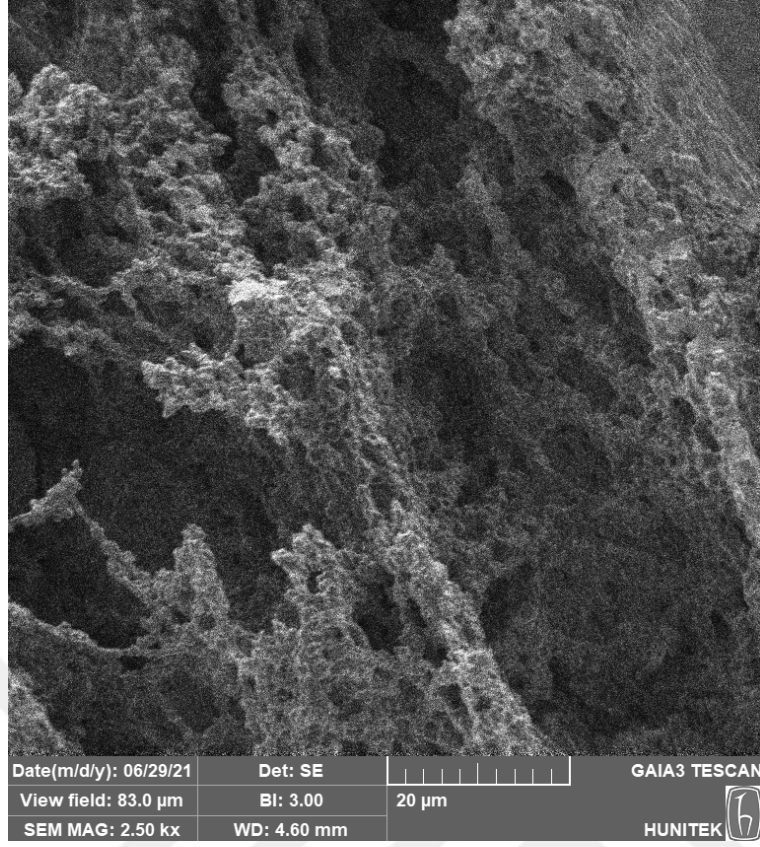
Şekil 4.4. Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojelin FTIR-ATR spektrumu.

#### 4.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

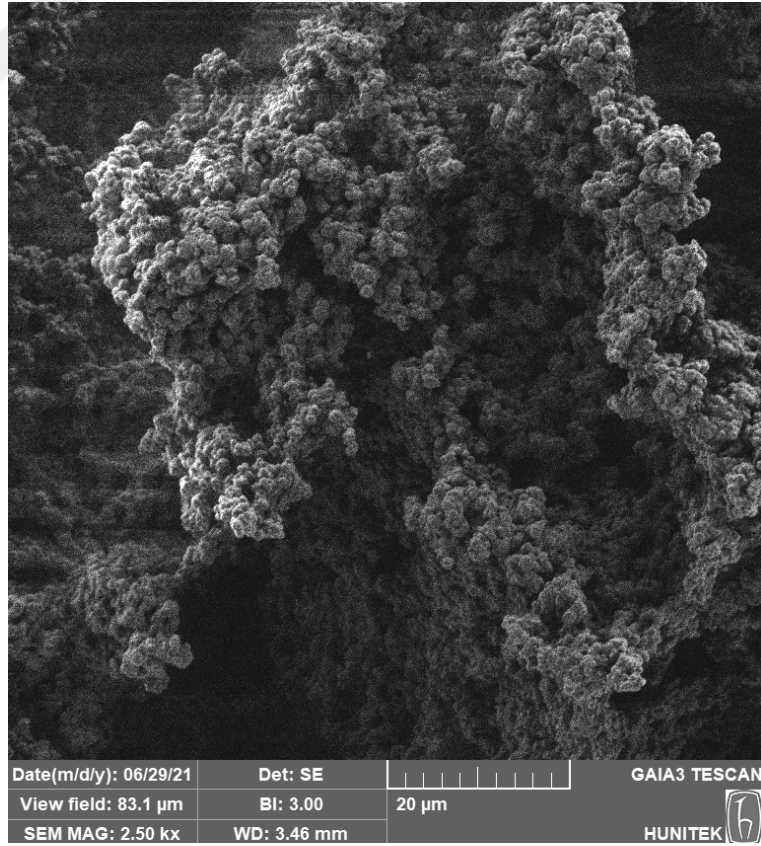
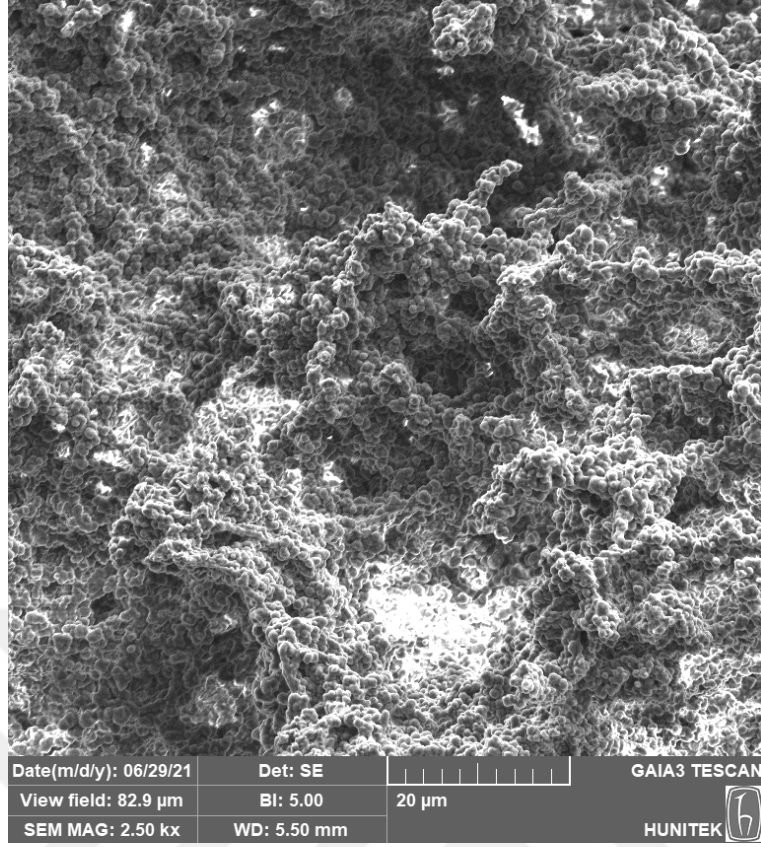
Makrogözenek boyutu ve yüzey morfoloji bilgilerinin detaylı olarak görüldüğü analizlerden biri olan taramalı elektron mikroskobu ile incelenen kriyojel membranların farklı büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları Şekil 4.5-7'te gösterilmektedir. Şekil 4.5'de Poli(HEMA) kriyojel yapısının fotoğrafları incelendiğinde geniş gözenek yapısına sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.6'da Poli(HEMA-GMA) kriyojel yapısı incelendiğinde yapıda biraz değişiklikler farkedilmektedir. GMA'nın kriyojel yapısına daha pürüzlü bir özellik kattığı görülmektedir. Bunun kriyojelde yüzey alanının artmasına sebep olacağı söylenebilir. Şekil 4.7'de is spesifik DNA Aptamer takılı kriyojel membranların yapısı verilmiştir. Yapı bütünlüğü ve özelliklerinde bakıldığında herhangi bir değişim olmadığı söylenebilir. SEM görüntüleri üç farklı kriyojel yapısı olarak incelendiğinde polimerlerin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.



Şekil 4.6. Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.



Şekil 4.7. Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların SEM analiz görüntüleri.

### 4.3.3. Yüzey Alanı Analizi

Poli(HEMA-GMA) ve P(HEMA) temelli kriyojel membranların yüzey alanı sonuçları Çizelge 4.1'de sunulmaktadır. Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin çok geniş bir yüzey alanına sahip oldukları görülmüştür. Kromatografik saflaştırma veya uzaklaştırma çalışmalarında, yüzey alanının geniş olması etkileşim yüzeyini önemli ölçüde artırır ve düşük kütle transfer sınırlaması meydana getirir. Kriyojellerin sahip oldukları dikkate değer yüksek yüzey alanı bağlanma yüzeyinin artmasını sağlamaktadır ve verimli şekilde uzaklaştırma işleminin gerçekleşmesi ile sonuçlanır. Çok noktalı BET yöntemi ile Poli(HEMA-GMA) ve P(HEMA) kriyojel membranın spesifik yüzey alanı ortalama sırasıyla 9.87 m<sup>2</sup>/g ve 6.45 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Poli(HEMA-GMA) ve P(HEMA) kriyojel membranların yüzey alanı sonuçları.

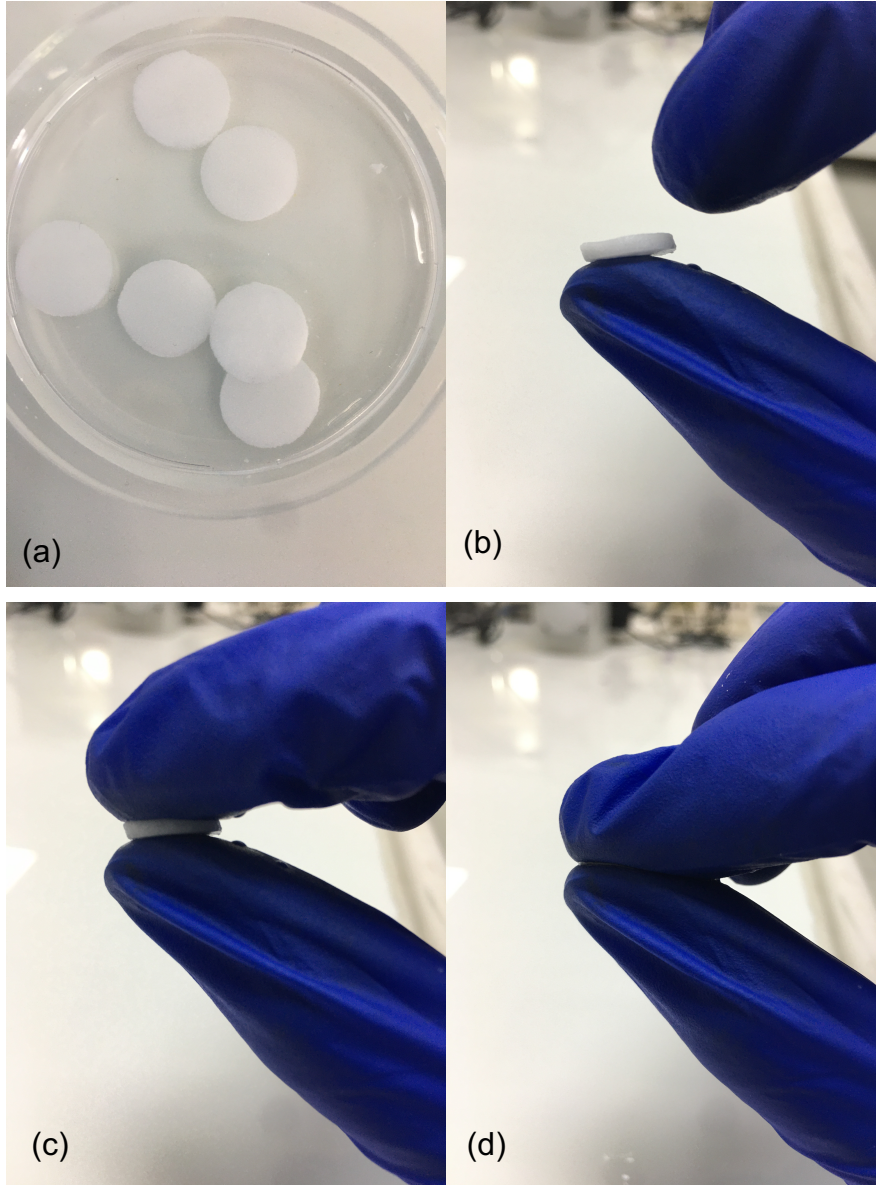
Kriyojel	Yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g)
Poli(HEMA)	6.45
Poli(HEMA-GMA)	9.87

### 4.3.4. Şişme Testi Analizi

Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranların şişme testi analizinde membranların şişme oranları ve % makrogözeneklilik sonuçları incelenmiştir. Kuru polimer ağırlıkları Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranlar için sırasıyla 20.4 mg ve 19.0 mg'dır. Şişmiş polimer ağırlığı ise Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranlar için sırasıyla 166 mg ve 171.2 mg olarak tartılmıştır. Eşitlik 3.1 ve 3.2 kullanılarak şişme oranı ve makrogözeneklilik dereceleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi polimerizasyon çözeltisinde aptamer miktarının artması suyun difüzyonunu kolaylaştırılması nedeniyle elde edilen kriyojel membranların şişme oranında ve makrogözenekliliğinde artmıştır. Ayrıca, spesifik DNA Aptamer oranının kriyojel yapısında artması yapının hidrofiliğinin artmasına neden olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Poli(HEMA) kriyojel membranların şişme ve makrogözeneklilik oranları.

