

**“ETİKETSİZ” APTAMER İMMOBİLİZASYONU İÇİN YENİ  
BİR YÖNTEMİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF A NOVEL TECHNIQUE FOR “TAG-  
FREE” APTAMER IMMOBILIZATION**

**OZAN SELVİ**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

**2009**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

**Başkan** : .....  
Prof. Dr. Tülin Kutsal

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

**Üye** : .....  
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

**Üye** : .....  
Yar. Doç. Dr. İsmail Cengiz Koçum

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

## ONAY

Bu tez ...../...../2009 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

...../...../2009

Prof. Dr. Erdem Yazgan  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## **“Etiketsiz” Aptamer İmmobilizasyonu İçin Yeni Bir Yöntemin Araştırılması.**

**Ozan Selvi**

### **ÖZ**

Sunulan çalışmanın amacı, aptamer moleküllerinin yapılarında herhangi bir kimyasal modifikasyon gerçekleştirilmeden tutuklanmasını sağlamak için “etiketsiz” bir aptamer immobilizasyon yönteminin araştırılmasıdır. Araştırma sürecinde model aptamer sistemi olarak 29 bazlık HD-22 trombin aptameri kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında, HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler ve reaksiyonlar, İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) cihazı kullanılarak incelenmiştir. HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu yine ITC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

“Etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesi için immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi sürecinde Kuartz Kristal Mikrobalans (QCM) sistemi kullanılmıştır. QCM kristallerinin yüzeyi plazma polimerizasyonu yöntemiyle yüzeyde (-PO<sub>3</sub>) grupları oluşturulacak şekilde modifiye edilmiştir. Plazma polimerizasyon parametreleri, yüzeye bağlanan oligonükleotid miktarı ve kaplamaların sulu ortamdaki stabiliteleri cinsinden optimize edilmiştir. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyon yöntemi ile “etiketli” aptamer immobilizasyonu, yüzeye bağlanan oligonükleotid moleküllerinin sayısı cinsinden, aldehit grubu ile işaretlenmiş oligonükleotid immobilizasyonu gerçekleştirilerek kıyaslanmıştır.

Çalışmanın son basamağında HD-22 trombin aptamerinin, “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin sonucunda trombin enzime karşı gösterdiği etkileşim, öncelikle serbest HD-22 aptameri ile trombin enzimin ITC cihazı ile elde edilen deneysel karakteristik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Yine bu süreç içerisinde “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin ile geleneksel aptamer immobilizasyon yöntemlerinin verimlilikleri kıyaslanmıştır.

Bu alışma sonucunda, "etiketsiz" immobilizasyon yöntemiyle kristal yüzeyine tutuklanan HD-22 DNA aptamerinin, ayrılma sabiti  $k_d=0.05$  nM olarak hesaplanmıştır. Bu değer "etiketsiz" immobilizasyon yönteminin alternatiflerine kıyasla çok daha başarılı bir immobilizasyon yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer, immobilizasyon, plazma polimerizasyonu, izotermal titrasyon kalorimetre (ITC), trombin, trombin aptameri, kuartz kristal mikrobals (QCM)

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe Üniversitesi, Mhendislik Fakültesi.

## **Investigation of A Novel Technique for “Tag-Free” Aptamer Immobilization.**

**Ozan Selvi**

### **ABSTRACT**

The purpose of this research is to investigate a “tag-free” aptamer immobilization technique for developing a novel methodology for aptamer immobilization that can stabilize the conformation of aptamers via plasma polymerization technique. The model aptamer system that has been chosen for this study is, a 29-oligonucleotide sequence, referred to as HD-22 thrombin binding aptamer.

Characterization of the interactions between HD-22 and thrombin enzyme have been performed by using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) device. Furthermore, ITC device has been used to study the thermodynamic properties of HD-22 aptamer-thrombin complex.

Parameters of “tag-free” aptamer immobilization process have been investigated by using Quartz Crystal Microbalance (QCM) measurement system. QCM crystals have been modified via plasma polymerization to form (-PO<sub>3</sub>) groups at the surface. Plasma polymerization parameters have been optimized with respect to the amount of the immobilized oligonucleotides and aquatic stability of the coating. Furthermore amounts of immobilized oligonucleotides via “tag-free” aptamer immobilization process have been compared with the classical aptamer immobilization techniques.

Interaction of free HD-22 aptamer and thrombin enzyme after “tag-free” aptamer immobilization process, have been compared with the thermodynamic characteristics of free HD-22 trombin aptamer-thrombin complex. Thermodynamic interactions had been determined by performing ITC analysis of free HD-22 trombin aptamer-thrombin complex in the Phosphate Buffered Saline (PBS) solution. Moreover within this research, productivity of both “tag-free” aptamer immobilization process and classical aptamer immobilization techniques has been compared.

Binding affinity of HD-22 DNA aptamer that have been immobilized at the surface of the QCM crystal, have been determined as  $k_d=0.05$  nM. Hence, the success of the “tag-free” aptamer immobilization process has been demonstrated by the comparisons of this binding affinity value with the possible alternative methods.

**Keywords:** Aptamer, immobilization, plasma polimerization, isothermal titration calorimetry (ITC), thrombin, thrombin binding aptamer, quartz crystal microbalance (QCM)

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

## **TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın oluőumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında, ilgi, destek ve bilgisini esirgemeyen, tez danıőmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu' ya,

Tez çalıősam boyunca bilgilerini, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Ebru Akdoğan ve Serkan Orcan'a,

Çalıőmam süresince gösterdikleri sabır ve destekleri için dostlarıma, aileme ve özellikle Esin Hezer'e teőekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Aptamer .....	4
2.2. SELEX Yöntemi .....	7
2.3. Aptamer Moleküllerinin Kararlılığı .....	12
2.3.1. Aptamer Moleküllerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Modifikasyonlar ....	12
2.3.2. Ayna Görüntülü “Spiegelmer” Aptamer Molekülleri .....	13
2.4. Aptamer Moleküllerinin Temel Uygulama Alanları .....	15
2.4.1. Afinite Kromatografisi .....	16
2.4.2. Afinite Kapiler Elektroforez Sistemleri .....	16
2.4.3. Aptamer-tabanlı Biyosensör Sistemleri .....	17
2.4.3.1. Reseptör-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri .....	18
2.4.3.2. Enzim-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri .....	19
2.4.3.3. Antikor-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri .....	19
2.4.3.4. Aptamer-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri .....	20
2.5. Model Aptamer Sistemi .....	20
2.5.1. Trombin Aptameri .....	21
2.6. Plazma Polimerizasyon Tekniği .....	23
2.6.1. Plazmanın Yapısı .....	23
2.6.2. Plazma Polimerizasyonu Hızını Etkileyen Parametreler .....	24
2.6.3. Plazma Polimerizasyonun Mekanizması .....	26
2.6.4. Plazma Polimerizasyon Tekniğinin Avantajları .....	27
2.7. Aptamer Moleküllerinin İmmobilizasyonu .....	28
2.8. Aptamer İmmobilizasyonunun Kimyası .....	30
2.8.1. Altına Doğrudan Bağlanma .....	30
2.8.1.1. Altın Yüzeyle Aptamer İmmobilizasyonu .....	30
2.8.2. Fonksiyonel Olarak Modifiye Edilmiş Yüzeyle Kovalent Bağlanma ..	32

2.8.2.1. Modifiye Yüzeylerin Genel Kimyası .....	32
2.8.2.2. Altın Yüzey Üzerindeki Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM) Üzerine Aptamer Bağlanması .....	32
2.8.2.3. Silikatlar veya Silikon Yüzeyler .....	34
2.8.3. Biyokaplama Teknolojisi .....	34
2.8.4. Aptamer İmmobilizasyonu için Kullanılan Diğer Yüzeyler.....	35
2.8.5. Kritik İmmobilizasyon Parametreleri .....	35
2.8.5.1. Bağlayıcı.....	35
2.8.5.2. Aptamer Moleküllerinin 5' ile 3' Bölgelerinden İmmobilizasyonu ...	37
2.8.5.3. Aptamer Moleküllerinin Rejenerasyonu .....	37
3. MATERYAL ve METOT .....	38
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kimyasal Malzemeler .....	40
3.2. Metot.....	42
3.2.1. Model Aptamer Sisteminin Belirlenmesi .....	42
3.2.2. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) .....	43
3.2.2.1. Örnek Hücresi ve Otomatik Pipet Şırıngasının Temizlenmesi .....	46
3.2.2.2. Örneklerin Hazırlanması .....	46
3.2.2.3. Örneklerin ITC Hücrelerine Yüklenmesi.....	47
3.2.3. Kristal Temizliği .....	47
3.2.4. QCM Sistemiyle Frekans Ölçümü .....	47
3.2.5. Plazma Polimerizasyonu Sistemiyle Yüzey Modifikasyonu .....	48
3.2.6. Yüzey Modifikasyonunun Sulu Ortamdaki Stabilitesinin Belirlenmesi .	49
3.2.7. Aptamer Moleküllerinin Yapısında Aldehit Grubu Oluşturması.....	49
3.2.8. Oligonükleotid İmmobilizasyonu .....	50
3.2.8.1. Plazma Polimerizasyonu-DP Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzele Model Oligonükleotid İmmobilizasyonu.....	50
3.2.8.2. Plazma Polimerizasyonu-DASH Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzele Model Oligonükleotid İmmobilizasyonu.....	50
3.2.9. Yüzey Karakterizasyonu.....	51
3.2.9.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) .....	51
3.2.9.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS).....	51
3.2.10. "Etiketsiz" Aptamer İmmobilizasyonu .....	51
3.2.10.1. HD-22 DNA Aptameri İmmobilizasyonu .....	51
3.2.10.2. İmmobilize HD-22 DNA Aptamerleri Trombin Enzimi Etkileşimi..	52

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	53
4.1. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC).....	53
4.2. Plazma Polimerizasyonu ile Yüzey Modifikasyonu .....	59
4.3. Yüzey Modifikasyonunun Sulu Ortamdaki Stabilesinin Belirlenmesi .....	61
4.4. Oligonükleotid İmmobilizasyonu .....	62
4.4.1. Plazma Polimerizasyonu-DP Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzeyle Oligonükleotid İmmobilizasyonu .....	62
4.4.2. Plazma Polimerizasyonu-DASH Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzeyle Oligonükleotid İmmobilizasyonu .....	64
4.5. İmmobilize Edilen Molekül Sayısının Hesaplanması.....	65
4.6. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) .....	66
4.7. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS).....	68
4.8. “Etiketsiz” Aptamer İmmobilizasyonu .....	73
4.8.1. HD-22 DNA Aptameri İmmobilizasyonu .....	73
4.8.2. İmmobilize HD-22 DNA Aptamerleri Trombin Enzimi Etkileşimi .....	75
5. SONUÇLAR .....	79
6. KAYNAKLAR .....	82
ÖZGEÇMİŞ .....	90

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>B. anthracis</i> sporlarına ve Influenza A virüsüne karşı geliştirilmiş aptamerlerinin MFold programı ile belirlenen ikincil yapıları .....	5
Şekil 2.2. MS2-RNA aptamer molekül kompleksinin X-Ray incelemesi.....	7
Şekil 2.3. SELEX prosesinin içerdiği birbirini takip eden döngüler halinde ilerleyen aşamaların şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.4 Pürin ve pirimidin molekülerinin yapıları .....	13
Şekil 2.5. (D-) aptamer ve (L-) ayna görüntülü “spiegelmer” aptamer moleküllerinin üç boyutlu yapıları .....	15
Şekil 2.6. HD-22 aptamerinin ikincil yapısının konformasyonu ve G-quadruplex formunun oluşumu.....	22
Şekil 2.7. Trombin molekülünün HD-22 aptameri ile gerçekleştirdiği moleküler etkileşim .....	22
Şekil 2.8. Tiyol ucu içeren aptamer moleküllerinin yapıları .....	31
Şekil 2.9. Aptamer moleküllerinin yüzeye kovalent bağlanma reaksiyonlarının kimyası .....	33
Şekil 2.10. Silikat veya silikon yüzeyler üzerine yapılan aptamer immobilizasyonunun genel reaksiyon kimyası.....	34
Şekil 3.1. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) cihazı. ....	44
Şekil 3.2. ITC cihazının hücreleri ve şiringası .....	45
Şekil 3.3. ITC cihazının şiringa sistemi .....	45
Şekil 3.4. Maxtek RQCM ölçüm sistemi .....	48
Şekil 4.1. ITC cihazında gerçekleştirilmiş Th-HD22 ve Th-HD22/PBS deneylerinin kalorimetrik titrasyon sonuçları.....	55
Şekil 4.2. Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verilerinin MicroCal ORIGIN programı ile oluşturulmuş termogramı.....	56
Şekil 4.3. Boş altın yüzey, PP-DP (50W5dk) kaplı yüzey ve PP-DP (50W5dk) kaplı ve poliA DNA fragmanları immobilize edilen yüzeylerin AKM görüntüleri.....	68
Şekil 4.4. Kaplanmamış altın ve PP-DP (50W5dk) kristal yüzeylerinin XPS ile gerçekleştirilen incelemeleri .....	71
Şekil 4.5. Kaplanmamış altın yüzeyi, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyi ve PP-DP (50W5dk)-PoliA DNA fragmanları içeren yüzeyinin XPS spektrası. ....	72

Şekil 4.6. PoliA DNA fragmanları içeren PP-DP (50W5dk)-PoliA yüzeyinin XPS spektrası.....	73
Şekil 4.7. PP-DP (50W5dk-HD22) kristali üzerine immobilize HD-22 DNA aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler .....	75
Şekil 4.8. PP-DP (50W5dk-HD22) kristali üzerine immobilize HD-22 DNA aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimlerin Scatchard plot grafiği .....	77

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.3. Aptamer-ligand etkileşimlerini inceleyen farklı analitik yöntemler .....	29
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan aptamer moleküllerinin primer dizileri .....	41
Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan aptamer molekülleri ve kestirilmiş ikincil yapıları .....	41
Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan monomerler ve bağ enerjileri .....	42
Çizelge 3.5. Çalışma sürecinde uygulanan plazma polimerizasyon parametreleri .....	49
Çizelge 4.1. Th-HD22/PBS termogram verilerine sıralı bağlanma modeli uygulanarak elde edilmiş $K_{b1}$ , $\Delta H_1$ , $\Delta S_1$ ve $K_{b2}$ , $\Delta H_2$ , $\Delta S_2$ değerleri .....	57
Çizelge 4.2. HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu sonucu hesaplanmış Gibbs Serbest Enerji ( $\Delta G$ ) ve Ayrılma Sabiti ( $k_d$ ) değerleri .....	58
Çizelge 4.3. QCM ölçüm sisteminde kullanılan kristallerin plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyonu öncesi ve 25 W, 50 W ve 75 W boşalım gücünde 5 dakika süre ile modifiye edildikten sonraki osilasyon frekansları ile frekans düşüşü .....	60
Çizelge 4.4. 50 W boşalım gücünde 15 ve 25 dakikalık plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyon sürelerinin kristal yüzeyindeki kaplama işlemine etkisi... ..	60
Çizelge 4.5. DP monomeri kullanılarak gerçekleştirilmiş yüzey modifikasyonunun sulu ortamdaki stabilitesi, kristallerin plazma polimerizasyonu işlemi sonrası ve sulu ortamla etkileşimleri sonrası osilasyon frekansları .....	61
Çizelge 4.6. Plazma Polimerizasyonu-DP yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma .....	63
Çizelge 4.7. Plazma Polimerizasyonu-DASH yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma. ....	64
Çizelge 4.8. Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan poliA DNA fragmanları .....	66
Çizelge 4.9. Plazma Polimerizasyonu-DP yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere HD-22 DNA aptameri immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma .....	73
Çizelge 4.10. Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan HD-22 DNA aptameri .....	74

Çizelge 4.11. PP-DP (50W5dk-HD-22) kristalinin yüzeyi üzerindeki trombin miktarı .....	76
Çizelge 4.12. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonu prosesinden sonra HD-22 DNA aptamerinin Scatchard denklemleri kullanılarak hesaplanan Bağlanma Sabiti ( $k_b$ ) ve Ayrılma Sabiti ( $k_d$ ) değerleri .....	77

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

A	: Adenin
AKM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
C	: Sitozin
DASH	: 1,2- Diaminosikloheksan
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DP	: Dietil Fosfit
ELİSA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
G	: Guanin
HD-1	: 15 bazlık DNA fragmanından oluşan trombin aptameri
HD-22	: 29 bazlık DNA fragmanından oluşan trombin aptameri
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
IgE	: Immunoglobulin E
ITC	: İzotermal Titrasyon Kalorimetre
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
poliA	: 10 Adenin bazından oluşan DNA fragmanı
QCM	: Kuartz Kristal Mikrobalans
RNA	: Ribonükleik Asit
SAM	: Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar
SELEX	: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
T	: Timin
U	: Urasil
XPS	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi

## 1. GİRİŞ

Son yıllar içerisinde büyük gelişim göstermekte olan aptamer teknolojisinin, günümüzde terapötik ve moleküler tanı alanlarında yoğunlukla kullanılan protein bazlı antibadi teknolojisinin yerini alacağı öngörülmektedir. Doğal veya yapay DNA/RNA moleküllerinin yapılarında bulundurabildiği aptamer adı verilen oligonükleotid bölgeleri aracılığı ile özgül ligandlara karşı gösterebildiği yüksek afinite ve seçicilik aptamer teknolojisine gösterilen özel ilginin temel nedenini oluşturmaktadır (Bunka et al., 2006; Brody and Gold, 2000).

Aptamer yapılarının antibadilere göre; (1) *in-vitro* ortamda üretilmeleri, (2) geniş spektrum içerisinde tanıma gerçekleştirebilmeleri, (3) yüksek güvenilirlikte olmaları, (4) ucuz üretim prosesine sahip olmaları ve (5) non-immünolojik ve toksik ajanlara karşı üretilmeleri gibi önemli avantajları bulunmaktadır (Deisingh, 2006; Nimjee et al., 2005; Jayasena, 1999). Aptamer teknolojisi yukarıda belirtilen avantajlarından dolayı özellikle terapötik amaçlı biyosensör sistemlerinde tanıyıcı molekül olarak kullanılması için günümüzde birçok bilimsel araştırma gerçekleştirilmektedir.

Günümüzde gerçekleştirilen akademik araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) faaliyetleri çerçevesinde aptamerlerin birçok analitik çalışmada uygulanabilirliğini kısıtlayan en önemli problemler aptamer moleküllerinin düşük kararlılıkları ve nükleaz ataklarına açık olmalarıdır. Spesifik olarak DNA moleküllerinden daha fazla RNA molekülleri için geçerli olan bu problemlerin önüne geçmek amacı ile günümüzde birçok çalışma yapılmasına karşın, istenilen ölçülerde başarılı sonuçlar alınamamıştır (Bunka et al., 2006; Deisingh, 2006). Literatürde aptamer moleküllerinin kararlılığı üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, nükleaz ataklarına karşı geliştirilmiş iki önemli strateji göze çarpmaktadır; ayna görüntülü kiral molekül dizaynı ve oligonükleotidlerin omurgalarında ya da pirimidinlerin 2'-pozisyonunda gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar. Ancak kiral molekül dizaynına sahip aptamer moleküllerinin üretim problemleri ve RNA/DNA yapılarında gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonların, aptamerlerin stabilizasyon problemlerini daha da artırması, geliştirilen bu stratejilerin aptamer teknolojisinin uygulanabilirlik problemine cevap olmalarını engellemektedir (Klussmann, 2006).

Ayrıca aptamerler üzerine yapılan akademik çalışmalar sonucu, *in-vitro* diagnostik alanında somut ürüne dönüşmüş aptamer tabanlı biyosensör (aptasensör) sistemi, bugün itibari ile piyasayada bulunan biyosensör sistemleri bazında, yok denilecek kadar azdır. *In-vitro* diagnostik alanında aptamer tabanlı biyosensör teknolojisinin kullanılmamasının temel nedenlerinden biri günümüzde birçok araştırma ve geliştirme gurubunun çözüm bulamadığı immobilizasyon prosesinde yapılan kimyasal modifikasyonlar sonucu nükleik asitlerin kararlılıklarının bozulmasıdır (Klussmann, 2006; Balamurugan et al., 2008). Nükleaz ataklarından korumak için nükleik asitlere yapılan kimyasal modifikasyonlar, immobilizasyon prosesinde yapılan değişiklikler ile birleşince bu moleküllerin konformasyonlarında ciddi bozulmalara sebep olmaktadır.

RNA/DNA yapılarının *in-vitro* ortamda kontrolsüz katlanmaları sonucu aptamerin üç boyutlu moleküler yapılarının bozulması, bu moleküllerin afinitelerine ve seçiciliklerine zarar vermektedir. Aptamer immobilizasyon yöntemleri için en önemli başarı kriteri; aptamer molekülünün afinitesini ve spesifikliğini kaybettirmeden, belirlenen yüzeye tutuklanmasını sağlamaktır. Bahsi geçen bu kriter göz önüne alındığı zaman, günümüzde gerçekleştirilen ıslak kimyasal modifikasyon bağımlı geleneksel aptamer immobilizasyon yöntemleri, istenilen başarı ölçütlerinin çok altında kalmaktadırlar.

Bu çalışma kapsamında, aptamer adı verilen özgül ligandlara karşı yüksek afinite ve seçicilik gösterebilen sentetik oligonükleotid bölgelerinin tutuklanması için “etiketsiz” aptamer immobilizasyon yöntemi araştırılmıştır. Çalışmanın ilk basamağında, “etiketsiz” aptamer immobilizasyon yönteminin geliştirilmesi sürecinde kullanılacak, model aptamer sistemi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen literatür çalışması, aptamer moleküllerinin kovalent bağ yardımı ile yüzeye immobilizasyonu tabanlı analitik uygulamaların birçoğunun, model sistem olarak trombin enzimi kullanmakta olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada, model aptamer sistemi olarak alternatiflerine kıyasla daha yüksek afinite ve stabilite gösterebilen 29 bazlık HD-22 trombin aptameri kullanılmıştır.

Ayrıca gerçekleştirilen deneysel çalışmaların maliyetinin düşürülmesi amacı ile HD-22 trombin aptamerinin yanı sıra, 10 bazlık poliA DNA fragmanları temin edilmiştir. PoliA DNA fragmanları, moleküler yapısının HD-22 DNA aptameri ile

benzerlik göstermesi ve bu molekülün HD-22 DNA aptamerine kıyasla daha az maliyet ile temin edilebilmesi nedenleriyle, bu çalışmada kullanılmışlardır.

Çalışma sürecinin içerisinde, HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler ve reaksiyonlar izotermal titrasyon kalorimetre (ITC) cihazı kullanılarak incelenmiştir. HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu, yine ITC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

“Etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesi için immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi sürecinde kuartz kristal mikrobalsans (QCM) sistemi kullanılmıştır. QCM kristallerinin yüzeyi plazma polimerizasyonu yöntemiyle yüzeyde (-PO<sub>3</sub>) grupları oluşturulacak şekilde modifiye edilmiştir. Plazma polimerizasyon parametreleri, yüzeye bağlanan poliA miktarı ve kaplamaların sulu ortamdaki stabiliteleri cinsinden optimize edilmiştir. Bu immobilizasyon yöntemi ile “etiketli” aptamer immobilizasyonu, yüzeye bağlanan oligonükleotid molekülü sayısı cinsinden, aldehit grubu ile işaretlenmiş oligonükleotid immobilizasyonu gerçekleştirilerek kıyaslanmıştır. Gerçekleştirilen deneysel çalışmaların maliyetinin düşürülmesi amacı ile immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi ve optimizasyonu sürecinde, model oligonükleotid olarak poliA DNA fragmanları kullanılmıştır.

Plazma polimerizasyonu sisteminde parametreleri poliA molekülleri kullanılarak belirlenmiş ve optimize edilmiştir. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesi, bir sonraki süreç içerisinde HD-22 DNA aptameri ile tekrar edilmiş ve HD-22 DNA aptameri ile trombin enziminin gerçekleştirdiği etkileşimler incelenmiştir.

Çalışmanın son basamağında HD-22 trombin aptamerinin “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin sonucunda trombin enzime karşı gösterdiği etkileşim, öncelik ile serbest HD-22 aptameri ile trombin enzimin ITC cihazı ile elde edilen deneysel karakteristik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Yine bu süreç içerisinde “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin ile geleneksel aptamer immobilizasyon yöntemlerinin verimlilikleri karşılaştırılmıştır.

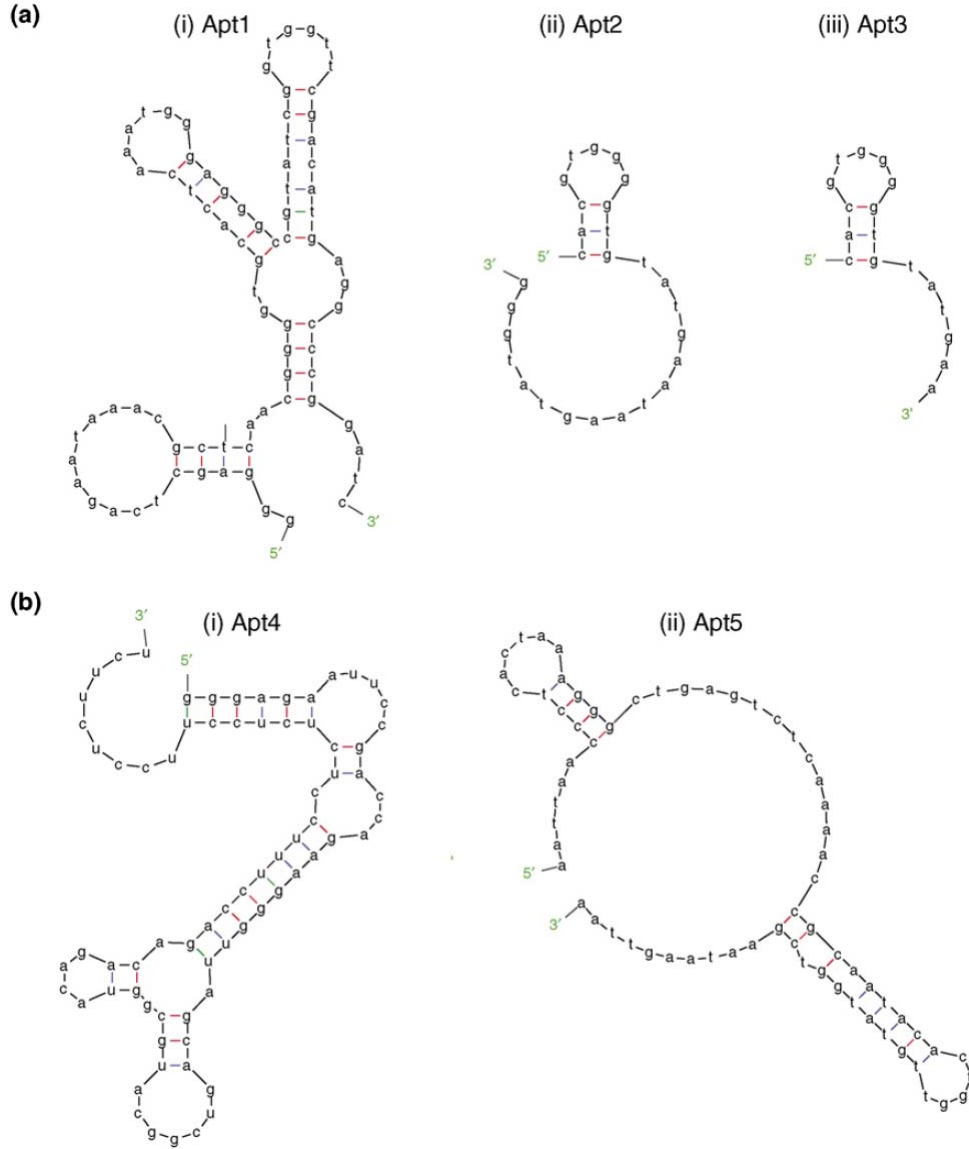
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Aptamer

1990 yılının içerisinde üç farklı laboratuvarın benzer zamanlarda, yüksek afinite ile spesifik bağlanma gösterebilen nükleik asit sekanslarının izolasyonu için, *in-vitro* seçim ve amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi üzerine yaptıkları araştırmaların sonuçlarını yayımlamaları (Robertson and Joyce, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990), günümüzde aptamer teknolojisi olarak adlandırılan çalışmaların başlangıcını oluşturmuştur. RNA ve DNA moleküllerinin organik boyalara ve nükleik asit proteinlere kaşı gösterdikleri afiniteyi *in-vitro* seçim ve kromatografi teknikleri ile belirleme temeline dayanan deney yöntemi, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) olarak adlandırılırken (Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990), SELEX tekniği sonucu elde edilen oligonükleotidlere ise aptamer adı verilmiştir. Latince “uymak” anlamına gelen “aptus” kelimesinden türetilmiş olan aptamer kavramı (Jayasena, 1999), nükleik asit olmayan hedef moleküllere (peptid, protein, organik veya inorganik moleküller, hücre v.b.) yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanma özelliğine sahip olan sentetik oligonükleotid (DNA veya RNA) yapılarını temsil etmektedir (Patel et al., 1997; Clark and Remcho, 2002).

Nükleik asitlerin üç boyutlu yapılarına bağı bir şekilde özgül ligandlara karşı gösterdikleri yüksek afinitenin anlaşılması, günümüzde aptamer tabanlı moleküler tanıma mekanizmalarının ve analitik tekniklerin geliştirilmesi üzerine yeni bir araştırma ve geliştirme alanının oluşumuna yol açmıştır.  $10^{15}$  rakamından büyük sekans kütüphaneleri içerisinde seçilen aptamerlerin, hedef moleküllerine karşı gösterdikleri pikomolar seviyelerine erişebilen  $K_d$  değerleri ile ifade edilebilen yüksek afinite (Jenison et al., 1994; Win et al., 2006) bu teknolojinin protein tabanlı monoklonal antibadilerin yerini alabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca aptamer molekülleri bağlanma kinetikleri sonucu ulaşabildikleri 10.000 kat ile 12.000 kat arası spesifite değerleri göstermektedirler (Jenison et al., 1994; Win et al., 2006; Geiger et al., 1996). Theophylline ve kafein moleküllerinin yapıları arasındaki tek farkın pürin halkası içerisinde bulunan N7 pozisyonundaki bir metil grubu (-CH<sub>3</sub>) olmasına rağmen theophylline için seçilen aptamer, theophylline molekülüne kafeinden 10.000 kat daha fazla bağlanabilmektedir (Jenison et al., 1994). Aptamerlerin yüksek afinite ve seçicilik özellikleri göz önüne alındığında, bu

moleküllerin yakın gelecekte terapötik, biyoanalitik uygulama ve moleküler tanı alanlarında sahip olduğu yüksek potansiyel görülmektedir (Deisingh, 2006). MFold programı (Zuker, 2003) yardımı ile ikincil yapılarının kestirimi gerçekleştirilen çeşitli DNA aptamerleri Şekil 2.1.'de verilmiştir.