Kriyojel Örneği	Şişme Oranı %	Makrogözeneklilik (%)
Poli(HEMA)	707.42	94.98
Poli(HEMA-GMA)	768.93	98.51

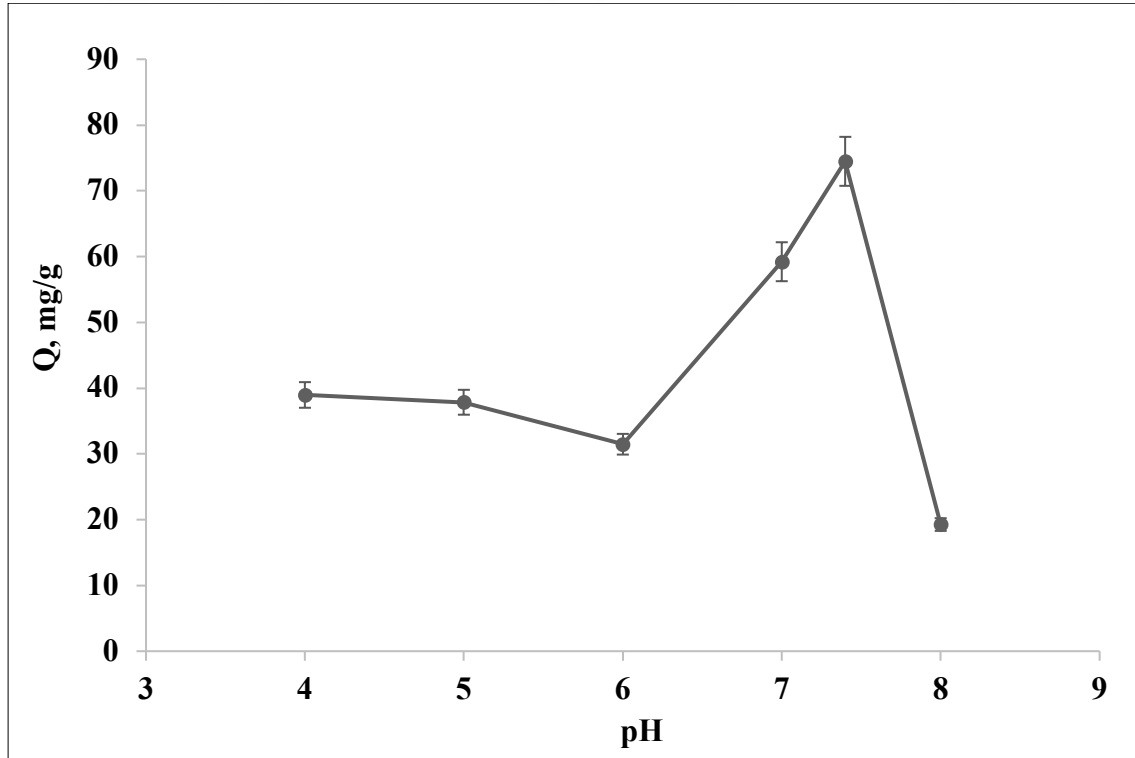


Şekil 4.8. (a) Kriyojel membranlar; (b) Şişmiş polimer; (c) Polimerin sıkılması; (d) sıkılmış polimer.

## 4.4. Protein C Adsorpsiyon Çalışmaları

### 4.4.1 pH'nın Etkisi

Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların Protein C adsorpsiyonuna pH değişiminin etkisi Şekil 4.9'de görülmektedir. pH 4-9 arası asetat ve fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan çalışmalarda kriyojel membranların PC adsorpsiyonu için her bir pH değerinde farklı bağlanma göstermektedir. Maksimum adsorpsiyon gösterdiği pH değeri optimum pH olarak seçilmiştir. Poli(HEMA-GMA/DNa-Apt-2) kriyojeli pH 7 ve 8 aralığında iyi çalışmaktadır ve pH 7.4' de ise maksimum adsorpsiyona ulaştığı hesaplanmıştır. Adsorpsiyon çalışmalarına pH 7.4 fosfat tamponu ile devam edilecektir.

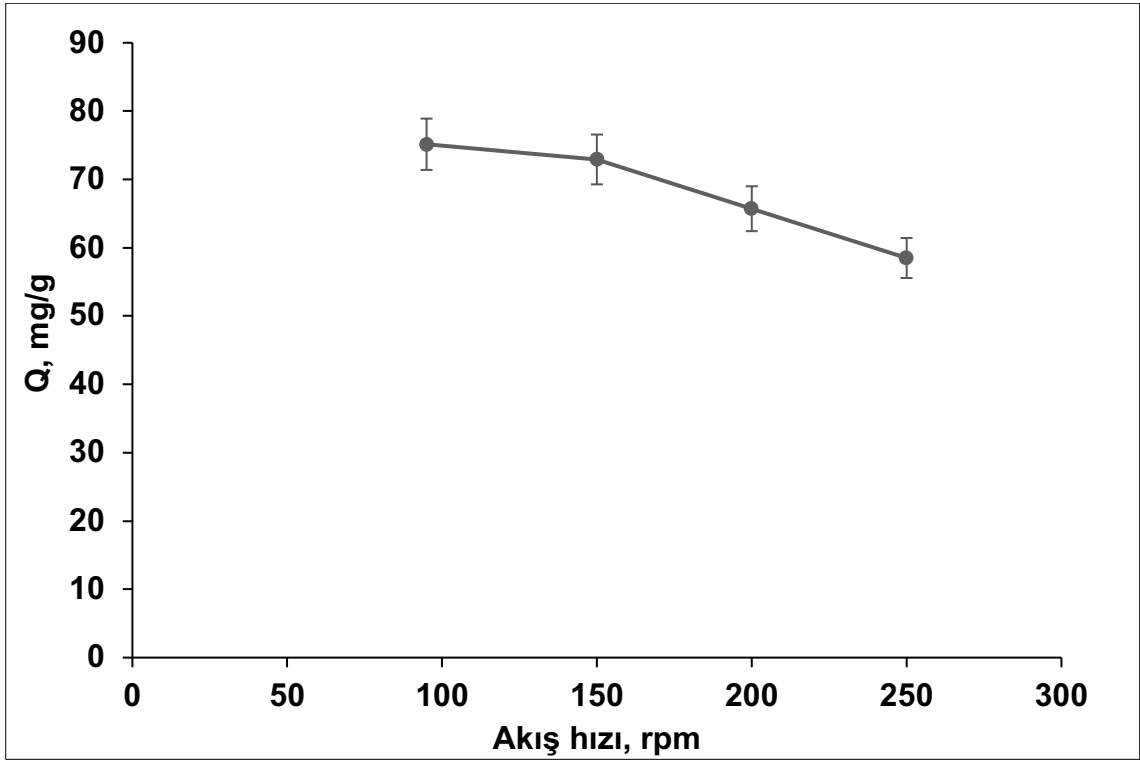


Şekil 4.9. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-2) kriyojellerin Protein C adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. T: 25°C, PC derişimi: 1.0 mg/mL, m<sub>kuru kriyojel</sub>: 19.0 mg.

### 4.4.2. Akış Hızı

Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranlarla protein C adsorpsiyonuna akış hızının etkisini incelemek için 90-250 rpm de farklı akış hızlarında deneyler yürütülmüştür ve Şekil 4.10'da PC adsorpsiyon

kapasitesindeki değişim grafiği gösterilmiştir. Deneyler 1.0 mg/mL PC derişiminde incelenmiştir. şekilde görüldüğü gibi akış hızının artması ile Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-2) kriyojel membranlarla adsorbe olan PC miktarı azalmıştır. 95 rpm akış hızında PC miktarı 75.14 mg/g bulunmuştur. Bu değer 250 rpm akış hızın da 58.49 mg/g değerine düşmektedir. Bu sonuçlara göre akış hızının artması PC moleküllerinin kriyojel membran yüzeyiyle olan bağlanma süresini azalttığı için maksimum adsorpsiyon kapasitesinde düşmeye neden olmaktadır. Bu sonuçlara göre, 95 rpm akış hızı optimum çalışma hızı olarak seçilmiştir.

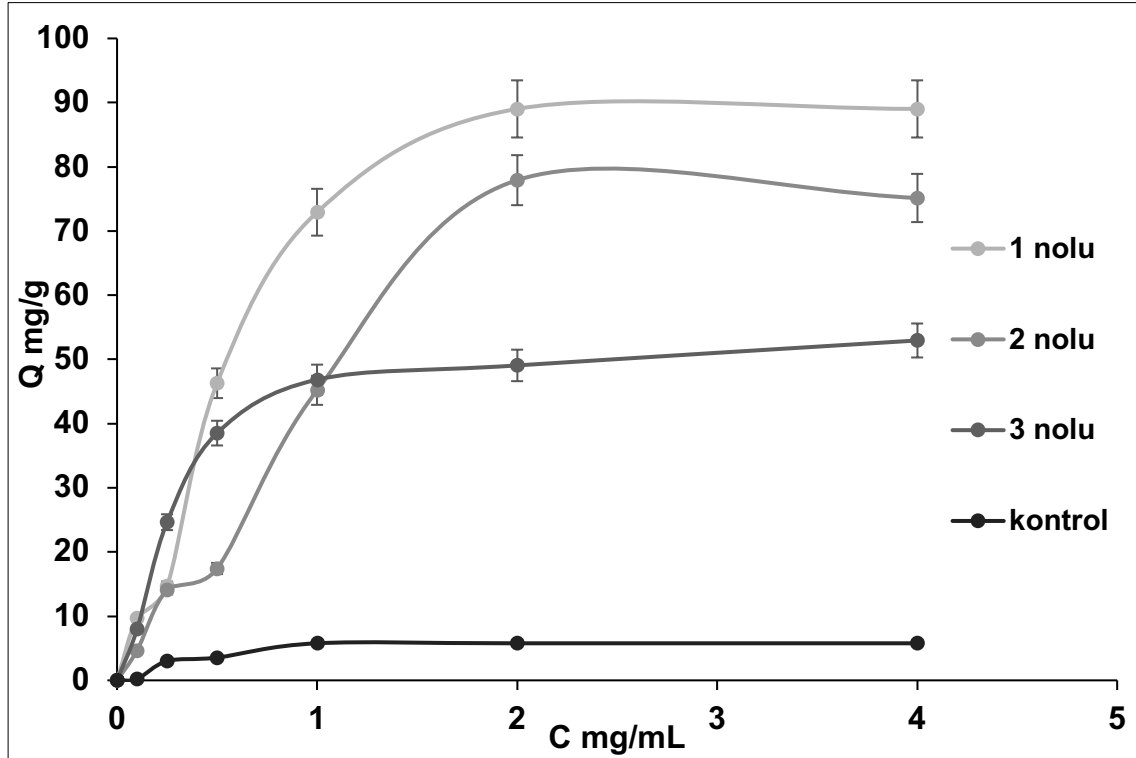


şekil 4.10. Akış hızının adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Çalışma tamponu: pH 7.4; PC derişimi: 1.0 mg/mL; T: 25°C;  $m_{\text{kuru kriyojel}}$ : 19 mg.

#### 4.4.3. Başlangıç Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

Aptamer temelli Poli(HEMA-GMA) kriyojel membranlar üç farklı Aptamer oranı içermektedir. Bu oranların PC adsorpsiyon kapasitesine etkisini araştırmak her bir kriyojel membran için başlangıç derişimi çalışmaları yapılmıştır. Sırasıyla 150, 100 ve 50 ppm DNA Aptamer immobilize edilen kriyojel membranlar 1 nolu, 2 nolu

ve 3 nolu olarak kodlanmıştır. Aptamer içermeyen Poli(HEMA-GMA) kriyojel membran kontrol grubu olarak seçilmiştir. Protein C başlangıç derişim çözeltileri 0 ile 4.0 mg/mL aralığında pH 7.4 tampon çözeltilisi kullanılarak hazırlanmıştır. Şekil 4.11'de grafiği incelediğimizde Protein C adsorpsiyon kapasite verimi 2.0 mg/mL'ye kadar artmakta ve bir süre sonra 4.0 mg/mL'de sabitlendiği Şekil 4.10'da görülmektedir.



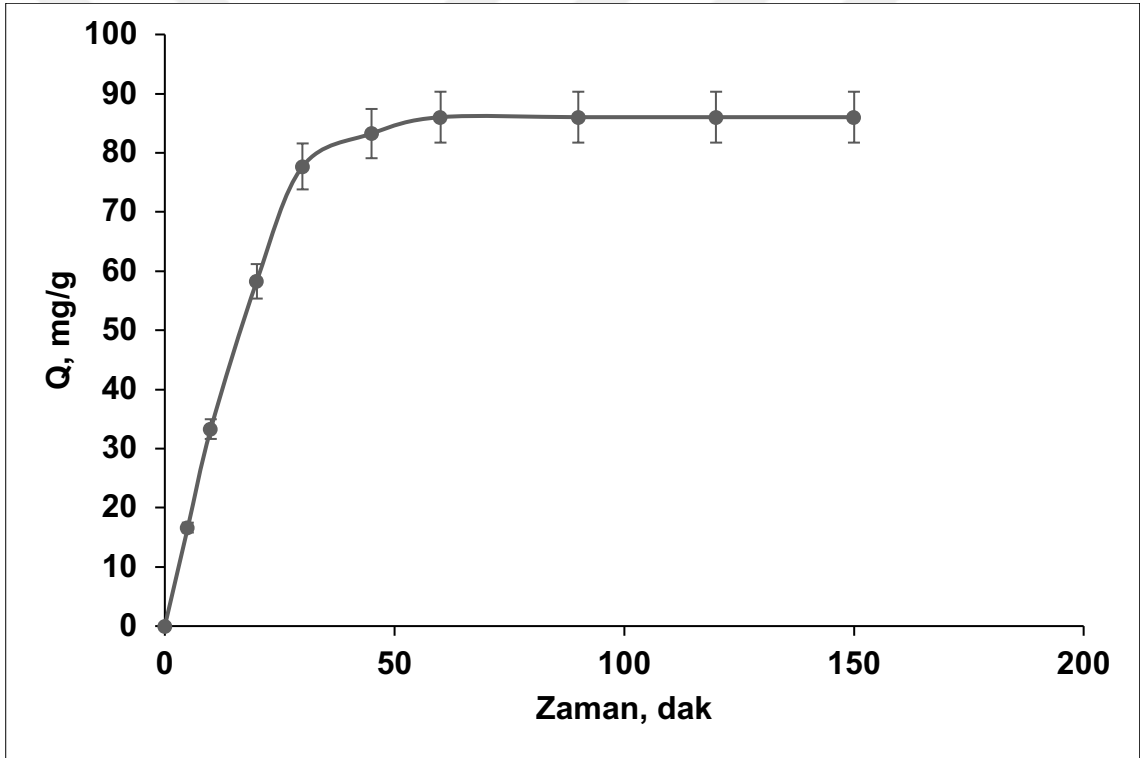
Şekil 4.11. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların Protein C adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi; Çalışma tamponu: pH 7.4, T: 25°C,  $m_{\text{kuru kriyojel}}$ : 19 mg.

1 numaralı kriyojel membran incelendiğinde, 1.0 mg/mL PC başlangıç derişim çözeltilisi PC maksimum adsorpsiyon kapasitesi 72.92 mg/g, 2.0 mg/mL için 89.02 ve 4.0 mg/mL için 89.02 mg/g olarak hesaplanmıştır. 2 ve 3 numaralı Aptamer temelli kriyojellerde maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla 75.14 mg/g ve 52.94 mg/g olarak bulunmuştur. Kontrol grup olarak seçilen aptamersiz P(HEMA-GMA) kriyojel membranlarının adsorpsiyon kapasitesindeki düşük verim gözle

görülmektedir. Diğer parametreler 1 numara kodlu en yüksek Aptamer içeren kriyojel membranlar Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1 ile yürütülecektir.

#### 4.4.4. Zamanın Adsorpsiyona Etkisi

Zaman göre adsorpsiyon kapasitesinin değişimini gösteren grafik Şekil 4.12 verilmektedir. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyon kapasitesinin ilk 60 dakika boyunca hızlı bir şekilde arttığı görülmektedir. İlk on dakikada adsorpsiyon kapasitesi 16.64 mg/g, ilk 45 dakikada 83.24 mg/g ve ilk 90 dakikada 86.02 mg/g'dır.



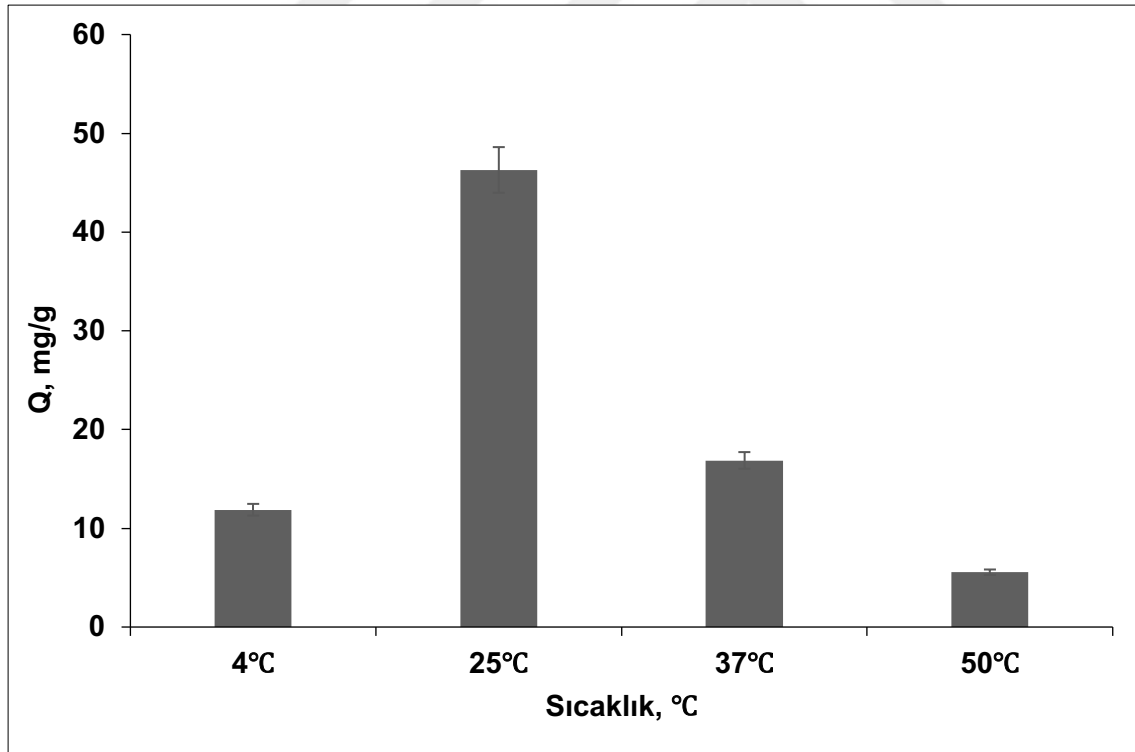
Şekil 4.12. Adsorpsiyon zamanının PC adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Çalışma tamponu: pH 7.4; PC derişimi: 1.5 mg/mL; T: 25°C;  $m_{kuru\ kriyojel}$ : 19 mg.

Bu sonuçlara göre ilk 90 dakika içinde Protein C'nin kriyojel membran matrisindeki etkileşebileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeniyle doyunluk değerlerine ulaşıldığı söylenebilir. Beklendiği gibi, hareketli fazda (protein çözeltisi) Protein C derişimi düştükçe durgun fazda (kriyojel) artışa karşılık

geldiğinden, itici güç azalır ve bu da adsorpsiyon kapasitesi hızında azalışa neden olur.

#### 4.4.5. Sıcaklığın Etkisi

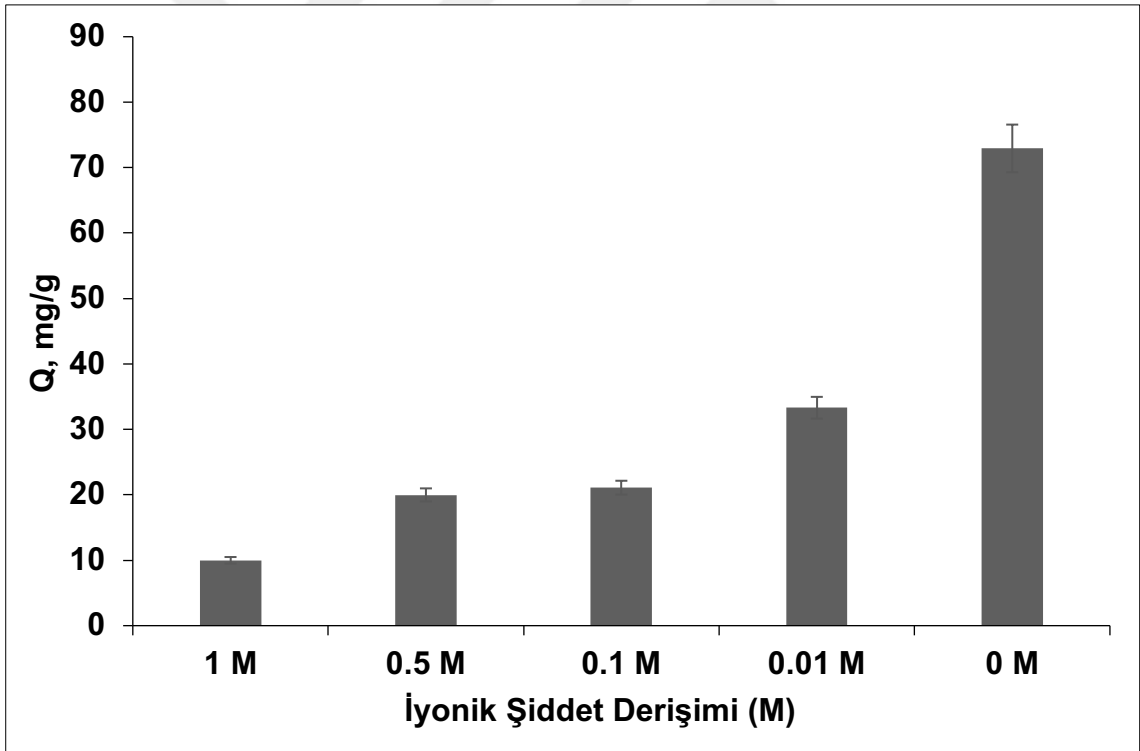
Sıcaklık değişiminin Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyonu değişimine etkisi 4°C - 37°C farklı sıcaklık aralığında incelenmiştir. Sıcaklık 4°C'den 50°C'ye yükseldiği zaman Protein C adsorpsiyonu 4°C'de adsorpsiyon kapasitesi 11.87 mg/g ve 50°C'de adsorpsiyon kapasitesi 5.54 mg/g olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.13'de görüldüğü üzere, Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojelin Protein C adsorpsiyon kapasitesi sıcaklık arttıkça ve azaldıkça belirgin şekilde adsorpsiyon kapasitesi düşmüştür. İdeal çalışma sıcaklığı en yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaşılan 25°C olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıkta adsorpsiyon kapasitesi 1.5 mg/mL protein C için 46.28 mg/g'dır.



Şekil 4.13. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Çalışma tamponu: 0.1 M pH: 7.4; APC derişimi: 1.5 mg/mL, m<sub>kuru</sub> mikrokriyojel: 19 mg.

#### 4.4.6. İyonik Şiddetin Etkisi

Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojellerin Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi; 0.01 M ve 1.0 M farklı derişim aralığında NaCl çözeltisi içeren 0.1 M pH 7.4 PBS tamponunda hazırlanan çözeltilerle incelenmiştir. Proteinlerin serbest enerjisi, iyonik şiddet ortamında artmaktadır ve bu ters serbest enerji, çözücüyle etkileştikleri bölgelerin daha düşük olması nedeniyle adsorbent ile etkileşen proteinler için çok daha düşüktür. Bu nedenle proteinlerin adsorbente bağlanmaları serbest olmalarından termodinamik olarak daha kararlıdır [121]. Ayrıca hedef analitin ve polimerin apolar grupları etrafındaki su moleküllerinin yönelimleri tuz iyonları tarafından bozulur ve böylece apolar grupların tercihen etkileşime girmesine izin verilmiş olur [122]. Şekil 4.14'de iyonik şiddet değişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.14. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Çalışma tamponu: 0.1 M pH: 7.4; T: 25°C; APC derişimi: 1.5 mg/mL,  $m_{\text{kuru mikrocriyojel}}$ : 19.0 mg.

1.0 M NaCl içeren PC çözeltisi adsorpsiyon kapasitesi 9.98 mg/g, 0.5 M NaCl için 19.97 mg/g, 0.1 M NaCl çözeltisi için 21.08 mg/g ve 0.01 M NaCl içeren PC çözeltisi için 33.29 mg/g'dır. Tuz içermeyen örnek için adsorpsiyon kapasitesi 72.92 mg/g'dır.

#### 4.5. Adsorpsiyon İzoterm Sonuçları

Proteinlerin absorbentlerle etkileşimlerini incelemek için adsorpsiyon izoterm modellerini kullanılmıştır. Bunun için Langmuir izoterm ve Freundlich izoterm modelleri kullanılmıştır.

Langmuir modeli adsorpsiyon izoterm modeli eş/benzer enerjilere sahip bağlanma bölgeleriyle etkileşime giren moleküllerin yalnızca bir tanesine bağlandığı bir modeldir. Bu nedenle homojen bir dağılıma sahip olduğu varsayılmaktadır. Moleküllerin diğer bölgelerle olası etkileşimleri buraya dahil edilmemiştir. Eşitlik 4.2'de verildiği gibi Langmuir yaklaşımı kullanılır [123-125].