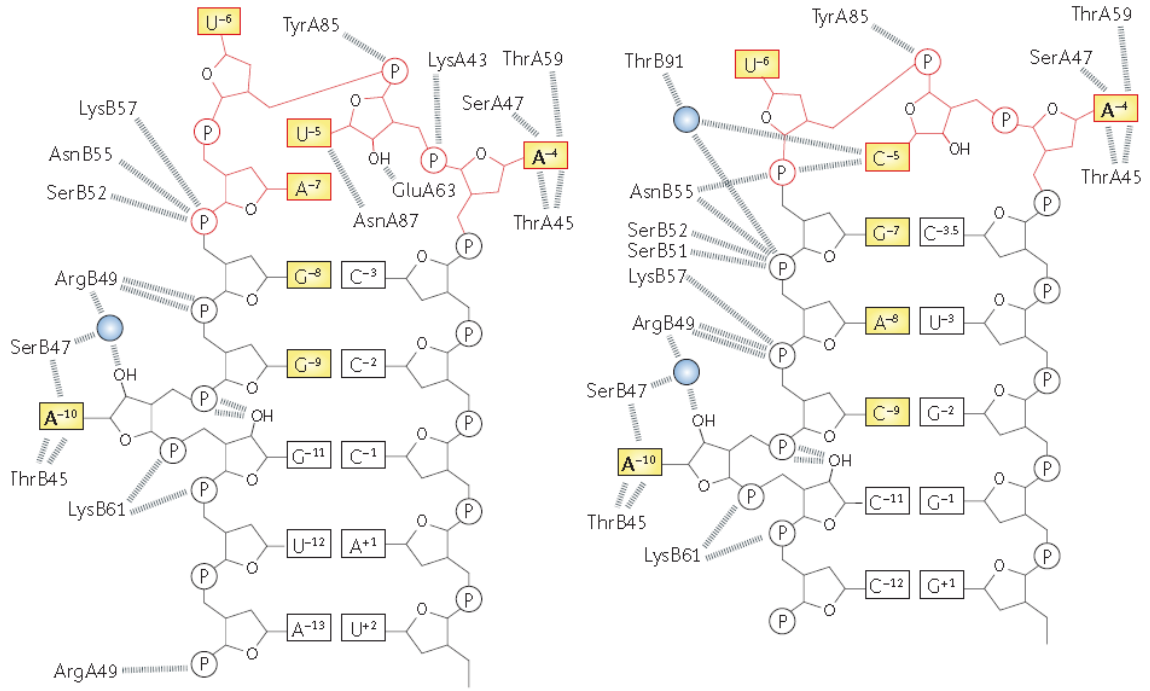
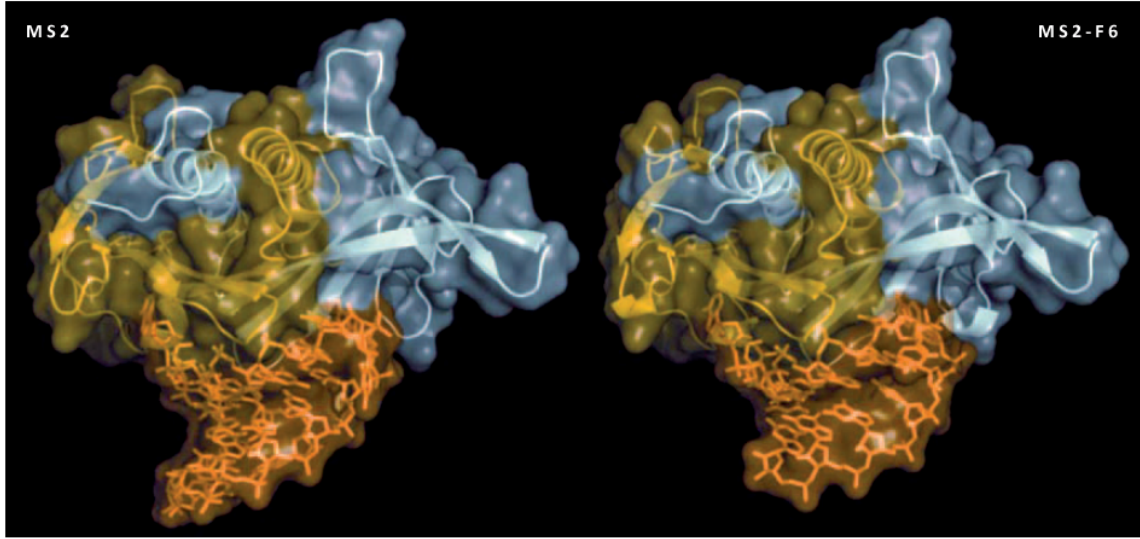


Şekil 2.1. (a) *B. anthracis* sporlarına karşı geliştirilmiş DNA aptamerlerinin MFold (Zuker, 2003) programı ile belirlenen ikincil yapıları (Fischer, 2007). (b) Influenza A virüsüne karşı geliştirilmiş RNA aptamerlerinin MFold (Zuker, 2003) programı ile belirlenen ikincil yapıları (Fischer, 2007).

Aptamerlerin birçok uygulama alanlarında, monoklonal antibadi teknolojisine rakip olarak görülmesinin temel sebeplerinden bir diğeri ise; SELEX prosesinin canlı organizmalardan bağımsız (hücre kültürleri veya kobay hayvanlar) bir şekilde *in-vitro* ortam içerisinde gerçekleştirilebilmesidir (Nimjee et al., 2005). SELEX prosesinin *in-vitro* ortam içerisinde gerçekleştirilebilmesi, monoklonal antibadi yönteminin yetersiz kaldığı non-immünolojik ve toksik ajanlara karşı aptamer moleküllerinin geliştirmesine de imkân vermektedir (Nimjee et al., 2005; Tombelli, et al., 2005). Ayrıca SELEX prosesi manipüle edilerek hedef molekülün üç boyutlu yapısı içerisindeki spesifik bir bölgesine bağlanabilen aptamerlerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Nimjee et al., 2005). *In-vitro* seçim yöntemi dizayn edilirken parametre kriterleri istenilen sonuca bağımlı bir şekilde değiştirilerek, farklı ortamlar ve parametreler içerisinde aktivite gösterebilen aptamer molekülleri geliştirilebilmektedir (Wilson and Szostak, 1999).

Aptamerlerin monoklonal antibadilere karşı diğeri bir üstünlüğü ise yeniden kullanılabilir olmalarından kaynaklanmaktadır. Özgül ligandlar ile yüksek afiniteyle etkileşim içerisinde girmiş bir aptamer molekülü tepkime çözeltisi içerisinde eklenen moleküler yapı bozan “chaotroping” ajanların yardımı ile aptamer-hedef molekül kompleksini oluşturan bağlar kırılarak yeniden kullanılabilir bir yapı haline getirilebilmektedir (Mairal et al., 2008). Şekil 2.2.’de MS2 RNA bağlama proteininin, doğal RNA bölgesi ve SELEX prosesi ile geliştirilmiş F6 aptameri ile oluşturduğu molekül kompleksinin X-Ray incelemesi gösterilmiştir (Bunka and Stockley, 2006).

Aptamerlerin sentetik oligonükleotid temelli olmalarının getirdiği yüksek yapısal esneklik, protein tabanlı monoklonal antibadilere kıyasla Çizelge 2.1.’de özetlenen farklılıkların oluşmasına neden olmaktadır. Aptamerler ile monoklonal antibadilerin özellikleri literatürde karşılaştırılmalı olarak immunoglobulin E (IgE) üzerine yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Kuartz kristal mikrobalsans (QCM) sistemine immobilize edilmiş IgE monoklonal antibadileri ve aptamerleri incelendiklerinde; aptamer molekülleri rejenerasyon süreci sonucunda IgE proteinine karşı afinitelerinde bir kayıp olmaksızın kullanılabilirken, monoklonal antibadilerinin yeniden kullanıma uygun olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca immobilize QCM sistemi içerisindeki monoklonal antibadilerinin termal stabilitelelerinin, aptamer moleküllerine kıyasla çok kısıtlı olduğu tespit edilmiştir (Liss et al., 2002).



Şekil 2.2. MS2-RNA aptamer molekül kompleksinin X-Ray incelemesi (Bunka and Stockley, 2006).

## 2.2. SELEX Yöntemi

Normal olarak aptamerlerin seçtikleri Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) prosesi birbirini takip eden; absorpsiyon, bağlanmış DNA/RNA moleküllerinin geri toplanması ve amplifikasyon döngülerini içermektedir (Marshall and Ellington, 2000). SELEX prosenin içerdiği birbirini takip eden döngüler halinde ilerleyen aşamalar Şekil 2.3.'de gösterilmiştir. SELEX

prosesi nükleik asit kütüphanesinin hazırlanması ile başlar. Minimum  $10^{14}$ - $10^{15}$  baz rassal bir bölge içeren DNA ya da RNA molekülü, 5' ve 3' yönlerinden sabit primerler yardımı ile amplifiye edilir (Marshall and Ellington, 2000; Gold, 1996; Uphoff et al., 1996). Her ne kadar aptamer-ligand etkileşimleri hidrojen bağları sayesinde sağlanmaktaysa da RNA kütüphaneleri DNA kütüphanelerine karşı, RNA-RNA polimeraz enzimlerinin RNA-DNA polimeraz enzimlerine göre daha fazla eşleşme hatası yapmasından kaynaklanan, bir çeşitlilik üstünlüğüne sahiptir (Gopinath, 2007; Klussmann, 2006). Ancak RNA kütüphaneleri ile elde edilen RNA aptamerleri yapılarında bulunan 2' hidroksi grubu (-OH) sebebiyle nükleaz ataklarına yüksek derece maruz kalma eğilimi göstermektedirler (Klussmann, 2006; Stoltenburg et al., 2007).

Çizelge 2.1. Aptamerler ile monoklonal antبادiler arası farklılıklar (Nimjee et al., 2005).

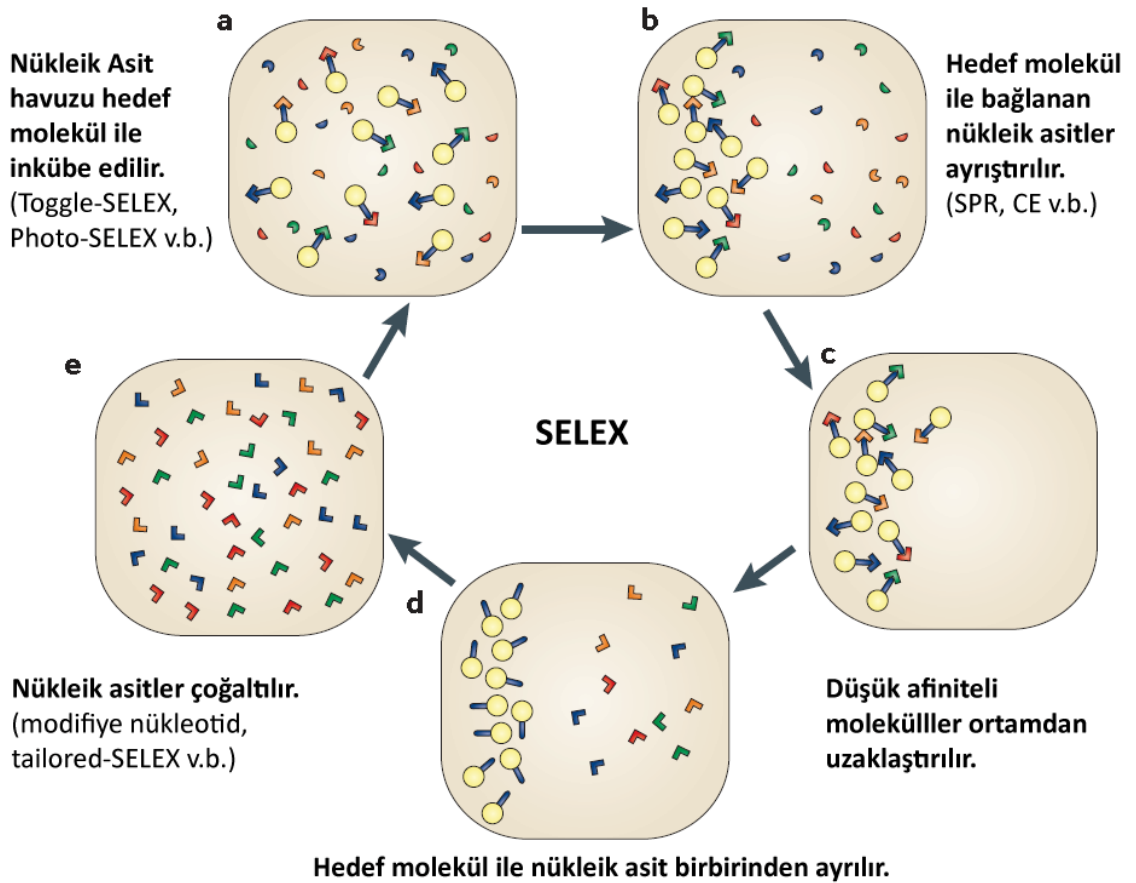
<b>Aptamer</b>	<b>Monoklonal Antibadi</b>
Bağlanma afiniteleri düşük (nanomolar seviyesinden pikomolar seviyesine kadar)	Bağlanma afiniteleri düşük (nanomolar seviyesinden pikomolar seviyesine kadar)
Her türlü hedef molekül için geliştirilebilir	Non-immünolojik ve toksik ajanlara karşı etkisiz
Değişken koşullar altında gerçekleştirilebilen <i>in-vitro</i> seçim prosesi sebebi ile farklı parametrelerde özgül ligandlara karşı geliştirilebilir	Canlı organizma bağımlı bir yöntem olduğundan dolayı yalnızca fizyolojik koşullar altında geliştirilebilir
PCR tabanlı <i>in-vitro</i> üretim prosesi nedeni ile toplu üretim standartlarına uygun	Üretim prosesi canlı organizma bağımlı olduğundan dolayı toplu üretim esnasında standart koruma problemi içerir
Hedef molekülün spesifik bir bölgesine uygun bir şekilde tasarlanabilir	Bağıışıklık sistemi hedef molekülün hangi bölgesinden yakalanacağını belirler
Geniş kimyasal modifikasyon imkanına sahiptir	Kısıtlı kimyasal modifikasyon imkanına sahiptir
Sıcaklık değişikliklerini takiben orijinal üç boyutlu yapısına dönme eğilimine sahiptir	Sıcaklık değişikliklerine aşırı duyarlıdır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olur
Sınırsız raf ömrü	Sınırlı raf ömrü
immunogenetik özellik içerdiğine dair hiçbir kanıt bulunamamıştır	Önemli immunogenetik özellik içerir
Yeniden kullanılabilir	Yeniden kullanılabilirliğe sahip değildir

Oluşturulan nükleik asit kütüphanesi, hedef molekül ile inkübe edilir ve absorpsiyon basamağının birinci döngüsü başlatılmış olur. Bu basamak içerisinde deney düzeneğine bağlı bir şekilde ligand, immobilize (manyetik bilye, afinite kolonu v.b.) ya da serbest bir şekilde çözelti içerisinde eklenebilmektedir (Zhan et al., 2003; Drolet et al., 1999). İnkübasyonu takiben hedef moleküle bağlanmamış DNA/RNA moleküllerinin, hedef moleküle bağlanmış olanlardan ayrılması gerekmektedir. Bu kritik ayrılma basamağı için literatürde araştırılmış birçok farklı yöntem bulunmaktadır.

Hedef molekül immobilize edilmediği zaman genel olarak kullanılan ayırma tekniği filtrasyon yöntemidir (Holeman et al., 1998; Burke and Gold, 1997). Kapiler elektroforez tekniği üzerine yakın geçmişte yapılan akademik çalışmalar, bu tekniğin de bağlanmış ve bağlanmamış DNA/RNA moleküllerinin ayrıştırılması için çok verimli bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır (Mendonsa and Bowser, 2004). Hedef molekül immobilize edildiği durumlarda ise, seperasyon immobilizasyon gerçekleştirilen yüzeyin kullanım özelliklerine bağlıdır. Örnek olarak afinite kolonlarına gerçekleştirilen ligand immobilizasyonu sonrası seperasyon afinite elüsyonu ile sağlanırken, manyetik bilyelerin immobilizasyon yüzeyi olarak kullanıldığı yöntemlerde, magnetik izolasyon prosedürleri kullanılmaktadır (Gopinath, 2007).

Geliştirilen aptamer moleküllerinin spesifikliğı artırmak amacı ile “negatif seleksiyon” (liganda bağlanan aptamerlerin nükleik asit havuzundan çıkarılması) ve “tersine seleksiyon” (liganda yapısal olarak benzeyen moleküllere bağlanan aptamerlerin nükleik asit havuzundan çıkarılması) yöntemleri pozitif seçim prosedürlerinden önce uygulanmaktadır (Gopinath, 2007; Stoltenburg et al., 2007). Böylece her bir döngü sonrası SELEX prosesinin gerçekleştirildiği çözelti içerisindeki bağlanmamış DNA/RNA moleküllerinin ve ligandın konsantrasyonu azalırken, ortamdaki bağlanmış moleküllerin birbirlerine karşı gösterdikleri afinite artış gözlemlenmektedir. Literatürde aptamer moleküllerinin nükleik asit havuzunda geçirdikleri *in-vitro* evrim sürecini, yüzey plazmon rezonans (SPR), flüoresans spektrometresi, flüoresans ya da radyoaktif bağlama analizi yöntemleri ile izlemeyi başarmış çalışmalar bulunmaktadır (Tombelli, 2005; Mairal, 2008).

Aptamer ile hedef molekül arasında istenilen düzeyde afinite doygunluğuna erişildiği zaman, zenginleştirilmiş nükleik asit kütüphanesi klonlanmakta ve sekanslanmaktadır. Daha sonra ise her bir öncül aptamer sekansı hedef molekül ile afinitesi araştırılmak üzere etiketlenerek, yüzey plazmon rezonans (SPR), flüoresans spektrometresi, flüoresans ya da radyoaktif bağlama analizi yöntemlerinden biri ile incelenmektedir (Bunka and Stockley, 2006; Mairal, 2008). Klonlanmış aptamer moleküllerinin analizi genel olarak hedef moleküle spesifik olarak bağlanabilen onlarca sekans bulunması ile sonuçlanmaktadır. Alternatif sekanslar arasından hedef molekül bağlanma afinitesi ve özgüllüğü en yüksek olan sekans, ileri karakterizasyon çalışmaları (motif taraması, ikincil ve üçüncül yapılarının araştırılması v.b.) sonucunda belirlenmektedir. Karakterizasyon çalışmaları sonucu seçilen aptamer molekülü kimyasal sentez yöntemleri kullanılarak çoğaltılır (Bunka and Stockley, 2006).



Şekil 2.3. SELEX prosesinin içerdiği birbirini takip eden döngüler halinde ilerleyen aşamaların şematik gösterimi (Bunka and Stockley, 2006).

Literatürde bulunan aptamerlerin, büyük bir kısmı seperasyon tekniği olarak afinite kromatografisi, nitroselüloz membran filtrasyonu ve magnetik bilye teknolojilerini içeren SELEX prosesi ile geliştirilmiştir. SELEX prosesinin diğer varyasyonları Çizelge 2.2.'de özetlemiştir.

Çizelge 2.2. SELEX yöntemi için geliştirilen prosedürlerin karşılaştırılması (Mairal, 2008).

<b>Teknik</b>	<b>Avantaj</b>	<b>Dezavantaj</b>	<b>Hedef Molekül</b>	<b>K<sub>d</sub></b>
Klasik SELEX (afinite bazlı seleksiyon)	Kolay anlaşılır, basit uygulama prosedürü, ucuz	Yüksek istenmeyen reaksiyon yüzdesi, sınırlı verimlilik	Protein, peptid, küçük kimyasal moleküller, hücre	Pikomolar nanomolar arası
Modifiye edilmiş aptamer tabanlı SELEX (photoELEX, blended SELEX)	Yüksek spesifite ve verimlilik	Tepkime verebilen bölge içeren ligandlar ile sınırlı	Protein ve peptid	Pikomolar nanomolar arası
Özel SELEX varyasyonları (toggle, genomic)	Özgül ligandlara, spesifik amaç doğrultusunda tasarlanabilen aptamer molekülleri	Kısıtlı uygulanabilirlik	Protein, peptid, küçük organik moleküller	Pikomolar
Kapiler elektroforez SELEX	Az döngü içerisinde yüksek verimlilik ve afinite	Küçük moleküler ağırlığa sahip moleküllere uygun	Protein ve peptid	Pikomolar
Denge konumunda olmayan kapiler elektroforez SELEX	Az döngü içerisinde yüksek verimlilik ve afinite, kolay hesaplanabilen K <sub>d</sub> değeri	Çok kısıtlı uygulanabilirlik	Protein ve peptid	Pikomolar

### 2.3. Aptamer Moleküllerinin Kararlılığı

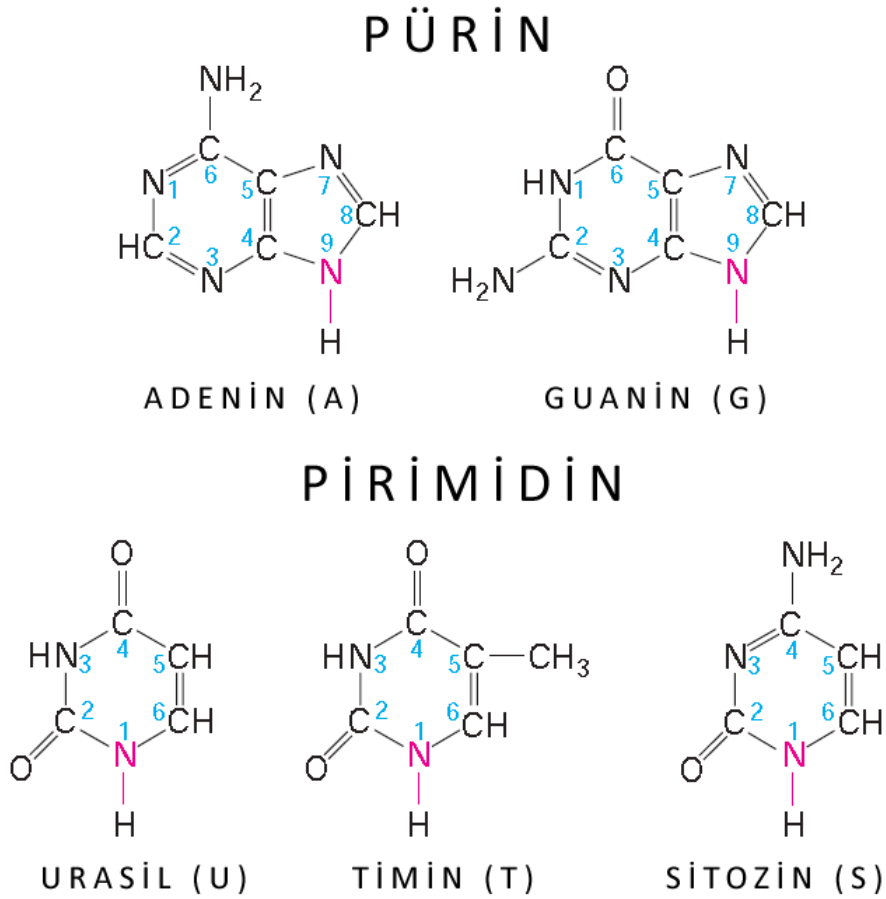
Günümüzde aptamerlerin birçok alanda uygulanabilirliğini kısıtlayan en önemli problemler; (1) bu moleküllerin düşük kararlılıkları ve (2) nükleaz ataklarına açık olmalarıdır (Baldrich et al., 2004). Spesifik olarak DNA moleküllerinden daha fazla RNA molekülleri için geçerli olan bu problemlerin önüne geçmek amacı ile günümüzde birçok çalışma yapılmasına karşın, istenilen ölçüde başarılı sonuçlar alınamamıştır. Literatürde aptamer moleküllerinin kararlılığı üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde iki önemli çalışma göze çarpmaktadır; (1) ayna görüntülü “spiegelmer” molekül dizaynı ve (2) oligonükleotidlerin omurgalarında ya da pirimidinlerin 2'-pozisyonunda gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar (Mairal et al., 2008).

#### 2.3.1. Aptamer Moleküllerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Modifikasyonlar

Pirimidinlerin 2'-pozisyonunda bulunan hidroksi grubu (-OH) özellikle pH değerinin 7'den yüksek olduğu durumlarda oldukça reaktif olup, phosphodiester bağlarına atak yapıp cyclic 2',3'-phosphate oluşturmakta ve böylece nükleik asidin omurgasında kırılmalara sebep olmaktadır. Birçok geçiş metal iyonunun ve ribonükleazların birçoğunun cyclic 2',3'-phosphate oluşumuna sebep olması, aptamer moleküllerinin ömürlerini çözelti içerisinde yaklaşık olarak 10 dakikadan kısa bir zaman dilimi ile kısıtlamaktadır (Kusser, 2000; James, 2001).

DNA/RNA moleküllerinin stabilitesini artırmak amacı ile kimyasal modifikasyonlar SELEX prosesinin sonuçlanmasından sonra kimyasal sentez süreci içerisinde teorik anlamda gerçekleştirilebilirken, pratikte post-SELEX olarak adlandırılan, SELEX sonrası kimyasal modifikasyonlar aptamerlerin afinitelerini ve spesifitelerini negatif olarak önemli oranlarda etkilemektedir (Eaton et al., 1997). Kimyasal modifikasyonların negatif etkilerini minimize etmek amacıyla, modifiye edilmiş deoksinükleozid ya da ribonükleozid molekülleri kullanılarak gerçekleştirilen *in-vitro* seleksiyon yöntemleri tasarlanmıştır (Keefe and Cload, 2008). Ancak DNA/RNA polimeraz enzimlerinin modifiye edilmiş nükleozid molekülleri ile düşük bir oranda birleşim göstermesi, bu alanda yapılan çalışmaların sayısını kısıtlamıştır. Literatürde DNA/RNA polimeraz enzimleri ile etkileşime girebildiği belirtilmiş, 2'-amino primidinler, 2'-fluoro primidinler ve C5 pozisyonundan modifiye edilmiş bazı primidin bazları belirtilmiştir (Jayasena, 1999). Ancak SELEX prosesi

sonucu seçilmiş son aptamer molekülünün yapısı primidinler yerine pürinler açısından zengin ise, yukarıda tanımlanan modifikasyonların aptamer kararlılığına etkisi zayıf kalacaktır. Pürin ve pirimidin molekülerinin yapıları Şekil 2.4.'de belirtilmiştir.



Şekil 2.4 Pürin ve pirimidin molekülerinin yapıları.

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

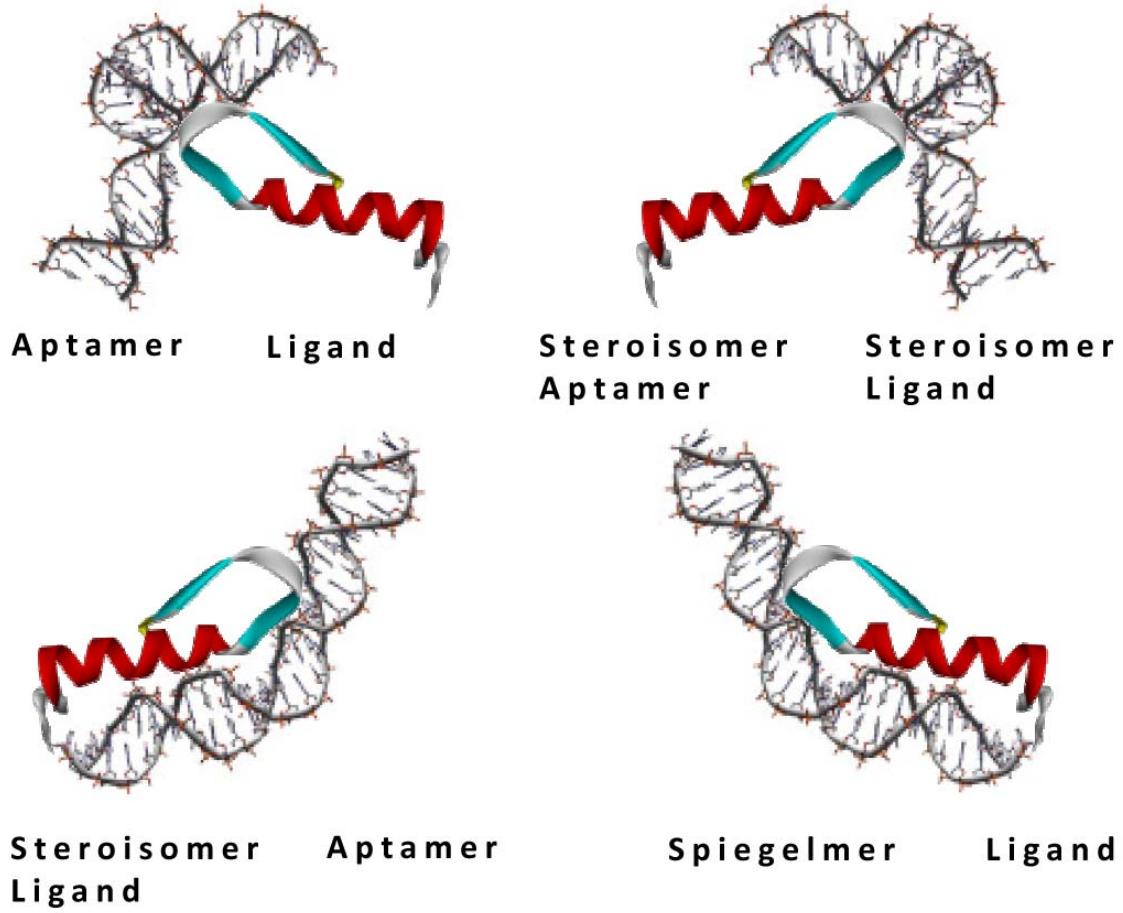
Spiegelmer, Almandaca ayna anlamına gelen “spiegel” kelimesinden türetilmiştir (Klussmann et al., 1996). Spiegelmerler, aptamerlere nükleaz direnci kazandırmak amacıyla geliştirilmiş ayna görüntülü sentetik oligonükleotid yapılarıdır. Şekil 2.5.'de (D-) aptamer ve (L-) spiegelmerler moleküllerin üç boyutlu yapıları verilmiştir.

Doğal (D-) konformasyona sahip 5 karbonlu Őekerler yerine kullanılan, doğal olmayan enantiyomerik formda L-riboz ve L-2'-deoksiriboz moleküllerinden oluşturulan spiegelmerler, aptamerler gibi hedef moleküllerine yüksek seŐçililik ve afinite ile bağlanırken, L konformasyonundaki moleküler yapısı nedeniyle nükleaz enzimleri tarafından parçalara ayrılmamaktadırlar (Klussmann et al., 1996; Nolte et al., 1996). Aptamerleri kiral forma çevirmek, bu moleküllerin biyolojik stabilitesini ve ömrünü yüksek oranlarda artırmaktadır.

Spiegelmerler “ayna görüntülü” SELEX prosedürü ile geliştirilmektedir. BaŐlangıŐ olarak  $10^{15}$  farklı molekül iÇeren nükleik asit kütüphanelerinden normal SELEX prosesi ile hedef molekülün sentetik enantiyomerik formuna karşı D-oligonükleotidler seŐçilmektedir. Spiegelmerler üzerine yapılan ŐalıŐmalar, bu moleküllerin doğal (D-) konformasyonuna sahip DNA/RNA molekülleri ile hibritleŐemediklerini ve hedef moleküllere aptamerler analogları ile aynı seŐçilikte ve afinite bağlandıklarını göstermiştir (Leva et al., 2002). Spiegelmerlerin yukarıda ayrıntılı bir Şekilde açıklanan bu üstün özellikleri, birÇok farklı moleküle karşı (arginine, adenosine, vasopresin v.b.) spiegelmer moleküllerinin geliştirilmesine sebep olmuştur (Leva et al., 2002; Nolte et al., 1996).