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{maks} \times b) + C_{eq}/Q_{maks} \quad (4.2)$$

Eşitlik 4.2'de  $C_{eq}$ , çözeltideki PC'nin denge derişimidir (mg/mL),  $Q$ , adsorbe edilen PC miktarıdır (mg/g),  $Q_{maks}$  (mg/g) maksimum PC adsorpsiyon kapasitesini temsil etmektedir ve Langmuir sabiti  $b$  (mL/mg) ile temsil edilmiştir.  $Q_{maks}$  değerine  $C_{eq}/Q-C_{eq}$  grafiğinin eğiminden  $Q_{maks}$  değerine ve y-ekseni ile kesiştiği noktadan ulaşılabilir [123].

Langmuir izoterm modeli gösteren grafik Şekil 4.15'de gösterilmektedir, ayrıca grafik yardımıyla teorik olarak hesaplanabilen maksimum adsorpsiyon katsayısı  $Q_{maks}$  değeri 91.74 mg/g ve Langmuir sabiti ise 1.46 mL/mg olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.9231'dir.

Eşitlik 4.3'de Freundlich adsorpsiyon yaklaşımında kullanılan matematiksel ifade verilmiştir.

$$Q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n} \quad (4.3)$$

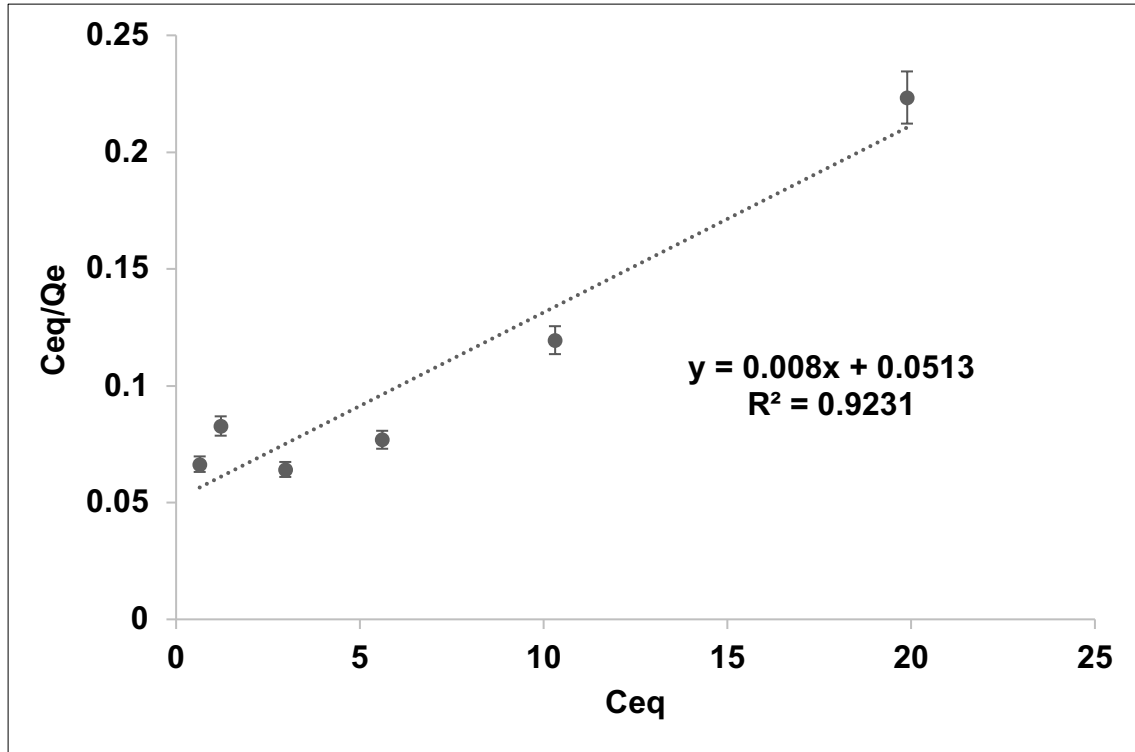
Eşitlikte  $C_{eq}$ , çözültideki PC'nin denge derişimidir (mg/mL),  $K_f$  adsorpsiyon kapasitesinin bir ölçüsüdür;  $1/n$  adsorpsiyon yoğunluğunun göstergesidir ve  $Q_{eq}$  dengedeki absorban derişimidir (mg/g). Eşitliğin her iki tarafını da logaritmik olarak düzenlediğimizde Eşitlik 4.4'de verilen şekli alır.

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.4)$$

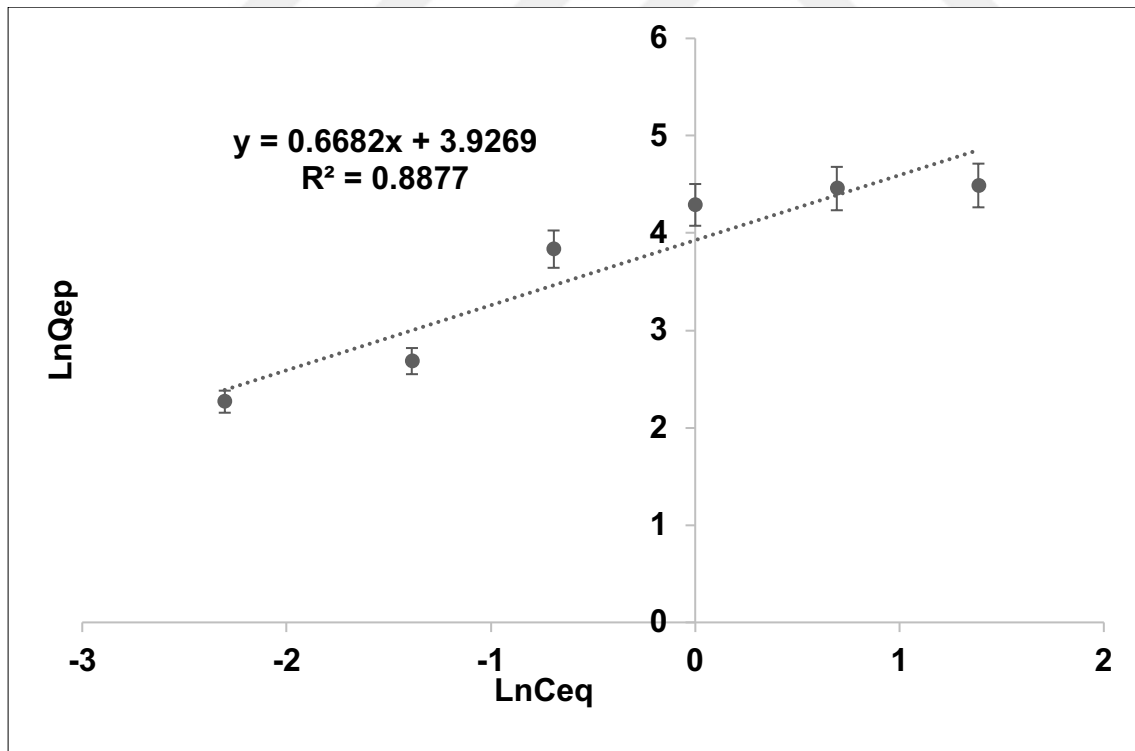
Bu eşitliğe göre, Şekil 4.15'de verilen  $\ln C_{eq}$ 'nin  $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiğini belirliyoruz. Bu doğrunun y eksenini kestiği noktadan doğrunun eğimi ve  $1/n$  değeri bulunarak  $K_f$  değerine ulaşılabilir.

Çizelge 4.3'de Langmuir ve Freundlich izoterm modeli sonuçları gösterilmektedir. Değerlere bakıldığında korelasyon katsayıları bakımından karşılaştırdığımızda bu çalışma Şekil 4.15'den de görüleceği gibi Langmuir izoterm modeli yaklaşımına daha fazla uygun olduğu söylenebilir. Maksimum PC adsorpsiyon değeri deneysel olarak elde edilen maksimum PC adsorpsiyon değerlerine daha yakındır.

Hesaplanan sonuçlara göre sistemin homojen, eş enerjili ve tek tabakalı olduğu Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membran yüzeyi ile tüm Protein C moleküllerinin bağlandığı ve adsorplanan Protein C molekülleri arasında bir etkileşim olmadığı sonucuna varılabilir [123].



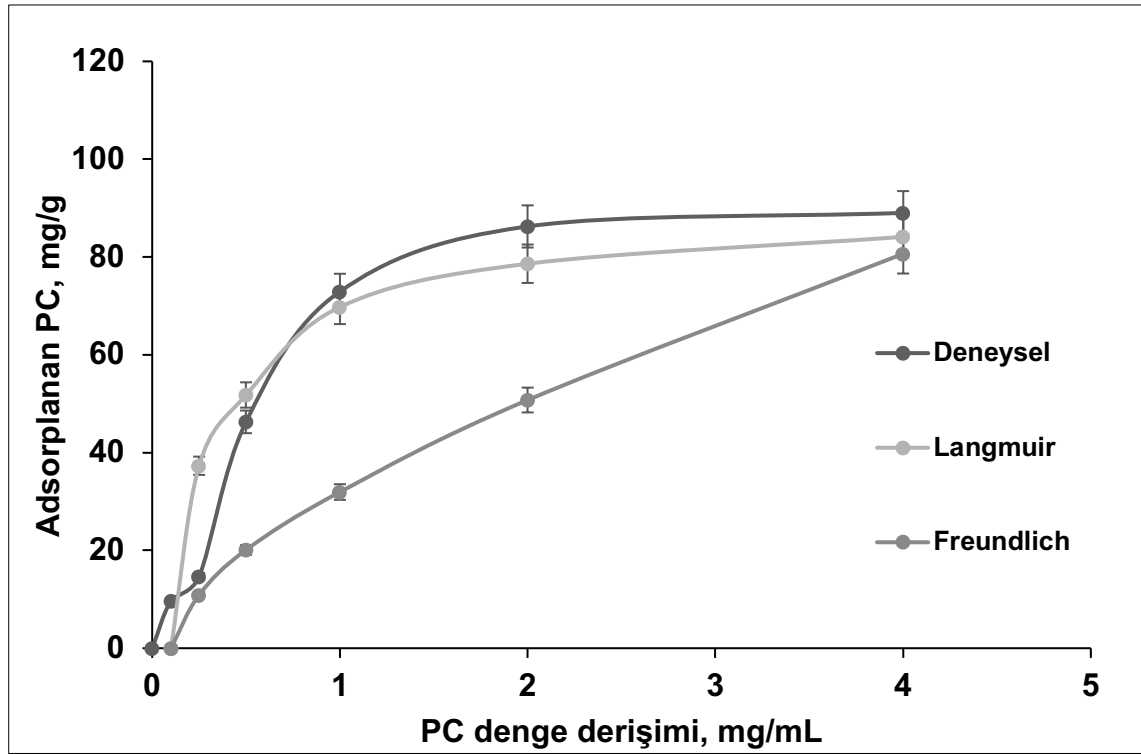
Şekil 0.15. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranları için Langmuir adsorpsiyon izoterm doğrusal grafiği.



Şekil 4.16. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranları için Freundlich adsorpsiyon izoterm doğrusal grafiği.

Çizelge 4.3. Langmuir ve Freundlich izoterm modeli sabitleri.

Kriyojel Membran	Deneysel	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri		
	$q_{ex}$ mg/g	$Q_L$ mg/g	$b$ mL/mg	$R^2$	$Q_F$ mg/g	$n$	$R^2$
Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1)	89.02	91.74	1.36	0.9231	49.40	1.52	0.8877



Şekil 4.17. Deneysel verilerin izotermeler ile karşılaştırılması.

#### 4.6. Adsorpsiyon Kinetiği Sonuçları

Adsorpsiyon kinetik modelleri hesaplanması kimyasal reaksiyonlar ile kütle transferi gibi değerlerin birinci ve ikinci dereceden olmak üzere iki farklı şekilde adsorpsiyon çalışmaları için belirlenmesinde önemli bir ölçümdür. Bu amaçla pseudo (yalancı) birinci ve ikinci derece modeller yararlanılmıştır. Lagergren'in birinci dereceden hız denklemini herhangi bir çözeltide çözünen maddeler için

adsorpsiyonun incelenmesinde kullanılan en uygun yaklaşımdır. Eşitlik 4.5'de bu yaklaşımın matematiksel modeli verilmiştir.

$$q_t/d_t=k_1(Q_{eq}-q_t) \quad (4.5)$$

Eşitlikteki  $Q_{eq}-q_t$  değerleri, dengede ve bir  $t$  zamanında mg/g cinsinden adsorbe edilen madde miktarını ve  $k_1$  değeri ise  $1/d_k-d_a$  ( $q_t = 0$ ,  $t = 0$ 'da) yalancı birinci dereceden adsorpsiyon hız sabitini göstermektedir.