Spiegelmerlerin ve ayna görüntülü nükleotidlerin doğada bulunmadıkları göz önüne alınırsa, bu moleküllerin hiÇbir zaman doğal olarak oluŐamayacakları öngörülebilir. Doğal olarak oluŐamayan “ayna görüntülü” spiegelmerler molekülleri, nükleaz enzimleri tarafından efektif olarak tanıyamayacak ve metabolize edilemeyecektir.

Ayrıca spiegelmerlerin kimyasal yapılarının (D-) konformasyonuna sahip nükleik asitler ile Çok yakın olması nedeniyle, minimal immünolojik ve non-toksik özellik göstermektedirler. Yukarıda belirtilen özellikler Spiegelmer moleküllerini *in-vitro* ve *in-vivo* diagnostik ve *in-vivo* görüntüleme teknikleri için ideal bir sistem olarak öne Őıkarmaktadır.



Şekil 2.5. (D-) aptamer ve (L-) ayna görüntülü “spiegelmer” aptamer moleküllerinin üç boyutlu yapıları.

#### 2.4. Aptamer Moleküllerinin Temel Uygulama Alanları

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

#### **2.4.1. Afinite Kromatografisi**

Kromatografik metotların temeli, mobil fazda hareket halinde olan analitin durağan fazda olan kolon ile etkileşime girip diferansiyel olarak alıkonulması prensibine dayanmaktadır (Tombelli et al., 2005; Mairal et al., 2008). Yakın geçmişte kromatografi tekniği, aptamerlerin özgül ligandlara karşı gösterdikleri yüksek seçicilikten faydalanmak amacı ile modifiye edilmiştir (Ravelet et al., 2006). Aptamer molekülleri boyut avantajları (yaklaşık 6-40 kDa), yüksek afinite ve seçicilik özellikleri ile kromatografi yöntemlerinde günümüzde yaygınlık ile kullanılan alternatiflerine karşı önemli üstünlük sağlamaktadırlar. Aptamerlerin durağan fazdaki kolon içerisine immobilizasyonu, kromatografi yöntemine hedef molekülün alıkonma sürecinde yüksek seçicilik özelliği kazandırmıştır. L-arginine aminoasiti için seçilen aptamerin L-arginine'ni D-arginine'den 12.000-fold daha fazla spesifite değerinde ayırması, aptamer moleküllerin kromatografi tekniğine kazandırdığı yüksek seçicilik özelliğine örnek teşkil etmektedir (Geiger et al., 1996).

#### **2.4.2. Afinite Kapiler Elektroforez Sistemleri**

Kapiler elektroforez, elektroforez tekniğinin kapiler kolonlara uyarlanmış halidir. Elektrik alan içerisinde, iyonize edilmiş bileşenlerin hareket ettirilmesi yoluyla bu bileşenlerin (moleküller yapı, yük, büyüklük v.b. etkenlere bağlı olarak) elektroforetik mobilitelerindeki ve hareket hızlarındaki farklılıkları sebebiyle birbirinden ayrıştırılması prensibine dayanmaktadır (Huang et al., 2004). Kapiler sistemler içerisinde gerçekleştirilen elektroforez, düşük hacimde yüksek seçicilik ve duyarlılık gösterebilen ayrıştırma sürecinin oluşturulabilmesine imkân sağlamaktadır (Huang et al., 2004; Heegaard, 2003). Afinite kapiler elektroforez sistemlerinde de afinite ölçümü kapiler kolon içerisinden geçirilen etiketlenmiş moleküller ile bağlanmış ve bağlanmamış olan ligandların fiziksel olarak ayrıştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde genellikle, diğer kromatografik metotlarda kullanıldığı gibi, antibadi teknolojisi temel ayrıştırma metodolojisi olarak kullanılmaktadır. Bu metodoloji ise; antibadi moleküllerin küçük boyutlardaki hedef moleküller ile oluşturdukları [etiketlenmiş antibadi]-[hedef molekül] kompleksinin bağlanma gerçekleştirilememiş serbest [etiketlenmiş antibadi] molekülünden ayrıştırılması prensibine dayanmaktadır (Koutny et al., 1996).

[Etiketlenmiş antibadi]-[hedef molekül] kompleksinin fiziksel büyüklüğünün serbest [etiketlenmiş antibadi] molekülünün fiziksel büyüklüğünden, ligandın büyüklüğüne bağlı olarak, çok küçük bir farklılık içermesi afinite kapiler elektroforez sistemlerinde antibadilerinin kullanılmasını kısıtlamaktadır (Koutny et al., 1996). Ayrıca antibadi moleküllerinin birçok farklı derecede glukozilasyon sebep olması, elektroforez sistemi içerisinde istenmeyen elektroforetik paternlerin oluşmasına sebep olabilmektedir (Jayasena, 1999).

Aptamerlerin, afinite kapiler elektroforez konfigürasyonlarında afinite probu olarak kullanılmalarının getirdiği en önemli avantaj; aptamer moleküllerinin nükleik asit yapılarından kaynaklanan kararlı yük-kütle oranları nedeniyle sahip oldukları kestirilebilen elektroforetik mobiliteleri ve buna bağlı olarak oluşan homojen elektroforetik paternlerinden kaynaklanmaktadır. Ancak aptamerlerin ikincil yapılarında meydana gelen bağlanma kinetikleri ile doğru orantılı değişiklikler, bu moleküllerin elektroforetik paternlerinde rassal değişikliklere sebep olabilmektedir. Bu teknik zorluğa rağmen özellikle flüoresans aptamerleri IgE molekülünü tampon çözelti ve serum içerisinde tespitinde kullanılmış ve antibadilere göre daha yüksek verimlilikte çalışan bir sistemin dizayn edilmesine olanak sunmuştur (German et al., 1998; Buchanan et al., 2003).

#### **2.4.3. Aptamer-tabanlı Biyosensör Sistemleri**

Biyosensör kavramı IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) tanımında; tanıyıcı (algılayıcı) tabaka olarak biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş hassas ve spesifik bir eleman ile tanıma işlemini işlenebilir bir sinyale çeviren fizikokimyasal bir çeviricinin entegre edildiği kompakt bir analitik cihaz olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda bir biyosensör sistemi: hedef moleküle spesifik olarak bağlanan biyoreseptör, sinyal yaratan biyolojik etkileşimin gerçekleştiği bir ara yüz, bu sinyali elektronik bir sinyale dönüştüren çevirici, bu sinyali takip eden ve işleyen bir yazılım ve operatör ara yüzü alt bileşenlerinden oluşmaktadır. İdeal olarak bir biyosensörün herhangi bir örnekten doğrudan okuma yapabilir olması gerekmektedir. Bu örnekler arasında; vücut sıvıları, hava, su, toprak, hücresel kültürler ve gıda örnekleri gösterilebilmektedir (Thevenot et al., 1999).

Biyosensör uygulamalarının merkezi moleküler tanıma işlemidir. İlk geliştirilen biyosensör sistemlerinde tanıyıcı eleman canlı organizmalardan izole edilerek kullanılmıştır. Ancak izolasyon işleminin zorluğu, izole edilen moleküllerin kısıtlılığı dolayısıyla, günümüzde laboratuvar ortamında sentezlenen tanıyıcı elemanların geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Hedef analitin tanımlanması işlemi ilk olarak dizayn edilmiş proteinlerin geliştirilmesi ile daha geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Modern biyoteknoloji yöntemleri kullanılarak nükleik asitlerin laboratuvar ortamında dizayn edilerek geliştirilmesi ile biyosensör uygulamaları yeni bir çağa girmiştir. Nanoteknolojideki gelişmeler ve yeni elektronik sistemler ile entegre edildiğinde, sentetik tanıyıcı elemanların kullanımının gelecekteki biyosensör sistemleri için kilit rol oynayacağı kabul edilmektedir (Leung et al.,2007). Yaygın olarak kullanılan tanıyıcı elemanlar ve bunların üstün ve zayıf yönleri aşağıda özetlenmiştir.

#### **2.4.3.1. Reseptör-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri**

Biyosensör uygulaması açısından reseptörlerin kullanılması, “algılama” ve “sinyal oluşturma” fonksiyonlarını bir arada barındırdıkları için, oldukça cazip bir seçenek oluşturmaktadır. Bu moleküller fizyolojik proseslerde mediyatör olarak işlev görmelerinin yanı sıra pek çok toksin ve ilaç için doğal bir hedef teşkil etmektedirler. Reseptörler, ligand adı verilen moleküllere spesifik olarak bağlanan transmembran (plazma ve hücre içi membranlar) ve çözünen proteinlerdir. Bağlanma işlemi spesifik bir hücresel cevap oluşturur. Ligand bağlanması ile meydana gelen yapısal değişimler, kanalların açılması, ikincil haberci oluşumu, diğer pek çok proteinin dahil olduğu şelale reaksiyonlarının gerçekleşmesi gibi, doğasında bir çeviricinin de bulunduğu cevaplar yaratmaktadır. Yüksek ligand spesifikliği ve afinitesi göstermeleri açısından biyosensör uygulamalarında reseptör kullanımı son derece cazip görünse de, düşük verimlilikte üretilmeleri, diğer tanıyıcı elemanlara kıyasla daha az stabil olmaları, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin zorluğu, uygun bir çevirici sistemi ile entegre edilerek elektronik sinyal oluşturulmasındaki sorunlar gibi kısıtlamaları nedeniyle pratikte tercih edilmemektedirler (Conroy et al. 2009; Lim et al., 2005).

#### **2.4.3.2. Enzim-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri**

Katalitik enzim-tabanlı biyosensörler, katalitik reaksiyon sonucu proton, elektron, ışık ve ısı gibi pek çok farklı ve ölçülebilir ürün oluşturmaları açısından önem arz etmektedir. Üreaz enzimi biyosensör uygulamalarında en çok tercih edilen enzim olmuştur, ancak bunun nedeni ürenin medikal ve çevre uygulamalarında tespitinin önemli olmasıdır. Allosterik enzimlerin doğal regülatör özellikleri biyosensörlerde tanıyıcı eleman olarak kullanımları için büyük potansiyel sağlamaktadır. Regülatör alt ünite, tanıyıcı tabaka olarak görev alırken katalitik bölge, çevirici element olarak faaliyet göstermektedir. Pek çok allosterik enzimin doğal olarak multimetrik özellik göstermesi dolayısıyla, stabilite ve ekspresyon sorunu enzimlerin en büyük dezavantajlarını oluşturmaktadır (Conroy et al. 2009; Lim et al., 2005).

#### **2.4.3.3. Antikor-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri**

Günümüzde ticari glikoz sensörleri dışındaki hızlı tespit sistemlerinin çoğu antikorları tanıyıcı eleman olarak kullanılmaktadır. Tespit işlemlerinde antikorlar yıllardır yoğun bir şekilde kullanılsa da Kohler ve Milstein'in monoklonal antikor (MoAb) teknolojisini geliştirmelerinden sonra antikor kullanımının yaygınlığı artmıştır (Conroy et al. 2009).

MoAb üreten klonlanmış hücrelerin kullanımı sayesinde yüksek miktarda antikor üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Antikorlar, antikor-antijen etkileşiminin hassasiyetini ve spesifikliğini sağlamaktadır. Antikorları tanıyıcı eleman olarak içeren biyosensör sistemlerinin en önemli avantajı, immünojen molekülün (hedefin) kullanımdan önce saflaştırılma gereğinin olmamasıdır. Antikor içeren sensör sistemlerinde pek çok sinyal çevirici mekanizma kullanılmıştır (optik, kütle hassas, elektrokimyasal v.b.). Bu çalışmalar arasında en başarılı olanlar sinyalin amplifikasyonunu ve dolayısıyla işlemin hassasiyetini yükselten katalitik bir reaksiyon ile kombine edilmiş enzim-flüoresans tabanlı (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) yöntemlerdir. Medikal alanda kullanılan çoğu tespit yöntemi gibi PSA (Prostat Spesifik Antijen) testlerinin çoğu yine ELISA yöntemi ile tespit edilmektedir. Günümüzde rekombinant antikor üretimi sayesinde poliklonal veya monoklonal antikor üretiminde karşılaşılan sorunlar nispeten giderilmiş ve kısmen daha kısa süreli ve ucuz antikor üretimi sağlanmıştır. Rekombinant antikorlar HIV, Hepatit B ve C, Ebola, botulinum nörotoksin A/B v.b. pek çok

biyolojik ajan için kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile antikor kullanımının birleştirilmesi ile immüno-PCR yöntemi geliştirilmiş ve yüksek hassasiyette test sistemleri; tümör, viral patojenler, toksin ve metabolitlerin tespiti için kullanılmıştır. Ancak bu sistemler sahada kullanıma yönelik değildir. Bunun temel nedeni antikorların doğal yapıları gereği tekrar kullanılabilir özelliklerinin olmaması, geliştirilen sistemlerin laboratuvar koşullarında deneyimli ve eğitilmiş kişiler tarafından kullanılması gerekliliği, uzun cevap süreleri ve özellikle yüksek yanlış pozitif sonuç vermeleri dolayısıyla testlerin belirli zaman aralıkları ile tekrar edilme gerekliliğidir (Conroy et al. 2009; Lim et al., 2005).

#### **2.4.3.4. Aptamer-tabanlı Moleküler Tanı Sistemleri**

Biyolojik tanıma elemanı olarak aptamerlerin kullanıldığı biyosensör sistemlerine aptasensör adı da verilmektedir. Aptamer molekülleri geniş bir hedef molekül spektrumuna yüksek afinite ve spesifitede bağlanmaktadır ve moleküler tanı amaçlı kullanımları genel kabul görmüştür. Sentetik olarak üretildikleri için potansiyel kullanım alanları neredeyse sınırsızdır. Küçük moleküllerin, proteinlerin ve hücrelerin tespiti için kullanılabilirlerdir. Aptasensörler özellikle antikorların ve benzeri protein yapısındaki tanıyıcı elemanların, toksinleri küçük molekül yapılarından dolayı tespit etmedeki kısıtlamaları ortadan kaldırmaktadır. Yüksek bağlanma afiniteleri, kolay sentezlenmeleri, geniş uygulama alanı sayesinde biyosensör uygulamalarında tercih edilen gelişmekte olan bir tanıyıcı sınıfı oluşturmaktadırlar. Bütün bu üstünlüklerine rağmen aptamerlerin üç boyutlu yapılarının sensör sistemleri ile entegre edildiğinde korunmasındaki zorluklar ve tanıma işleminin uygun bir sinyale çevrilmesindeki zorluklar aptamerlerin biyosensör uygulamalarında kullanımlarını kısıtlamaktadır (Song et al., 2008).

#### **2.5. Model Aptamer Sistemi**

Model aptamer sistemleri, aptamer molekülleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda belirli bir standartın yakalanması amacıyla, literatürde genel olarak kullanılan ve kabul gören yayınlanmış SELEX yöntemi sonuçlarına dayanarak elde edilen aptamer-ligand yapılarıdır (Balamurugan et al., 2006). Bu çalışma sürecinde kullanılan model aptamer sistemi hakkında genel bilgiler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

### 2.5.1. Trombin Aptameri

Aptamerlerin kovalent bağ yardımı ile yüzeye immobilizasyonu yöntemi ile gerçekleştirilen analitik uygulamaların birçoğu, model sistem olarak trombin aptamerini kullanmaktadır. HD-1 olarak adlandırılan trombin aptameri 15 bazlık kısa bir DNA fragmanından (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') oluşmaktadır ve trombin enziminin exosite I bölgesine bağlanmaktadır (Bock et al., 1992; Wu et al., 1992; Paborsky et al., 1993; Tsiang et al., 1995). HD-1, aptamerlerinin biyoanalitik uygulamalara uygunluğunun ve immobilizasyon proseslerinin fizibilite çalışmalarının yapıldığı ilk sentetik oligonükleotid fragmanıdır. Literatürde HD-1 aptamer moleküllerinin; cam (Potyrailo et al., 1998), silika (Lee and Walt, 2000) yüzeyler üzerine ve karbon nanotüp (So et al., 2005), altın nano-partikül (Pavlov et al., 2004), kuantum nokta (Hansen et al., 2006) uygulamaları ile immobilizasyon prosesinin gerçekleştirildiği birçok Ar-Ge çalışması bulunmaktadır.

Trombin enziminin model aptamer sistemi olarak kullanılmasının en önemli nedenleri; (1) HD-1'in 15 bazlık kısa bir DNA fragmanından oluşmasından dolayı kolay sentezlenmesi, (2) HD-1'in DNA aptameri olmasından dolayı üç boyutlu moleküler yapısının kararlı olması ve (3) HD-1'in G-quarlet yapısının alternatiflerine göre çok daha detaylı bir şekilde karakterize edilmiş olmasıdır. Aptamer-ligand etkileşimleri üzerine yapılan çalışmaların birçoğunda (SPR, FRET, QCM v.b.) model aptamer olarak HD-1 kullanılmıştır. Ayrıca HD-1, biyoanalitik uygulama alanları ve mikroarray sistemleri içerisinde aptamer moleküllerinin optimum çalışma parametrelerinin belirlendiği araştırmalarda da model sistem olarak kullanılmıştır (Mairal et al., 2008).

1997 yılında trombin enzimine bağlanan 29 bazlık bir DNA aptameri daha geliştirilmiştir. HD-22 (5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGGACT-3') olarak adlandırılan bu DNA aptameri trombin enziminin exosite II bölgesine bağlanmaktadır (Tasset et al., 1997). Şekil 2.6.'da ikincil yapısının konformasyonu, verilen HD-22 aptameri içerisinde bulunan dört Guanin bazından oluşan G-quadruplex yapısı sayesinde HD-1 aptamerine göre daha stabil ve yüksek afinite ile trombin molekülüne bağlanabilmektedir (Tasset et al., 1997). Trombin molekülünün HD-22 aptameri ile gerçekleştirdiği moleküler etkileşim ise Şekil 2.7.'de verilmiştir. Trombin enziminin iki farklı bölgesine (exosite I ve exosite II)



## 2.6. Plazma Polimerizasyon Tekniği

Plazma, maddenin dördüncü hali olarak tanımlanır. Plazma polimerizasyon tekniği, her türlü materyalin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Radyo frekansı yük boşalımı, mikrodalga, atmosferik basınç, düşük basınç, düşük sıcaklık v.b. farklı sistemler ile plazma modifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Plazma modifikasyonu, bozulma ve aşınma, oksidasyon, çapraz bağlanma gibi yüzeyin çok ince bir tabakasında oluşan yapısal değişimler sonucunda, modifiye edilmemiş yüzeylerden tamamen farklı özelliklere sahip yeni yüzeyler elde edilmektedir (Yasuda, 1984; Kaminska et al., 2002).

### 2.6.1. Plazmanın Yapısı

Plazma maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden oldukça farklı özelliklere sahip olması nedeniyle maddenin dördüncü hali olarak tanımlanır (Akman, 1993; Li et al., 1997). Genel olarak plazma, yüksek sıcaklıkta kuvvetli elektrik veya magnetik alanların etkisi ile oluşur. Güçlü bir elektriksel boşalım da plazma oluşturabilir. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar, ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer ederler. Bunların da birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller, iyonlar, vb. oluşur (Akman, 1993; Li et al., 1997; Tusek et al., 2001). Sıcak plazmada, ortamda esas olarak çok sayıda iyon vardır. Soğuk plazmada ise diğer parçacıklar da önemli miktarda bulunmaktadır. Plazma, gaz sıcaklığına bağlı olarak iki başlık altında incelenebilir (Li et al., 1997; Tusek et al., 2001):

- a) Yüksek sıcaklık plazması; gaz sıcaklığı 106K'den fazladır. Güneş sisteminde meydana gelen nükleer patlamalar ve kontrollü füzyon reaksiyonları yüksek sıcaklık plazmasına örnek olarak verilebilir.
- b) Düşük sıcaklık plazması; gaz sıcaklığı 106K'den daha düşüktür. Düşük sıcaklık plazması da iki başlık altında incelenebilir: (i) Sıcak plazma; gaz sıcaklığı 1000K'den daha fazladır, normal şartlarda 104K civarındadır. Lamba ışınması, elektrik arkı ve diğer yüksek-güç boşalımları sıcak plazmaya örnek olarak verilebilir; (ii) Soğuk plazma; gaz sıcaklığı 1000K'den daha düşüktür, normal şartlarda 102K civarındadır. Düşük

basınçta gerçekleşen yük boşalım plazmaları soğuk plazmaya örnektir ( $1\text{eV}=11600\text{K}$ ).

Plazma ortamına konulan bir materyal yüzeyinde kopmalar “etching” veya birikme “deposition” oluşur. Plazma koşullarının ayarlanmasıyla bu iki prosesten birinin etkin olması söz konusudur. Bu uygulamalarda plazmada kaplamanın iki önemli avantajı vurgulanmaktadır. Bunlar; (1) kaplamanın çok homojen kalınlıkta ve (2) ince olmasıdır (Yasuda, 1984; Flosch et al., 1992).

Plazma polimerizasyonunda özellikleri değiştirilecek materyal yüzeyinde oluşan polimerin kimyasal yapısı, birikim miktarı (kalınlığı) ve bunların homojenitesini etkileyen birçok parametre vardır. Ayrıca, plazma polimerizasyonu tekniğinde kullanılan monomerlerin kolaylıkla polimerize olabilen çift bağlar gibi reaktif fonksiyonel gruplara sahip olmaları gerekir. Plazma etching ve plazma polimerizasyonu arasındaki denge boşalım parametreleriyle kontrol edilebilmektedir (Flosch et al., 1992).

### **2.6.2. Plazma Polimerizasyonu Hızını Etkileyen Parametreler**

Plazma polimerizasyonunun hızı kullanılan monomerin yapısına bağlıdır (Yasuda, 1985). Buna ek olarak, plazma polimerizasyonunun hızına etki eden kontrol edilebilen parametreler reaktör geometrisi, monomer akış hızı, basınç, boşalım gücü, plazma süresi, frekans, elektrot açıklığı v.b. makro parametrelerdir (Kaminska et al., 2002). Bu parametrelerin etkileri aşağıda ayrı ayrı ele alınarak özetlenmiştir. Monomerin yapısının doymamışlık derecesinin, plazma polimerizasyon hızına etkisi çok önemlidir. Benzer reaksiyon koşullarında, üçlü bağ içeren asetilen, ikili bağ içeren etilenden daha hızlı polimerize olmaktadır.

Reaktör geometrisi, yüzeye biriken polimerin kimyasal yapısını ve kalınlığını, dolayısıyla kaplamanın her iki yönden de homojenitesini etkileyen önemli hususlardan biridir. Plazma polimerizasyonunda değişik şekillerde dizayn edilmiş reaktörler kullanılmaktadır. Reaktörün tübüler, dikdörtgen kesitli veya diğer şekillerde olması monomerin reaktör içinden akış dinamiğini etkiler. Monomerin plazma bölgesinden geçiş hızı (alıkonma süresi) ve şekline (türbülent, laminer v.b.) bağlı olarak birikimin kimyasal yapısı ve homojenitesi değişir.

Monomer akış hızının, hem birikim miktarını hem de dolaylı olarak biriken polimer kimyasını değiştirdiği rapor edilmektedir. Monomerin akış hızının artmasıyla, genellikle birikim doğrusal olarak azalır. Düşük monomer besleme hızlarında, konvektif akım terimlerinin etkisinin azalmasıyla, difüzyonun baskın olacağı durumda, reaktöre beslenen hemen hemen tüm monomerin polimerize olarak yüzeyde birikmesi mümkün olabilmektedir.

Basınç, plazma ortamının yapısını, dolayısıyla polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken polimer yapısını etkileyen önemli bir parametredir. Elektriksel boşalım öncesi basınç ( $P_o$ ) ile elektriksel boşalım sırasında basınç ( $P_g$ ) birbirinden farklıdır.  $P_o$  belirli bir akış miktarında pompalama miktarıyla orantılıdır. Pompalama miktarı arttıkça  $P_o$  miktarı düşer. Gaz moleküllerinin iyonizasyonu ve hızı basınca bağlı olduğundan  $P_g$ 'nin değeri polimer birikim hızını ve polimerik kaplamanın kimyasal yapısını etkiler.

Genellikle boşalım gücü arttıkça polimer birikim miktarı artar. Elektriksel boşalım reaktör içinde tamamen gerçekleştikten sonra ilave edilen voltajın, serbest radikallerin üretimini artırmadığı, böyle durumlarda monomerin akış miktarının, polimer birikimini belirleyen parametre olarak önem kazandığı not edilmelidir.

Plazma polimerizasyonunda yatıksın duruma ulaşıldıktan sonra, sürenin artmasıyla yalnızca kaplama kalınlığının arttığı, polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken polimerin yığın yapısında önemli bir değişiklik olmadığı söylenebilir. İç elektrot açıklığı da plazma polimerizasyonun hızını etkileyen önemli bir faktördür. İç elektrot açıklığı daraltıldığında (yüksek elektron yoğunluğu) hız artmaktadır.

Gerek organik ve gerekse organo-metalik bileşiklerin plazma ile polimerleşme mekanizmaları ve polimerleşme kinetikleri oldukça karışıktır. Plazma polimerizasyonunda polimer bir seri kompleks reaksiyonlar sonunda oluşmaktadır.

Bu nedenle gerek polimer oluşturma (ve depolanma) hızı, gerekse oluşan polimerlerin çeşitli özellikleri elektriksel boşalma ile ilgili çeşitli koşullara bağlıdır. Böylece deney değişkenleri arasında yukarıda detayları açıklandığı üzere;

- a) Uygulanan elektriksel boşalmanın türü (iten elektrodla kapasitif, dıştan elektrotla induktif v.b.)
- b) Uygulanan elektriksel boşalma ile ilgili diğer değişkenler (boşalmanın gücü, frekansı, monomer basıncı, monomer akış hızı v.b.)
- c) Elektriksel boşalmanın uygulandığı reaksiyon kabı (reaktör) ile ilgili değişkenler (reaktör yatay boru şekli, monomerin giriş ve elektrotlara göre dağılış geometrisindeki farklılıklar v.b.)
- d) Polimerin zerine kaplandığı ortamın yeri, şekli, yapısı v.b. bazı unsurlar rol oynamaktadır.

### **2.6.3. Plazma Polimerizasyonun Mekanizması**

Genel olarak, materyal yüzeyleri ile düşük basınçta meydana gelen yük boşalımı plazmasının reaksiyonları üç başlık altında özetlenmiştir (Tusek et al., 2001);

- a) Yüzey Reaksiyonları: Gaz fazında bulunan türler ile yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonlar ve sadece yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonlar yüzeyde sırasıyla fonksiyonel gruplar ve çapraz bağlar oluşturmaktadır. Bu tür reaksiyonların örnekleri, argon, amonyak, karbonmonoksit, karbondioksit, flor, hidrojen, azot, azotdioksit, oksijen ve suyla gerçekleştirilen plazma işlemlerini içermektedir.
- b) Plazma Polimerizasyonu:  $CH_4$ ,  $C_2H_6$ ,  $C_2F_4$  ve  $C_3F_6$  gibi organik bir monomerin polimerizasyonu yoluyla materyal yüzeyinde ince bir film oluşumu plazma polimerizasyonu prosesini oluşturur. Plazma polimerizasyonu, gaz fazındaki türler arasındaki reaksiyonları, gaz fazındaki türler ile yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları ve sadece yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları içermektedir. Plazma polimerizasyonunun mekanizması, gaz faz ve yüzeyde meydana gelen reaksiyonların her ikisini de içeren polimerizasyon prosesinin karmaşıklığı nedeniyle henüz yeterince

anlaşılammıştır. Ortamda mevcut olan çeşitli reaktif gruplar (iyonlar, serbest radikaller v.b.) RF plazma polimerizasyon reaktöründe monomerin polimerizasyonuna katkıda bulunmaktadır.

- c) Temizleme ve Yüzeyden Kopmalar (Ethcing): Bir materyal yüzeyinde bulunan maddeler yüzeyden uçucu ürünler oluşturulmak koşuluyla kimyasal reaksiyonlar ile fiziksel kopmalar şeklinde uzaklaştırılırlar. Yüzeylerden organik bulaşırıların uzaklaştırılması için oksijen içeren plazmalar kullanılmaktadır.

Genel olarak plazma, yüksek sıcaklıklar kuvvetli elektriksel veya magnetik alanların etkisinde oluşur. Herhangi bir elektriksel boşalmanın plazma olarak adlandırılabilmesi için öncelikle ortamdaki pozitif ve negatif yük taşıyıcılarının sayıca birbirine eşit olmaları koşulu gereklidir. Plazmada iyonlaşma derecesinin  $10^{-5}$  ile  $10^{-6}$  arasında olduğu öne sürülmektedir. Bu ise plazma ortamında büyük ölçüde elektronların bulunması demektir. Aynı çalışmada, plazmada serbest radikal konsantrasyonunun iyonlara kıyasla,  $10^3$  -  $10^4$  defa daha fazla olduğu belirtilmektedir. Plazmada pozitif ve negatif yük taşıyıcılarının birbirine eşit olmaları koşulu az sayıdaki elektron ve pozitif iyonların sayıca eşit olmaları demektir.

Plazma polimerizasyonu, 'plazma-uyarılmış' ve 'plazma-hal' polimerizasyonunun toplamını içerir. Monomerlerin, doğrudan polimere eklenmesi ile gerçekleşen polimerizasyona 'plazma-uyarılmış' polimerizasyon adı verilmektedir. Önce atomların birleşmesi ile ara ürünlerin, daha sonra da son ürünün oluşması ile gerçekleşen polimerizasyon mekanizmasına 'plazma hal' polimerizasyonu adı verilmektedir. Plazma polimerizasyon her iki polimerizasyonun toplamı şeklinde oluşur.

#### **2.6.4. Plazma Polimerizasyon Tekniğinin Avantajları**

Plazma polimerizasyonu ile bir ön koşul aranmaksızın tüm organik bileşikler kullanılarak materyal yüzeylerinin değiştirilmesi yöntemin en önemli avantajıdır. Diğer kaplama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, çok ince ve çok daha homojen kalınlıkta kaplama sağlanabilmektedir. Bu nedenle plazma polimerizasyonu uygulanmış yüzeyler birçok pratik uygulamada kullanım alanı bulabilmektedirler. Proses son derece temizdir, bir başka ifadeyle klasik proseslerde kullanılan

çözücülere, başlatıcılara, stabilizörlere v.b. burada gerek olmadığından ürün çok saftır. Bu özellikle tıp uygulamalarında önemli bir avantaj olarak vurgulanmaktadır. Kaplama diğer yöntemlerde birçok basamakta ve uzun sürede (24 saat gibi) başarılırken burada, tek basamaklı bir işlemle sonuca çok kısa zamanda (1 saatten az) ulaşılmaktadır (Mutlu et al., 1997). Çünkü yük boşalım tekniği ile gerçekleştirilen modifikasyon işleminde prepolimer sentezi, kaplama solüsyonun hazırlanması, kaplama prosesi, kurutma gibi prosesler tek basamakta gerçekleştirilmektedir (Inagaki et al., 1982; Flosch et al. 1992). Düşük sıcaklık plazma polimerizasyonu yönteminin en önemli avantajlarından birinin de substratların sadece en dışta bulunan tabakalarının modifikasyondan etkilenmesi olduğunu belirtmişlerdir. Böylece, modifiye edilen substratların yakın özellikleri değişmediğinden dolayı yüzey özellikleri kontrollü bir şekilde modifiye edilebilmektedir.