$t = 0$  anında  $q_t = 0$  ve  $t = t$  zamanında  $q_t = q_t$  limit değerleri altında integral alınarak ve eşitlik logaritmik olarak yeniden düzenlenerek aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\ln(Q_{eq}-q_t)= \ln(Q_{eq}) - (k_1t)/2.303 \quad (4.6)$$

Eşitlik 4.6'nın  $t - \ln(Q_{eq}-q_t)$  grafiğine baktığımızda eğim bize  $k_1/2.303$  miktarını verir,  $y$  eksenini kestiği yerde  $\ln Q_{eq}$  miktarına ulaşılır. Denklem 4.6'nın grafiği Şekil 4.18'de verilmektedir.

Yalancı ikinci dereceden denklem şu şekilde ifade edilir:

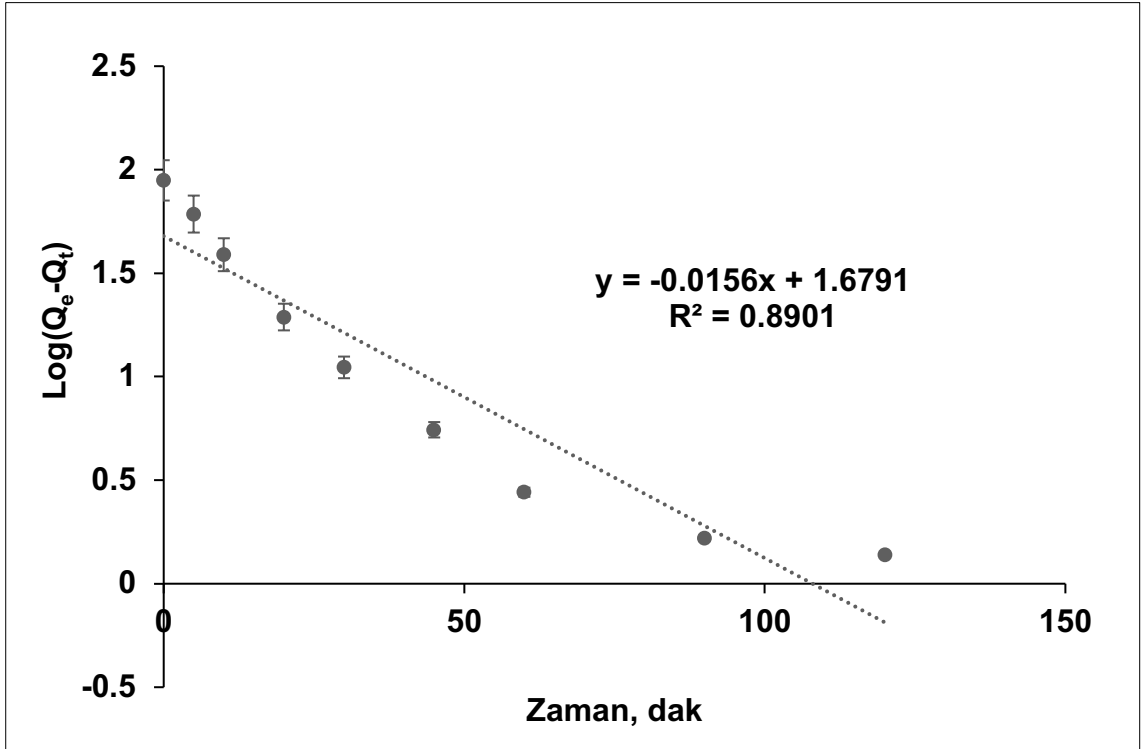
$$dq_t/d_t = k_2 (Q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.7)$$

Eşitlikte verilen  $k_2$  değeri  $g.mg^{-1}.min^{-1}$  cinsinden hız sabitini verir. Benzer şekilde  $t = 0$  zamanında  $q_t = 0$  ve  $t = t$  anında  $q_t = q_t$  limit değerleri uygulanır ve eşitlik yeniden düzenlenirse aşağıdaki şekle ulaşılabilir.

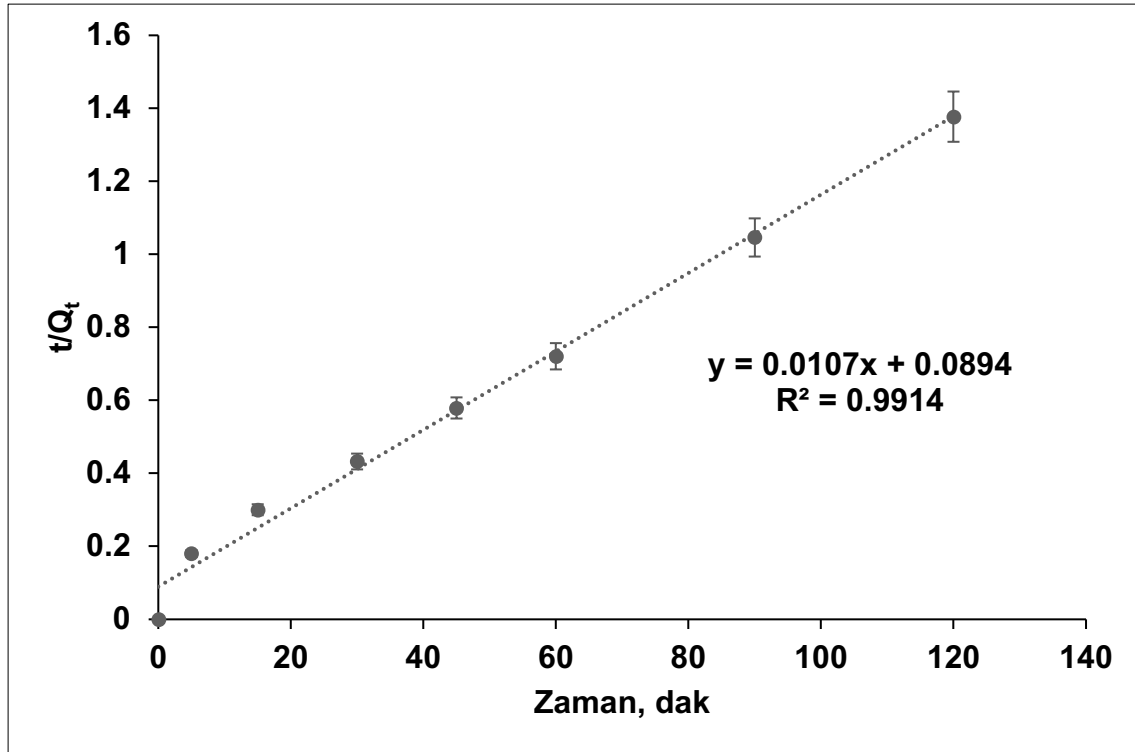
$$(t/q_t)= (1/k_2Q_{eq}^2) + (1/Q_{eq})t \quad (4.8)$$

t - t/qt grafiğine bakarsak y eksenini kestiği noktadaki değer  $1/k_2Q_{eq}^2$  değerini, eğim değeri ise  $1/Q_{eq}$  miktarını verecektir. Eşitlik 4.8'in grafiği Şekil 4.19'da verilmiştir [123].

Çizelge 4.4'de yalancı birinci ve ikinci derece kinetiklerden elde edilen tüm değerler sunulmuştur.



Şekil 4.18. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların birinci dereceden kinetiği.



Şekil 4.19. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların ikinci dereceden kinetiği.

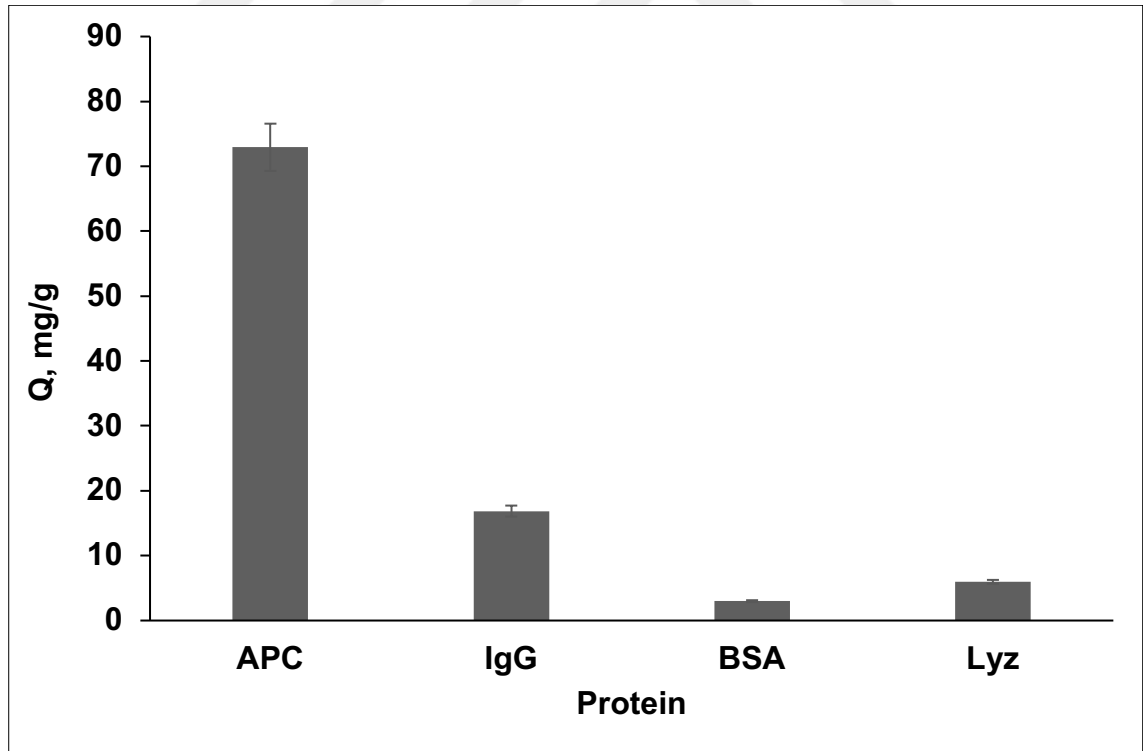
Çizelge 4.4. DNA-Aptamer temelli kriyojel membranlar için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik denge sabitleri sonuçları (PC derişimi: 4.0 mg/mL).

Kriyojel Membran	Deneysel		1. Derece Kinetik		2. Derece Kinetik		
	Q <sub>e</sub> mg/g	k <sub>1</sub> (1/dk)	Q <sub>e</sub> mg/g	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub> g/mg.dk	Q <sub>e</sub> mg/g	R <sup>2</sup>
Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1)	89.02	3.59x10 <sup>-2</sup>	5.31	0.8901	1.29x10 <sup>-3</sup>	93.45	0.9914

Çizelge 4.3'de gösterilen hesaplanan değerler göz önüne alındığında, sistemimiz için ikinci dereceden kinetik yaklaşımın elde edilen deneysel veriler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Dolayısıyla protein adsorpsiyonunun kimyasal olarak kontrol edildiğinin bir göstergesidir.

#### 4.7. Seçicilik Çalışmaları

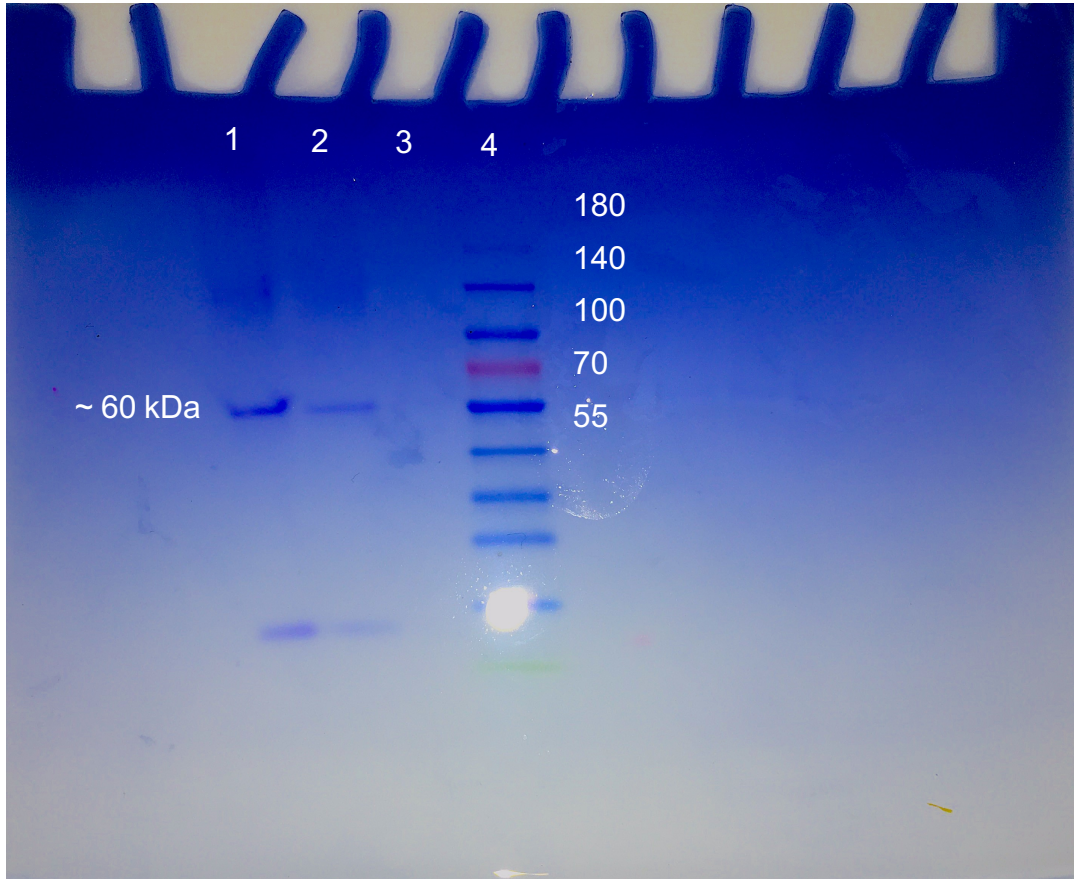
Moleküler tanıma seçiciliği, DNA-spesifik aptamer temelli malzemelerin en önemli parametrelerinden biridir. Spesifik moleküler tanıma, aptamerlerin en temel karakteristik özelliğinden biridir. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin Protein C bağlanmasına yönelik seçiciliği, pH 7.4 PBS tamponunda yarışmacı protein ajanları olarak HSA, IgG ve LYZ kullanılarak incelenmiştir. Yarışmacıların ayrı ayrı uygulandığı çalışmada çözeltilerin derişimleri UV spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. BSA, IgG ve LYZ boyutları ve yük özelliklerinden dolayı yarışmacı ajanlar olarak seçilmiştir. IgG'nin molekül ağırlığı 150.0 kDa, HSA'nın molekül ağırlığı 67.0 kDa'dur. Protein C 62.0 kDa ve LYZ 14.0 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Aptamer temelli kriyojeller için adsorpsiyon kapasitesi değerleri karşılaştırıldığında, Aptamer temelli kriyojelin hedef protein molekülü için daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi gösterirken yarışmacı proteinler için daha düşük olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin kalıp (Protein C) ve yarışmacı (BSA ve LYZ) proteinleri adsorpsiyonu. Çalışma tamponu: pH 7.4, T: 37°C, protein derişimleri: 1.5 mg/mL, m<sub>kuru</sub> kriyojel: 19 mg.