## **2.7. Aptamer Moleküllerinin İmmobilizasyonu**

Aptamerlerin moleküler tanıma elementi olarak sahip olduğu avantajlardan dolayı literatürde aptamerlerin analitik uygulamaları (sensör, afinite kolonları v.b.) üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Çizelge 2.3.'de özetlenmiş olan bu analitik uygulamalar, aptamer moleküllerinin terapötik, *in-vitro* ve *in-vivo* diagnostik ve *in-vivo* görüntüleme alanlarında sahip olduğu yüksek potansiyeli vurgulamaktadır.

Aptamer moleküllerinin Çizelge 2.3.'de özetlenen uygulama alanlarından birçoğu, analitik olarak bir cihaz içerisine entegre olmak için immobilizasyon proseslerine ihtiyaç duymaktadır. Aptamer immobilizasyonu için en önemli kriter aptamer molekülünün afinitesini ve spesifikliğini kaybettirmeden belirlenen yüzeye tutuklanmasını sağlamaktır. Bu kriter genellikle immobilizasyon prosesinde, aptamer molekülünü yüzeye bir bağlayıcı yardımı ile kovalent olarak bağlanması ya da fizyosorpsiyon yöntemi ile non-kovalent olarak tutuklanması ile sağlanabilmektedir (Balamurugan et al., 2008). Örnek olarak yüzey plazmon rezonans (SPR), akustik dalga ve elektrokimyasal analiz teknikleri, aptamer moleküllerinin metal yüzeye bir bağlayıcı yardımı ile çok yakın olacak bir şekilde bağlanması ile analitik sinyal üretimini gerçekleştirebilmektedirler (Baldrich et al., 2004; Gronewold et al., 2005). Afinite kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi kromatografik teknikler de ise afiniteye bağlı seperasyon prosesinin yoğun çözelti

akışından etkilenmemesi amacıyla, immobilizasyon aptamer moleküllerinin durağan fazda kalması için gerçekleştirilmektedir. Bu durum, sandviç veya immuno-absorpsiyon tipi analiz sistemleri içinde geçerlidir (Balamurugan et al., 2008).

İmmobilizasyon, aptamer moleküllerinin daha kolay kurtarılmasına ve sensör ya da analiz cihazlar içerisinde, yıkama ve rejenerasyon basamaklarından sonra yeniden kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Balamurugan et al., 2008). Ayrıca immobilizasyon, farklı hedef moleküllere karşı geliştirilmiş aptamerlerin bir araya getirilmesi ile kurulan mikroarray sistemlerinin oluşturulmasına imkân vermektedir (Cho et al., 2006).

Çizelge 2.3. Aptamer-ligand etkileşimlerini inceleyen farklı analitik yöntemler (Balamurugan et al., 2008).

Yüzey ve Yüzey Modifikasyonu	Analitik Metot
Altın ve altın yüzey üzerine yapılan kaplamalar	SPR, akustik dalga, elektrokimyasal teknikler, QCM, UV, AKM, FRET, elipsometre,
Silika, silikon, TiO <sub>2</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ve silika yüzey üzerine yapılan kaplamalar	Flüoresans spektrometresi, kütle spektrometresi, flüoresans mikroskobu, kapiler elektroforez, AKM, afinite kromatografisi
Polimerler yüzey üzerine yapılan kaplamalar	HPLC
Karbonhidratlar	Flüoresans mikroskobu
Tek duvarlı karbon nanotüpler	Karbon nanotüp field-effect transistorü
Quantum dots	Fotoluminesans
DNA/RNA problemleri	Flüoresans

Çizelge 2.3.'de özetlenen birçok farklı analitik metot aptamer tabanlı uygulamaların geliştirilmesi için kullanılmakta ve yüzey seçimi uygulama alanına paralel olarak değişim göstermektedir. Metalik yüzeyler, özellikle altın, genel olarak SPR ve elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmaktadır (Baldrich et al., 2004). Literatürde QCM ve AKM sistemlerinde yüzey olarak silikonun kullanıldığı çalışmalara rastlansa da, altın-thiol monomoleküler tabakasının oluşturulmasının kolaylığı nedeniyle genellikle yüzey olarak altın kullanılmaktadır (Liss et al., 2002; Minunni et al., 2004; Jiang et al., 2003). Flüoresans ve UV gibi optik ölçümler için kullanılan

yüzeyle sinyal iletiminde transparanlık sağlamları nedeniyle cam ya da polimer içerikli substratlardan oluşmaktadır (Huang et al., 2005; Su et al., 2007).

Aptamerler kromatografik yöntemlerde kiral moleküllerin birbirlerinde ayrılması prosesinde aptamer molekülleri kolon materyaline, genellikle silika partiküllerine, immobilize edilerek kullanılmaktadırlar (Huang et al., 2004). Biotin ile 3' ya da 5' bölgelerinde modifiye edilmiş aptamer moleküllerinin streptavidin ile kaplanmış polimer partiküllerine edilmiş yüzeyle üzerine immobilizasyonu, yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) yönteminde kullanılmaktadır (Michaud et al., 2003).

## **2.8. Aptamer İmmobilizasyonunun Kimyası**

Aptamer immobilizasyonu için pek çok kimyasal yöntem mevcut olup, bunlar daha önce DNA ve diğer biyomoleküllerin immobilizasyonu için kullanılan yöntemler temel alınarak geliştirilmiştir (Wittmann, 2005; Wittmann, 2006). Farklı yüzeyle için geliştirilmiş aptamer immobilizasyon yöntemleri aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

### **2.8.1. Altına Doğrudan Bağlanma**

#### **2.8.1.1. Altın Yüzeyle Aptamer İmmobilizasyonu**

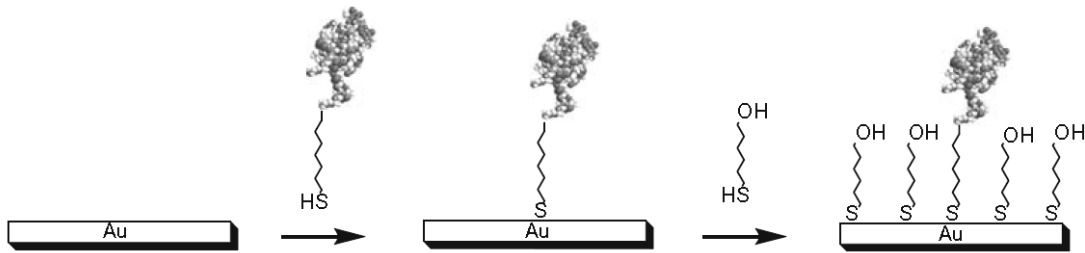
Altın yüzeyle ile geliştirilen ilk aptasensörler 2002 yılında yayımlanmıştır (Liss et al., 2002). Ancak farklı yüzeyle kullanılarak oluşturulan aptasensörler ile ilgili veriler 1998 yılında yayımlanmıştır (Potyrailo et al., 1998). Aptamerlerin altın yüzeyle immobilizasyonu için de kullanılan tiyol kimyasının yayım tarihi DNA hibridizasyon çalışmaları kadar eskidir. Aptamerlerin altın yüzeyle tutuklanması için kullanılan yöntemler genellikle biyolojik olmayan tek tabakaların, tiyol aracılığı ile altın yüzeyle kimyasal absorpsiyon yöntemini takip etmektedir. Tipik olarak temizlenmiş bir altın yüzeyle, tiyollenmiş aptamer içeren bir tampon çözeltisine daldırılarak aptamerin yüzeylede tek tabaka oluşturması sağlanmaktadır (Wittmann, 2005; Wittmann, 2006).

Bu tabaka; yüzeyle plazmon rezonans (SPR) (Baldrich et al., 2004), kuartz kristal mikrobals (QCM) (Liss et al., 2002), elipsometre (Balamurugan et al., 2006) yöntemlerinde kullanılan planar altın yüzeyle üzerinde oluşturulabileceği gibi, altın nanopartiküller üzerinde de olabilmektedir (Bock et al., 1992). Altın yüzeylede

aptamer tek tabakalarının oluşturulma kolaylığı göz önüne alındığında, bu yöntem, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) uçlarının ve kantilever uçlarının fonksiyonelleştirilerek aptamer ile hedef molekülü arasındaki etkileşimin incelenmesinde de kullanılabilir.

Aptamer tek tabakalarının yapı ve bileşimlerinin belirlenmesi için kullanılan yüzey analiz yöntemleri olarak; X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), optik ellipsometri, taramalı prob mikroskopisi, reflektans infrared absorpsiyon spektroskopisi ve temas açısı ölçümleri kullanılmaktadır (Balamurugan et al., 2008). Aptasensörler ve bağlanma analizleri için kullanılan analitik yöntemler arasında ise; yüzey plazmon rezonans (SPR) spektroskopisi (Baldrich et al., 2004), kuartz kristal mikrobalsans (QCM) (Liss et al., 2002), ve diğer kütle hassas yöntemler kullanılmıştır. Ancak en sık kullanılan yöntemler flüoresans (Potyrailo et al., 1998) ve elektrokimyasal analiz teknikleridir (Xiao et al., 2005). Çizelge 2.3.'de aptamer-ligand etkileşimlerini inceleyen farklı analitik yöntemler özetlenmiştir.

Aptamerlerin altın yüzeylere immobilizasyonu için tiyol kimyası kullanıldığından, uygun tiyol ucu içeren aptamer seçimi de son derece önemlidir. Tiyol ucu içeren aptamerler üç bölümden oluşmaktadır; (1) tiyol (-SH) veya disülfid (-SSR) ucu, (2) bir bağlayıcı (veya "Spacer") ve (3) aptamer dizisi (Şekil 2.8.). Günümüze kadar tiyol uçlu aptamerler yalnızca planar altın yüzeyleri için kullanılmış olup, altın nanopartiküller için disülfid uçlu aptamerler kullanılmıştır. Çoğu tiyol uçlu aptamerler ticari olarak stabil simetrik, olmayan disülfid şeklinde bulunmaktadır. Aptamer-bağlayıcı-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH örneğinde görüldüğü üzere, bu yapılarda bir sülfür atomu aptamere bağlı olup diğer sülfür grubu merkaptogegzanole (MCH) bağlıdır.



Şekil 2.8. Tiyol ucu içeren aptamerler üç bölümden oluşmaktadır; (1) tiyol (-SH) veya disülfid (-SSR) ucu, (2) bir bağlayıcı (veya "Spacer") ve (3) aptamer dizisi.

## **2.8.2. Fonksiyonel Olarak Modifiye Edilmiş Yüzeyle Kovalent Bağlanma**

### **2.8.2.1. Modifiye Yüzeylerin Genel Kimyası**

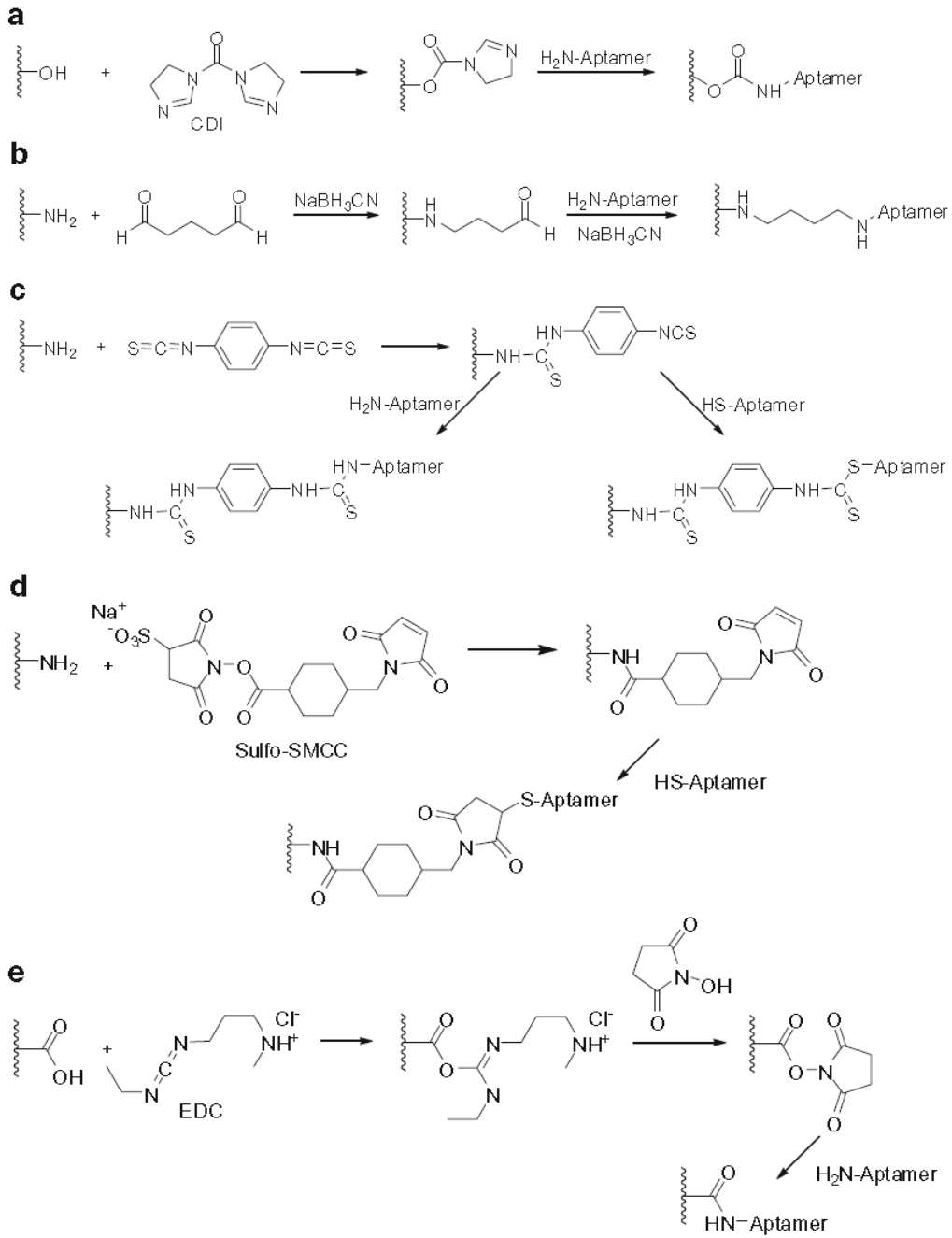
Belirli bir yüzey (altın, silikat, polimer v.b.) aktif bir dış tabaka ile modifiye edildikten sonra pek çok farklı konjügasyon kimyası kullanılabilir. Yüzey fonksiyonelleştirme stratejisi, hangi fonksiyonel grubu içeren aptamerin kullanılabilir formda bulunduğuna göre seçilmektedir. Günümüzde amin, tiyol ya da biyotin ucu içeren aptamer molekülleri rapor edilmiştir. Bu durum immobilizasyon için kullanılacak kimyasal yöntemleri ciddi oranlarda kısıtlamaktadır. Biyotin uçlu aptamerler, yüzeye immobilize edilmiş avidine veya türevlerine bağlanabilmektedir. Amin veya tiyol grubu içeren aptamerlerin kovalent bağlanması ise, daha önce literatürde çok sık yayınlanan ve bu aktif grupları içeren biyomoleküllerin immobilizasyonu için kullanılan yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Bu aptamer immobilizasyon yöntemlerinin çoğu Şekil 2.9.'de gösterilen reaksiyon kimyalarına uymaktadır (Klussmann, 2006).

Yüzeye bağlamada en yaygın kullanılan üç grup; (1) yüzey hidroksil, (2) amin ve (3) karboksilik asit fonksiyonel gruplarıdır. Hidroksillenmiş yüzeyler öncelikle karbonildiimidazol (CDI) ile modifiye edilmekte (Şekil 2.9a.) ve oluşan reaktif ara ürün, amino uçlu aptamer ile stabil bir karbamat bağı oluşturmaktadır. Amin ucu içeren aptamerler ise, yüzey amin grupları glutraldehit ile (Şekil 2.9b.) veya simetrik diisotiyosiyanat ile muamele edilerek immobilize edilebilmektedir (Şekil 2.9c.).