#### 4.8. Yapay Plazmadan Protein C Safılaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE İle Görüntüleme

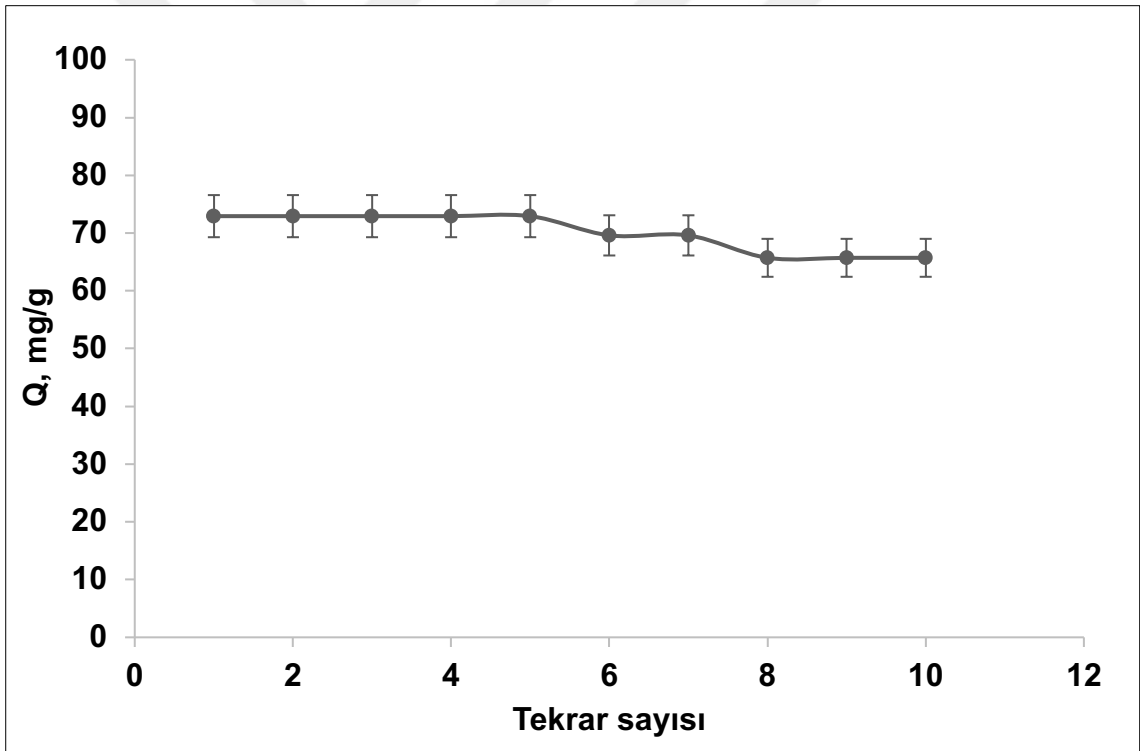
Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel ile yapay plazmadan saflaştırılmış olan Protein C'nin moleköl ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile analiz edildi Şekil 4.21'de desorpsion sonrası elde edilen bantta Protein C'nin yoğun bandı açıkça görölmektedir. Ancak bu banda ek olarak, daha düşük moleköl ağırlıklardaki tipik bant şeklinden de göröleceği gibi albümin bantı da görölebilir. BSA ve LYZ proteinlerinin plazma derişimleri arasındaki yüksek fark bu durumu neden olmaktadır.



Şekil 4.21. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Standart Protein C solüsyonu, Sıra 1. Protein C saflaştırılmasından önce plazma, Sıra 2. Protein C saflaştırılmasından sonra plazma, Sıra 3. desorpsiyon numunesi. Sıra 4. Biobelirteç (Fermentas).

#### 4.9. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması

Genel olarak, kriyojellerin yeniden kullanılabilirlik etkinliğinin artırılması bu malzemelerin hem laboratuvar çalışmaları hem de ticari uygulamaları için daha uygun hale getirilmesinde çok önemli bir adımdır. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranlar ile %96.11 oranında yüksek desorpsiyon değeri elde edilmiştir ve tekrarlı on adsorpsiyon- desorpsiyon döngüsü ardından kriyojel membranlar ile bağlama kapasitesinin yaklaşık %96.11'ünü korumuştur. Dahası, Poli(HEMA) temelli kriyojeller uygun maliyetli destek malzemelerdir. Bu avantajlar sayesinde Aptamer bazlı kriyojel membranlar PC için immünoafiniteye alternatif bir materyal olarak kullanılabilir. Aptamer temelli kriyojel membranların tekrar kullanılabilirliği Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojelin tekrar kullanılabilirliği. Aktive Protein C derişimi: 1.5 mg/mL; Adsorpsiyon pH: 7.4; Desorpsiyon ajanı: 0.1 M NaCl; T: 25°C.

#### 4.10. Literatür Karşılaştırması

Protein C saflaştırılması için yapılmış çalışmaların bir özeti Çizelge 4.5'de sunulmaktadır. Burada verilen çalışmaları incelediğimiz de literatüre aptamer

temelli kriyojel membranlar ile hazırladığımız tez çalışmamızın yeni bir çalışma olduğunu görmekteyiz. Binnaz ve ark. PC saflaştırılması için moleküler baskılanmış monolitik kolon sentezlemişlerdir. 0.5 mg/mL ve 3.0 mg/mL derişim aralığında PC adsorpsiyonu incelenmiş ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi 30.4 mg/g olarak bulunmuştur [126]. Bir diğer çalışma da Çimen ve ark. İmmobilize metal afinite kromatografisi tekniğini kullanarak manyetik nanopartiküller sentezlemişler. Bu çalışmada üç farklı metal iyonu kullanılmış ve PC adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. PC için derişim aralığı 0.1 mg/mL ve 2.0 mg/mL seçilmiştir. PC maksimum adsorpsiyon kapasitesi farklı metal immobilize Ni(II), C(II) ve Z(II) nanopartiküller için sırasıyla 589.22 mg/g, 436.33 mg/g ve 388.15 mg/g bulunmuştur [127]. Orther ve ark. PC saflaştırılması için immunoafinite kolon performansını değerlendirmişlerdir. PC karşı spesifik monoklonal antibadiler kullanılmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi 15.0 µg/mL olarak rapor edilmiştir [128].

Çizelge 4.5. Protein C saflaştırılması için yapılan çalışmaların literatür karşılaştırılması çizelgesi.

Malzeme	Yöntem	Derişim aralığı mg/mL	Adsorpsiyon kapasitesi mg/g	Kaynaklar
<b>Kriyojel monolitik kolon</b>	Moleküler baskılama tekniği	0.5-3.0	30.4	[126]
<b>Manyetik nanopartiküller</b>	İmmobilize metal şelat afinite kromatografisi	0.1-2.0	589.22 Ni(II) 436.33 Cu(II) 388.15 Zn(II)	[127]
<b>Gel</b>	İmmunoafinite kolonu	0.25	0.015	[128]
<b>Kriyogel membranlar</b>	Spesifik DNA Aptamer ligand	0.1-4.0	89.02	<i>Bu tez çalışması</i>

## 5. YORUM

- Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması kapsamında, Aktive Protein C saflaştırılması için APC spesifik DNA aptameri immobilize edilmiş PHEMA-GMA kriyojel membranlar sentezlenmiştir.
- PHEMA, PHEMA-GMA ve Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranların yapısı FTIR, yüzey alanı ölçümleri ve SEM yöntemleri ile karakterize edilerek PHEMA, PHEMA-GMA kriyojel membranların başarıyla sentezlendiği sonucuna varılmıştır.
- Yüzey alanı BET yöntemi ile hesaplanarak sırasıyla Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin yüzey alanı  $6.45 \text{ m}^2/\text{g}$ , Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) ise  $9.87 \text{ m}^2/\text{g}$  olduğu bulunmuştur.
- FTIR ile elde edilen fark spektrumları incelenmiştir.  $1258$  ile  $1143 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler C-O gerilme titreşimlerini göstermektedir. FTIR sonuçları PHEMA kriyojellerin sentezlendiğini göstermektedir.
- Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemelerinde, kriyojellerin makrogözenekli yapılar sahip olduğu görülmektedir. Bu makrogözenekli yapılar düşük akış direnci sağlarken sahip oldukları kararlı yapıları sayesinde tekrar tekrar kullanım sağlamaktadır.
- Adsorpsiyon kapasitesi değişimine pH etkisi incelenmiştir. APC adsorpsiyonuna etkisi araştırılmış, maksimum APC adsorpsiyon kapasitesi pH 7.4 fosfat tamponunda elde edilmiştir. pH 7.4 fosfat tamponu APC adsorpsiyon çalışma ortamı olarak seçilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan adsorpsiyon işlemlerinin tamamı pH 7.4 PBS tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PC desorpsiyon ajanı olarak  $1.0 \text{ M}$  NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

- APC ölçüm analizleri UV-spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.
- Akış hızının adsorpsiyon kapasitesine etkisi 95 rpm ve 250 rpm hızları arasında incelenmiştir. 95 rpm hızda adsorpsiyon kapasitesi 75.14 mg/g 250 rpm hızda adsorpsiyon kapasitesi 58.49 mg/g olarak bulunmuştur. Akış hızının artması adsorpsiyon kapasitesini düşürmüştür. Bunun nedeni ise şu şekilde açıklanabilir; Protein C moleküllerinin aptamer temelli kriyojel membran ile etkileşim süresi ve olasılığı azalacağından adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş gözlenir.
- DNA Aptamer immobilize kriyojel membranlar ile APC bağlanma kapasitesini belirlemek amacıyla adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bağlanan APC miktarının çözeltideki protein derişiminin doğrusal bir şekilde artmasıyla doyunluk eğrisinin eğiminde artış olduğu görülmüştür. Belli bir derişim (1.0 mg/ml) sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde kararlılık gözlenmiştir. Maksimum APC adsorpsiyonu sırasıyla 89.02 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler ile Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt) kriyojel membranının yüzey alanının ve adsorpsiyon kapasitesinin arttığını gözlenmiştir.
- Zamanın adsorpsiyon kapasitesi etkisi analizi incelendiğinde, APC adsorpsiyonun hızlı bir şekilde ilerlediği yaklaşık 90 dakika içinde optimum doyunluk seviyesine ulaştığı görülmüştür. Bu dakikada APC için 89.02 mg/g kriyojel polimer değerlerine ulaşıldığı rapor edilmiştir.
- Deneysel verilere göre Aptamer immobilize PHEMA-GMA kriyojel membranları için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 89.02 mg/g'dır. Langmuir adsorpsiyon izotermi ile hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi 91.74 mg/g ve Freundlich adsorpsiyon izotermi için 49.40 mg/g'dır. Sonuçlar değerlendirildiğinde sentezlenen kriyojel membran

malzemesinin Langmuir izotermine daha uygun olduğu görülmüş ve Aktive PC adsorpsiyonunun tek tabakalı (mono-layer) adsorpsiyon sistemi olduğu tespit edilmiştir.

- Adsorpsiyon kinetiğini analiz edilebilmek için deneysel verilere yalancı-birinci derece ve yalancı-ikinci derece kinetik modelleri uygulandı. Deneysel ve kinetik hesaplamalardan elde edilen  $Q_e$  değerlerinin birbirine yakın olduğu bulunmuştur. Aptamer immobilize adsorban sisteminin, maksimum adsorpsiyon kapasitesi 93.45 mg/g olan yalancı ikinci derece kinetik model için uygun olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, APC'nin Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranları ile adsorpsiyonunun kimyasal kontrollü gerçekleştiğini göstermiştir.
- Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranın APC adsorpsiyonuna sıcaklık değişiminin etkisi 4°C-40°C arasında denenmiştir. En yüksek adsorpsiyon değeri 25°C'de gözlemlenmiştir ve kriyojelin denge adsorpsiyonu sıcaklığın bu sıcaklıktan itibaren artması ve azalması ile azalma göstermiştir. Bu sonuç Aptamer temelli polimerinin oda sıcaklığında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.
- Tuz derişimi ile iyonik etkileri belirlemek amacıyla farklı derişimde NaCl içeren çözeltiler ile gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmaları sonucunda tuz derişimi arttıkça adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Ortamda tuz olmadığında adsorpsiyon kapasitesi 72.92 mg/g'dır. 1.0 M NaCl derişiminde adsorpsiyon kapasitesi 9.98 mg/g bulunmuştur. Bu azalmanın nedeni artan tuz derişimi Protein C ile Aptamer etkileşiminin zayıflamasına sebep olmuştur.
- Spesifik DNA Aptameri immobilize edilen kriyojel membranların Aktive PC'ye karşı seçici olduğunu ispatlamak için farklı proteinler ile karşılaştırılmalı adsorpsiyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaç için BSA,

LYZ ve IgG proteinleri kullanılmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi BSA, LYZ ve IgG için sırasıyla 2.98 mg/g, 5.96 mg/g ve 116.87 mg/g olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde Aptamer temelli kriyojel membranının 72.92 mg/g adsorpsiyon kapasitesi ile PC'ye karşı yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu görülmektedir.

- Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları 10 defa ardarda adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması ile aynı kriyojel membranlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. APC desorpsiyonun yüksek oranda (%96.11) olması Poli(HEMA-GMA/DNA-Apt-1) kriyojel membranların adsorpsiyon kapasitesinde önemli ölçüde düşüş olmaksızın kullanılabilirliğini göstermiştir.
- Son olarak Protein C saflaştırılması SDS-PAGE kullanılarak kontrol edilmiştir. Yapay plazmada yapılan çalışmalar sonucunda Protein C saflaştırılması başarıyla gerçekleştirilmiştir.
- Yüksek Lisans tez çalışmaları boyunca spesifik APC-DNA aptameri immobilize kriyojel membranlar hazırlanmış ve aktive protein C saflaştırılmasında kullanılmıştır. Deneysel sonuçlara bakıldığında hazırlanan kriyojel membranların, yapay plazma APC seçici olarak etkin bir şekilde saflaştırılması işleminde kullanılacağını gösterilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Oto, J., Pardo A.F., Miralles, M., Plana, E., España, F., Navarro, S., Medina, P., Activated protein C assays: A review, *Clinica Chimica Acta*, 227–232, **2020**
- [2] Kisiel, W., Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin, *Journal of Clinical Investigation* **64(3)**, 761-769, **1979**
- [3] Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D.P., Tuddenham, E.G.D. (Eds.), *Haemostasis and Thrombosis*, Chapter 1, **1994**
- [4] Dang, Q.D., Guinto, E.R., Di Cera, E., *Nature Biotechnology* 13, 146, **1987**
- [5] Bakhshpour, M., Özgür, E., Bereli, N., Adil Denizli, A., Microcontact imprinted quartz crystal microbalance nanosensor for protein C recognition *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 151, 264–270, **2017**
- [6] Wu, H., Bruley, D., Chelator, metal ion and buffer studies for protein C separation, *Biochemistry and Physiology Part A* 132, p 213, **2002**
- [7] Ni, S., Zhuo, Z., Pan, Y., Yu, Y., Li, F., Liu, J., Wang, L., Wu, X., Li, D., Wan, Y., Zhang, L., Yang, Z., Zhang, B.T., Lu, A., Zhang G., Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications *ACS Applied Materials & Interfaces* 13, 8, 9500–9519, **2021**

- [8] Zhou, X., Zhu, Q., Yang, Y., Aptamer-integrated nucleic acid circuits for biosensing: Classification, challenges and perspectives, *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112422, **2020**
- [9] Moez, E., Noel, D., Brice, S., Benjamin, G., Pascaline, A., Didier, M., Aptamer assisted ultrafiltration cleanup with high performance liquid chromatography-fluorescence detector for the determination of OTA in green coffee, *Food Chemistry*, Volume 310, 125851, **2020**
- [10] Akgönüllü, S., Yavuz, H., Denizli, A., Preparation of imprinted cryogel cartridge for chiral separation of l-phenylalanine, *Artificial Cell Nanomedicine and Biotechnology*, 45 (4), 800–807, **2016**
- [11] Andaç, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, **Journal of Chromatography B**, **Volume 1021**, p 69-80, **2016**
- [12] Deng, B., Lin, Y., Wang, C., Li, F., Wang, Z., Zhang, H., Le, X.C., Aptamer binding assays for proteins: the thrombin example-a review, *Analytica Chimica Acta* 837, 1-15, **2014**
- [13] Pichon, V., Brothier, F., Combes, A., Aptamer-based-sorbents for sample treatment-a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 681-698, **2015**
- [14] Jayasena, S.D., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry* 45, 1628-1650, **1999**
- [15] Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A., Aptamers as therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 537-550, **2010**

- [16] Zhang, X., Zhu, S., Deng, C., Zhang, X., Highly sensitive thrombin detection by matrix assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry with aptamer functionalized core-shell  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Au}$  magnetic microspheres, *Talanta* 88, 295-302, **2012**
- [17] Du, F., Alam, M.N., Pawliszyn, J., Aptamer-functionalized solid phase micro extraction/liquid chromatography/tandem mass spectrometry for selective enrichment and determination of thrombin, *Analytica Chimica Acta* 845, 45-52, **2014**
- [18] Wang, Z., Zhao, J.C., Lian, H.Z., Chen, H., Aptamer-based organic-silica hybrid affinity monolith prepared via "thiol-ene" click reaction for extraction of thrombin, *Talanta* 138, 52-58, **2015**
- [19] Chen, Y., Deng, N., Wu, C., Liang, Y., Jiang, B., Yang, K., Zhang, Y., Aptamer functionalized hydrophilic polymer monolith with gold nanoparticles modification for the sensitive detection of human a-thrombin, *Talanta* 154, 555-559, **2016**
- [20] Sun, H., Zhu, X., Lu, P.Y., Rosato, R.R., Tan, W., Zu, Y., Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3(8):e182, **2014**
- [21] Zhao, Q., Li, X.F., Le, X.C., Aptamer-modified monolithic capillary chromatography for protein separation and detection, *Analytical Chemistry* 80, 3915-3920, **2008**
- [22] Zhao, Q., Li, X.F., Shao, Y., Le, X.C., Aptamer-based affinity chromatographic assays for thrombin, *Analytical Chemistry* 80, 7586-7593, **2008**

- [23] Han, B., Zhao, C., Yin, J., Wang, H., High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme, *Journal of Chromatography B* 903, 112-117, **2012**
- [24] Acquah, C., Danquah, M.K., Chan, Y.W., Moy, C.K., Ongkudon, C.M., Lau, S.Y., Chromatographic characterisation of aptamer-modified poly (EDMA-co-GMA) monolithic disk format for protein binding and separation, *Separation Science and Technology* 53, 2100-2111, **2018**
- [25] Chen, Y., Deng, N., Wu, C., Liang, Y., Jiang, B., Yang, K., Zhang, Y., Aptamer functionalized hydrophilic polymer monolith with gold nanoparticles modification for the sensitive detection of human a-thrombin, *Talanta* 154, 555-559, **2016**
- [26] Marechal, A., Jarrosson, F., Randon J., Dugas, V., Demesmay, C., In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1406, 109-117, **2015**
- [27] Chen, Y., Chen, M., Chi, J., Yu, X., Chen, Y., Lin, X., Xie, Z., Aptamer-based polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS)-containing hybrid affinity monolith prepared via a “one-pot” process for selective extraction of ochratoxin A, *Journal of Chromatography A* 1563, 37-46, **2018**
- [28] Yu, X., Lai, S., Wang, L., Chen, Y., Lin, X., Xie, Z., Preparation of aptamer-bound polyamine affinity monolithic column via a facile triazine-bridged strategy and application to on-column specific

discrimination of ochratoxin A, *Journal of Separation Science* 42, 2272-2279, **2019**

[29] Chi, J., Chen, M., Deng, L., Lin, X., Xie, Z., A facile AuNPs@aptamer-modified mercaptosiloxane-based hybrid affinity monolith with an unusually high coverage density of aptamer for on-column selective extraction of ochratoxin A, *Analyst* 143, 5210-5217, **2018**

[30] Yu, X., Song, H., Huang, J., Chen, Y., Dai, M., Lin, X., Xie, Z., An aptamer@AuNP- modified POSS-epolyethylenimine hybrid affinity monolith with a high aptamer coverage density for sensitive and selective recognition of ochratoxin A, *Journal of Materials Chemistry B* 6, 1965-1972, **2018**

[31] Vergara-Barberan, M., Carrasco-Correa, E.J., Lerma-García, M.J., Simo-Alfonso, E.F., Herrero-Martínez, J.M., *Analytica Chimica Acta*, 1084, 1-20, **2019**

[32] Tuerk, C., Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249:505–10, **1990**

[33] Ellington, A.D., Szostak, J.W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346:818–22, **1990**

[34] James, W.C., Aptamers. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; p. 4848–71, **2000**

- [35] Lou, X., Qian, J., Xiao, Y., Viel, L., Gerdon, A.E., Lagally, E.T., et al. Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106:2989–94, **2009**
- [36] Oh, S.S., Qian, J., Lou, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Soh, H.T., Generation of highly specific aptamers via micromagnetic selection. *Analytical Chemistry*, 81:5490–5, **2009**
- [37] Elshafey, R., Siaj, M., Zourob, M., In vitro selection, characterization, and biosensing application of high-affinity cylindrospermopsin-targeting aptamers. *Analytical Chemistry*, 86: 9196–203, **2014**
- [38] Kim, Y.S., Gu, M.B., Advances in aptamer screening and small molecule aptasensors. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 140:29–67, **2014**
- [39] Lin, H.I., Wu, C.C., Yang, C.H., Chang, K.W., Lee, G.B., Shiesh, S.C., Selection of aptamers specific for glycated hemoglobin and total hemoglobin using on-chip SELEX. *Lab Chip*, 15: 486–94, **2014**
- [40] Liu, Y., Kuan, C.T., Mi, J., Zhang, X., Clary, B.M., Bigner, D.D., Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis, *Biological Chemistry* 390:137–44, **2009**
- [41] Avci-Adali, M., Metzger, M., Perle, N., Ziemer, G., Wendel, H.P., Pitfalls of cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX): existing dead cells during in vitro selection anticipate the enrichment of specific aptamers. *Oligonucleotides*,

20(6):317–23, **2010**

- [42] Wu, Y.X., Young Jik Kwon, Y.J., Aptamers: The “evolution” of SELEX, *Methods* 106, 21–28, **2016**
- [43] Chaou, T., Vialet, B., Azéma, L., DNA aptamer selection in methanolic media: adenine-aptamer as proof-of-concept. *Methods*, 97:11–19, **2016**
- [44] Cho, S.Y., Kang S.Y., Kong Y., Purification of antigenic protein of sparganum by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Kisaengchunghak Chapchi*, 28:135–142, **1990**
- [45] Regnault, V., Rivat, C., Pfister, M., Stoltz, JF., Monoclonal antibodies against human plasma protein C and their uses for immunoaffinity chromatography. *Thrombosis Research*, 63:629–640, **1991**
- [46] Song, K.M., Lee, S., Ban, C., Aptamers and their biological applications. *Sensors*, 12:612–631, **2012**
- [47] Ferreira, CS., Missailidis, S., Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50:63–76, **2007**
- [48] Kim, H.C., McMillan, C.W., White, G.C., Bergman G.E., Horton, M.W., Saidi, P., Purified factor IX using monoclonal immunoaffinity technique: clinical trials in hemophilia B and comparison to prothrombin complex concentrates. *Blood*, 79:568–575, **1992**

- [49] Pålsson, E., Smeds A.L., Petersson A., Larsson P.O., Faster isolation of recombinant factor VIII SQ, with a superporous agarose matrix. *Journal of Chromatography A*, 840:39–50, **1999**
- [50] Tiede, A., Klamroth, R., Oldenburg, J., Turoctocog alfa (recombinant factor VIII). Manufacturing, characteristics and clinical trial results. *Hamostaseologie*, 35:364–371, **2015**
- [51] Hage, D.S., Periodate oxidation of antibodies for site-selective immobilization in immunoaffinity chromatography. *Methods in Molecular Biology* 147:69–82, **2000**
- [52] Fleminger, G., Hadas, E., Wolf, T., Solomon, B., Oriented immobilization of periodate-oxidized monoclonal antibodies on amino and hydrazide derivatives of Eupergit C. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 23:123–137, **1990**
- [53] Wang, H., Liu, Y., Yang, Y., Deng, T., Shen, G., Yu R A protein A-based orientation-controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer-sized gold particles and plasma-polymerized film. *Analytical Biochemistry*, 324:219–226, **2004**
- [54] Ikeda, T., Hata, Y., Ninomiya K., Ikura, Y., Takeguchi, K., Aoyagi, S., Hirota, R., Kuroda, A., Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A. *Analytical Biochemistry*, 385:132–137, **2009**
- [55] Tajima, N., Takai, M., Ishihara, K., Significance of antibody orientation unraveled: well-oriented antibodies recorded high binding affinity. *Analytical Chemistry*, 83:1969–1976, **2011**

- [56] Seifert, A., Anti-fibrinogen aptamers and uses thereof, WO 2018/007530, **2019**
- [57] Seifert, A., Anti-immunoglobulin G aptamers and uses thereof, WO 2018/019538, **2019**
- [58] Inomata, E., Tashiro, E., Miyakawa, S., Nakamura, Y., Akita, K., Alkaline-tolerant RNA aptamers useful to purify acid-sensitive antibodies in neutral conditions. *Biochimie*, 145:113–124, **2018**
- [59] Perret, G., Boschetti, E., Aptamer-Based Affinity Chromatography for Protein Extraction and Purification, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **2019**
- [60] Perret, G., Boschetti, E., Aptamer affinity ligands in protein chromatography, *Biochimie*, 145, 98–112., **2018**
- [61] Franzreb, M., Siemann-Herzberg M., Hobbey T.J., Thomas O.R.T., Protein purification using magnetic adsorbent particles, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, pp. 505-516, **2006**
- [62] Akgönüllü, S., Bakhshpour, M., Neslihan, İ., Andaç, M., Yavuz, H., Denizli, A., Versatile polymeric cryogels and their biomedical applications, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 48 (2), 99-118, **2020**
- [63] Lu, Y., Biswas, I., Villoutreix, B.O., Rezaie, A.R., Role of Gly197 in the structure and function of protein C, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* Volume 1865, Issue 6, 129892, **2021**

- [64] Bock, F., Shahzad, K., Vergnolle, N., Isermann, B., Activated protein C based therapeutic strategies in chronic diseases, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 111: 610–617, **2014**
- [65] Mosnier, L.O., Activated protein C in neuroprotection and malaria, *Current Opinion in Hematology*, 26:320–330, **2019**
- [66] Rawlings, N.D., Salvesen, G., *Handbook of Proteolytic Enzymes, Protein C s.2932-2935*, Academic Press, USA, **2013**
- [67] Josic, D., Hoffer, L., Buchacher, A., Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor protein C *Journal of Chromatography B*, 790, pp. 183-197., **2003**
- [68] Griffin, J.H., Fernandez, J.A., Gale, A.J., Mosnier, L.O., Activated protein C *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, pp. 73-80, **2007**
- [69] Esmon, C.T., The protein C pathway *Chest*, 124, pp. 26-32, **2003**
- [70] Erdem, A., Congur, G., Dendrimer enriched single-use aptasensor for impedimetric detection of activated protein C *Colloid and Surfaces B*, 117, pp. 338-345, **2014**
- [71] Koyun, S., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Erdem, A., Denizli, A., Surface plasmon resonance aptasensor for detection of human activated protein C, *Talanta* 194, 528–533, **2019**

- [72] España, F., Vayá, A., Mira, Y., et al. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous Journal of Thrombosis and Haemostasis, 86, pp. 1368-1373, **2001**
- [73] Griffin, J.H., Fernandez, J.A., Gale, A.J., Mosnier, L.O., Activated protein C. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 5 (Suppl. 1): 73–80, **2007**
- [74] Stenflo, J., A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. Journal of Biological Chemistry, 251: 355–63, **1976**
- [75] Gruber, A., Griffin J.H., Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. Blood, 79: 2340–8, **1992**
- [76] Gunko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S.V., Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, Advances in Colloid and Interface Science, 187-188, 1–46, **2013**
- [77] Ertürka, G., Mattiasson, B., Cryogels-versatile Tools in Bioseparation, Journal of Chromatography A, 1357 24–35, **2014**
- [78] Demirci, B., Protein C Saflaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Adsorbentler, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, **2013**
- [79] Akgönüllü, S., L-Fenilalanin'in Tanınmasına Yönelik Afinite Kartuşlarının Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, **2013**

- [80] Denizli, A., Andaç, M., Galaev, I.Y., Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, *Journal of Chromatography B*, 1570-0232, **2015**
- [81] Hage, D.S., (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, second ed., CRC Press, Boca Raton, **2006**
- [82] Turkova, J., *Affinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, **1978**
- [83] Reichelt, S., (Ed.), *Affinity Chromatography Methods in Molecular Biology*, Springer, New York, **2015**
- [84] Walters, R.R., Affinity chromatography, *Analytical Chemistry* 57, 1099A–1114A, **1985**
- [85] Wilchek, M., Affinity chromatography, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 123, 175–187, **1984**
- [86] Pfaunmiller, E.L., Bas, J., Brooks, M., Milanuk, M., Rodriguez, E., Vargas J., Matsuda R., Hage D.S., Affinity chromatography, in: J. Anderson, A. Berthod, V. Pino, A. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science*, Vol. 2, Part 1, Wiley, New York, pp. 461–482, **2016**
- [87] Hage, D.S., Ruhn, P.F., An introduction of affinity chromatography, in: D.S. Hage (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 3–13, **2006**

- [88] Hage, D.S., Xuan, H., Nelson, M.A., Application and elution in affinity chromatography, in: D.S. Hage (Ed.), Handbook of Affinity Chromatography, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 79–97, **2006**
- [89] Zopf, D., Ohlson, S., Weak-affinity chromatography, *Nature* 346, 87–88, **1990**
- [90] Zhang, C., Rodriguez, E., Bi, C., Zheng, X., Suresh, D., Suh, K., Li, Z., Elsebaei, F., Hage, D.S., High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents, *Analyst* 143, 374–391, **2018**
- [91] Chaiken, I.M., (Ed.), Analytical Affinity Chromatography, CRC Press, Boca Raton, **1987**
- [92] Hage, D.S., High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding, *Journal of Chromatography B* 768, 3–30, **2002**
- [93] Hage, D.S., Chen, J., Quantitative affinity chromatography: practical aspects, in: D.S. Hage (Ed.), Handbook of Affinity Chromatography, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 595–628, **2006**
- [94] Winzor, D.J., Quantitative affinity chromatography: recent theoretical developments, in: D.S. Hage (Ed.), Handbook of Affinity Chromatography, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 629–662, **2006**
- [95] Bi, C., Beeram, S., Li Z., Zheng, X., Hage, D.S., Kinetic analysis of drug-protein interactions by affinity chromatography, *Drug Discovery*

Today: Technologies 17, 16–21, **2015**

[96] Hage, D.S., Matsuda R., Affinity chromatography: a historical perspective, in: S. Reichelt (Ed.), *Affinity Chromatography Methods in Molecular Biology*, Springer, New York, pp. 1–19, **2015**

[97] Roque, A.C.A., Lowe, C.R., Affinity chromatography: history, perspectives, limitations and prospects, *Methods in Molecular Biology* 421, 1–21, **2008**

[98] Starckenstein, E., Fermentation and the influence upon it of neutralsalts, *Biochemische Zeitschrift*, 24, 210–218, **1910**

[99] Tswett, M.S., The chemistry of chlorophyll, phylloxanthin, phyllocyanin, and chlorophyllane, *Biochemische Zeitschrift*, 5, 6–32, **1907**

[100] Ambard, L., Studies on the estimation of amylase and the mechanism of its action, *Bulletin de la Société de chimie biologique (Paris)* 3, 51–65, **1921**

[101] Holmbergh, O., Adsorption of  $\alpha$ -amylase from malt by starch, *Biochemische Zeitschrift*, 258, 134–140, **1933**

[102] Tokuoka, Y., Koji amylase IX: Existence of  $\beta$ -amylase, *Journal of the Agricultural Chemical Society*, 13, 586–594, **1937**

[103] Hockenull, D.J.D., Herbert, D., The amylase and maltase of *Clostridium acet-obutylicum*, *Biochemical Journal* 39, 102–106, **1945**

- [104] Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Memman, F., Pancreatic enzymes. I. Determination of pancreatic fat hydrolysis, *Zeitschrift Fur Physiological Chemistry* 125, 93–131, **1923**
- [105] Northrop, J.H., Crystalline pepsin: VI. Inactivation by beta and gamma rays from radium and by ultra-violet light, *Journal of General Physiology* 17, 359–363, **1934**
- [106] Lineweaver, H., Jang, R., Jansen, E.F., Specificity and purification of polygalacturonase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 20, 137–152, **1949**
- [107] Grant, N.H., Robbins, K.C., Studies on porcine elastase and proelastase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 66, 396–403, **1957**
- [108] D'Alessandro, G., Sofia, F., The adsorption of antibodies from the sera of syphilitics and tuberculosis patients, *Z. Lmmunitats.* 84, 237–250, **1935**
- [109] Meyer, K., Pic, A., Isolation of antibodies by fixation on an adsorbent-antigen system with subsequent regeneration, *Annales de l'Institut Pasteur* 56, 401–412, **1936**
- [110] Landsteiner, K., Van der Scheer, J., Cross reactions of immune sera to azoprotein, *Journal of Experimental Medicine*, 63, 325–339, **1936**

- [111] Campbell, D.H., Luecher, E., Lerman, L.S., Immunologic adsorbents I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 37, 575–578, **1951**
- [112] Arsenis, C., McCormick, D.B., Purification of liver flavokinase by column chromatography on flavin-cellulose compounds, *Journal of Biological Chemistry* 239, 3093–3097, **1964**
- [113] Arsenis, C., McCormick, D.B., Purification of flavin mononucleotide-dependent enzymes by column chromatography on flavin phosphate cellulose compounds, *Journal of Biological Chemistry* 241, 330–334, **1966**
- [114] Hjerten, S., The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects* 79, 393–398, **1964**
- [115] Axen, R., Porath, J., Ernback, S., Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature* 214, 1302–1304, **1967**
- [116] Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen C.B., Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 61, 636–643, **1968**
- [117] Ghosh, G., Huang, D.B., Huxford, T., Molecular mimicry of the NF-kappaB DNA target site by a selected RNA aptamer. *Current Opinion in Chemical Biology* 14, 21–27, **2004**
- [118] Romig, T.S., Bell, C., Drolet, D.W., Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *Journal of*

Chromatography B, 731, 275–284, **1999**

- [119] Blank, M., Blind, M., Aptamers as tools for target validation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 336–342, **2005**
- [120] Forier, C., Boschetti, E., Ouhammouch M., Cibiel A., Ducongé F., Nogré M., Tellier M., Bataille D., Bihoreau N., Santambien P., Chtourou S., Perret G., DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources *Journal of Chromatography*, 1489, 39-50, **2017**
- [121] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 272-279, **2009**
- [122] Çorman, M.E., Armutcu, C., Özkara, S., Uzun, L., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogel cartridges for the specific filtration and rapid separation of interferon alpha, *RSC Advances*, 5, 45015-45026, **2015**
- [123] García-González, A., Zavala-Arcea, R.E., Avila-Pérez, P., Rangel-Vazquez, N.A., Salazar-Rábago, J.J., García-Rivasa, J.L., García-Gaitána, B., Experimental and theoretical study of dyes adsorption process on chitosan-based cryogel, *International Journal of Biological Macromolecules* 169, 75-84, **2021**
- [124] Akgönüllü, S., Yavuz, H., Denizli, A. Development of Gold Nanoparticles Decorated Molecularly Imprinted–Based Plasmonic Sensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Milk Samples. *Chemosensors* 9, 363, **2021**.

- [125] Sangu, H.D., Akgönüllü, S. & Denizli, A. Ion-imprinted-based nanochelators for iron(III) removal from synthetic gastric fluid. *Polymer Bulletin* **2021**
- [126] B. Demirci, N. Bereli, S. Aslıyüce, G. Baydemir, A. Denizli Protein C recognition by ion-coordinated imprinted monolithic cryogels, [Journal of Separation Science](#) 40(7), 1610-1620, **2017**
- [127] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Metal-chelated magnetic nanoparticles for protein C purification, *Separation Science and Technology*, 55(13), 1-10 **2019**
- [128] Kang, K., Ryu, D., Drohan, W.N. and Orthner, C.L. Effect of matrices on affinity purification of protein C. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 1086-1096, **1992**