### **2.8.2.2. Altın Yüzey Üzerindeki Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM) Üzerine Aptamer Bağlanması**

Altın yüzeyler, daha sonra aptamer immobilizasyonu için yüzey üzerindeki kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) ile kolayca modifiye edilebilmektedirler. Bu yöntemin en büyük avantajı, oluşturulan tek tabakanın, aptamerlerin altın yüzeyine spesifik olmayan adsorpsiyonunu engellemesidir. Nitekim özellikle çok sayıda amin grubu içeren oligonükleotidlerin altın yüzeyine spesifik olmayan adsorpsiyonu sorun teşkil etmektedir. Ayrıca bu yöntemle, ultra viyole (UV) ışığı kullanılarak litografik desenler oluşturulabilmektedir (Gronewold et al., 2005). Ayrıca fonksiyonelleştirilmiş tek tabakalar, daha sonra biyotin uçlu aptamerlerin

immobilizasyonu için, yüzeye avidin veya türevlerinin bağlanması için de kullanılmaktadırlar.

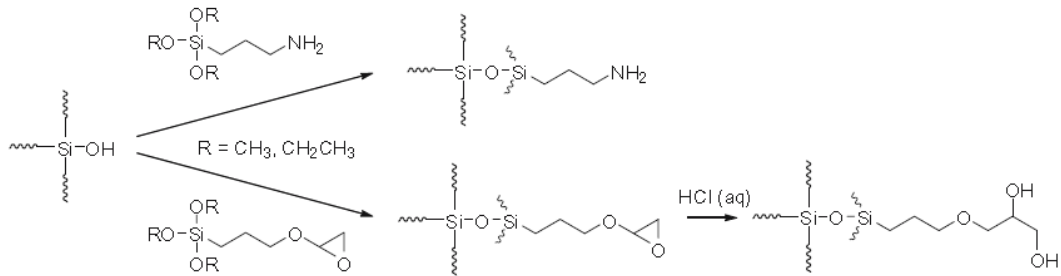


Şekil 2.9. Aptamer moleküllerinin yüzeye kovalent bağlanma reaksiyonlarının kimyası (Klussmann, 2006).

### 2.8.2.3. Silikatlar veya Silikon Yüzeyler

Silikat veya silikon yüzeyler üzerine yapılacak çoğu uygulama; öncelikle yüzeyin, dördüncü değerlik bölgesinde aminopropil veya glisidoksiopropil kısımları içeren trialkoksisilan (trimetoksisilan, trietoksisilan v.b.) kullanılarak modifiye edilmesini gerektirmektedir (Şekil 2.10.). Aptamer immobilizasyonu için en sık kullanılan yöntemlerde, aminopropilsilan ile fonksiyonelleştirilmiş yüzeyler kullanılmaktadır. Örneğin glutraldehit yüzey ile amin uçlu aptamer arasında bağ kurmaktadır. Bir diğer sık kullanılan yöntemde ise 1,4 fenilen diizosiyanat önce yüzeydeki amin grupları ile, sonra da aptamerin ucundaki amin grubu ile reaksiyona girmektedir (Şekil 2.9c.) (Gronewold et al., 2005).

Alternatif olarak tiyol ucu içeren aptamer de yüzeydeki amin grupları üzerinden reaksiyona giren 1,4 fenilen diizosiyanat kullanılarak immobilize edilebilmektedir (Şekil 2.9c.). Son olarak da, önce yüzeydeki amin grupları ile reaksiyona giren, sülfosuksinimidil-4-(N-maleimidometil)-siklohegzan-1-karboksilat (Liss et al., 2002), kullanılarak tiyol ucu içeren aptamer molekülleri yüzeye bağlanabilmektedir.



Şekil 2.10. Silikat veya silikon yüzeyler üzerine yapılan aptamer immobilizasyonunun genel reaksiyon kimyası (Klussmann, 2006).

### 2.8.3. Biyokaplama Teknolojisi

Avidin ile biyotin arasındaki güçlü etkileşim, aptamerler dahil pek çok biyomolekül immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem uygulama açısından göreceli olarak kolay olmakla birlikte, biyotin ucu içeren aptamerin avidin kaplı bir yüzey ile uygun tampon çözeltisinde inkübasyonunu gerektirmektedir.

Yüzeylere avidin fizyosorpsiyon veya bilinen yöntemlerle kovalent bağlama ile veya altın yüzeyler üzerinde yüzey üzerindeki kendiliğinden oluşan tek tabakalar

(SAM) oluşturmak suretiyle kaplanabilmekte, biyotin uçlu aptamerler ise ticari olarak temin edilebilmektedir. Avidin veya türevleri silikat yüzeyleri üzerine kaplanmış şekilde veya polistiren yüzeyler üzerinde kaplanmış streptavidin ticari ürünler olarak piyasada bulunmaktadır, ancak avidin kaplı altın yüzeyler henüz ticarileştirilmemiş olduğundan ancak laboratuvar koşullarında üretilebilmektedir (Balamurugan et al., 2008).

#### **2.8.4. Aptamer İmmobilizasyonu için Kullanılan Diğer Yüzeyler**

Aptamerlerin tek duvarlı karbon nanotüplerle birleştirildiği “field effect transistor (FET)” sensör sistemleri geliştirilmiştir. Aptamerlerin küçük boyutları, antikora kıyasla büyük bir avantaj sağlayarak, elektriksel çift tabaka içinde bağlanmayı gerçekleştirmektedir (yaklaşık olarak 3nm’de). Bu durum sensör cevabının hassasiyetini arttırmaktadır. Ayrıca aptamer moleküllerinin; DNA, antikolar ve pek çok enzimin aksine dehidrasyona dayanıklı olmaları, patojen tespiti, uzaklaştırılması veya deaktivasyonu için “biyoaktif kağıt” teknolojisinin geliştirilmesinde kullanımını gündeme getirmiştir (Ho and Leclerc, 2004; Ho et al., 2005).

Literatürde kuantum noktalara aptamer immobilizasyonu için basit bir prosedür, etiketlememiş aptamerlerin kuantum noktalara astat-sodyum sülfid çözeltisinde adsorpsiyonu üzerinden gerçekleştirilmiştir (Choi et al., 2006). Bu çalışmalarda model aptamer sistemi olarak genellikle HD-1 trombin aptameri kullanılmıştır.

#### **2.8.5. Kritik İmmobilizasyon Parametreleri**

##### **2.8.5.1. Bağlayıcı**

Aptamerlerin yüzeylere immobilizasyonu, aptamerin ucundaki fonksiyonel gruba bağlanan bir bağlayıcının kullanımını gerektirmektedir. Bağlayıcının temel işlevi, aptameri yüzeyde tutmak ve aptamere hedef analitin ulaşabilmesini sağlamaktır. Bağlayıcı her durumda, aptamerin ucundaki fonksiyonel gruba doğrudan bağlı olan bir alkil grubu içermektedir. Bu grubu takiben bazen bir oligoetilen glikol ve/veya oligonükleotid “spacer” bulunmaktadır. Her bir modüler ünite bağlayıcı ünite “X” ile bağlanmıştır. “X” genellikle, otomatik DNA sentezinde kullanılan fosforamidit kimyası sonucu ortaya çıkan fosfat grubudur. En sık kullanılan alkil grubu hegzametilen bağlayıcısıdır  $[-(CH_2)_6-]$ , ancak trimetilen  $[-(CH_2)_3-]$ , nonametilen  $[-$

(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>–] ve dodasean [–(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>–] bağlayıcılarının kullanıldığı durumlar da mevcuttur (Klussmann, 2006).

Literatürde aptamer immobilizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda genellikle aptamerin bağlanmasından önce, bir oligonükleotid “spacer” grubu, bağlayıcı grubun bir parçası olarak yapıya katılmıştır (Balamurugan et al., 2008). “Spacer” grup olarak oligonükleotidin kullanımı, otomatik DNA/RNA sentezi esnasında nükleotidlerin yapıya katılmaları özelliklerinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve çoğunlukla değişen sayılarda timin (T) bazlarından oluşmaktadır.

Bu durumun temel nedeni timin bazının diğer DNA bazlarına kıyasla çeşitli yüzeylere spesifik olmayan adsorpsiyon oranının daha düşük olmasıdır (Kimura-Suda et al., 2003). “Spacer” grubundaki T nükleotid sayısı T<sub>1</sub>-T<sub>20</sub> aralığında değişiklik göstermektedir. Bu durum, literatürdeki yüzey DNA hibridizasyonunda kullanılan bağlayıcı tasarımı için de aynen geçerlidir (Baldrich et al., 2004). “Spacer” grup olarak başka oligonükleotidler de kullanılmıştır. Örneğin altın kaplanmış atomik kuvvet mikroskobu (AFM) uçlarının yüzeyine 15-mer trombin HD-1 aptamerini bağlamak için 33-mer rastgele dizimli oligonükleotidi spacer olarak kullanmışlardır. Daha kısa sekanslar da spacer olarak kullanılmıştır, IgE aptameri için 5'-GCGC-3' sekansını (Liss et al., 2002), HD-1 trombin aptameri için 5'-CCAAC-3' sekansını altın yüzeylere immobilizasyon amacıyla kullanmışlardır. Bu çalışmalarda ayrıca, “spacer” grubun ayrılma sabitini ve yüzeye spesifik olarak bağlanan protein miktarını nasıl iyileştirdiği de açıklanmıştır.

Literatürde 5'-GCGC-3' sekansının “spacer” olarak kullanımı ile IgE için ayrılma sabitinin (K<sub>d</sub>) 3.6 nM düzeyine gelerek iyileştiğini gösterilmiştir (“spacer” kullanılmadığı durumda ise 8.4 nM) (Liss et al., 2002). Ayrıca 20 baz uzunluğundaki oligotiminin sekansı “spacer” olarak HD-1 trombin aptameri ile kullanıldığı zaman, spacer kullanılmadığı duruma kıyasla protein bağlanmasının iki katına çıktığını gösterilmiştir (Centi et al., 2007). Hegzaetilen glikol bağlayıcısı beş bazlı oligotimidin “spacer” sekansı ile birlikte kullanıldığı durumda [HS–(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>–OPO<sub>3</sub>–(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>–TTTTT–aptamer], bu yöntemin sensör yüzeyinde trombin bağlanmasını, yalnızca beş bazlı oligotimidin kullanıldığı duruma kıyasla dört kat arttırdığını ortaya çıkarılmıştır (Balamurugan et al., 2006).

Literatürde oligoetilen glikol bağlayıcılarının, yüzeye immobilize edilmiş DNA moleküllerinin hibridizasyon etkinliğini de arttırdığı gösterilmiştir (Hurst et al., 2006). Dolayısıyla, oligoetilen glikol'ün modüler bileşen olarak kullanımı, yüzeye bağlı oligonükleotidlerin bağlanma etkinliklerini arttıran genel bir yöntem olarak kabul görmektedir.

#### **2.8.5.2. Aptamer Moleküllerinin 5' ile 3' Bölgelerinden İmmobilizasyonu**

Bağlayıcı ve fonksiyonel grup ucu yüzeylere 5' veya 3' bölgelerinden bağlanabilmektedir. Literatürde aptasensör geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda her iki yöntem de kullanılmaktadır. Bağlayıcı ve fonksiyonel grup ucu yüzeylere 5' veya 3' bölgelerinden bağlanabilmeleri, biyotin uçlu trombin, lizozim, IgE ve risin aptamerleri için incelenmiştir (Cho et al., 2006). Elde edilen sonuçlar ise farklı aptamer molekülleri için değişiklik göstermektedir. Lizozim ve IgE aptamerleri 3' ucundan immobilize edildiklerinde % 14-30 oranında daha yüksek hassasiyet göstermekte iken, risin ve trombin aptamerleri 5' bölgesinden immobilize edildikleri zaman % 26-28 daha yüksek hassasiyet göstermişlerdir.

#### **2.8.5.3. Aptamer Moleküllerinin Rejenerasyonu**

Aptamer immobilize edilmiş yüzeyler ile hedef ligandın etkileşiminden sonra, aptamer-ligand kompleksinin ayrılması, immobilize yüzeylerin tekrar kullanımı için önemlidir. İdeal olarak rejenerasyon çözeltilerinin hedef-aptamer arasındaki etkileşimleri ortadan kaldırırken aptamer moleküllerinin degradasyonuna neden olmaması gerekmektedir. Aptamer molekülleri için pek çok rejenerasyon stratejisi mevcuttur. Bu stratejiler; ısı, konsantre tuz çözeltisi, asidik veya bazik çözelti, üre veya guanidinium hidroklorür gibi kaotropik ajanlar, sodyum dodesil sülfat gibi sürfaktantlar, EDTA gibi kelat oluşturucu ajanlar veya bunların iki veya daha fazlasının kombinasyonunun aynı anda kullanımından oluşmaktadır (Andersson et al., 1999).

### 3. MATERYAL ve METOT

Sunulan çalışmanın amacı, aptamer moleküllerinin, yapılarında herhangi bir kimyasal modifikasyon gerçekleştirilmeden, tutuklanmasını sağlamak için “etiketsiz” bir aptamer immobilizasyon yönteminin araştırılmasıdır. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar altı temel aşamada tamamlanmıştır.

Gerçekleştirilen bu aşamalar sırası ile aşağıda verilmiştir;

1. Model aptamer sisteminin belirlenmesi ve seçilen model aptamer yapılarının hedef molekül ile gerçekleştirdiği etkileşimlerin incelenmesi.
2. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonu prosesi için, plazma polimerizasyonu yöntemiyle yüzey modifikasyonunun gerçekleştirilmesi.
3. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonu prosesinin gerçekleştirilmesi için immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi ve optimizasyonu.
4. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonu prosesinin gerçekleştirilmesi.
5. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonunun kimyasal ve fiziksel karakterizasyonu.
6. Geleneksel aptamer immobilizasyon yöntemleri ile “etiketsiz” aptamer immobilizasyon yönteminin karşılaştırılması.

Çalışmanın ilk basamağında, “etiketsiz” aptamer immobilizasyon yönteminin geliştirilmesi sürecinde kullanılacak model aptamer sistemi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen literatür çalışması, aptamer moleküllerinin kovalent bağ yardımı ile yüzeye immobilizasyonu tabanlı analitik uygulamaların birçoğunun, model sistem olarak trombin aptamerlerini kullanmakta olduğunu ortaya koymuştur. Literatürde en çok kullanılan trombin aptamerleri; HD-1 (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') olarak adlandırılan ve HD-22 (5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3') olarak adlandırılan DNA fragmanlarıdır. Bu çalışmada model aptamer sistemi olarak 15 bazlık HD-1 fragmanına kıyasla daha yüksek afinite gösterebilen 29 bazlık HD-22 trombin aptameri kullanılmıştır.

Ayrıca gerçekleştirilen deneysel çalışmaların maliyetinin düşürülmesi amacı ile HD-22 trombin aptamerinin yanı sıra, 10 bazlık poliA DNA fragmanları temin edilmiştir. poliA DNA fragmanları, moleküler yapısının HD-22 DNA aptameri ile benzerlik göstermesi ve bu molekülün HD-22 DNA aptamerine kıyasla daha az maliyet ile temin edilebilmesi nedenleriyle, bu çalışmada kullanılmışlardır.

İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC), bağlayıcı bir bileşenin eklenmesiyle başlatılan kimyasal reaksiyonun gözlenmesi için kullanılan termodinamik bir tekniktir. HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler ve reaksiyonlar ITC cihazı kullanılarak incelenmiştir. HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu yine ITC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

“Etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesi için immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi sürecinde kuartz kristal mikrobalsans (QCM) sistemi kullanılmıştır. QCM kristallerinin yüzeyi plazma polimerizasyonu yöntemiyle yüzeyde (-PO<sub>3</sub>) grupları oluşturulacak şekilde modifiye edilmiştir. Plazma polimerizasyon parametreleri, yüzeye bağlanan poliA miktarı ve kaplamaların sulu ortamdaki stabiliteleri cinsinden optimize edilmiştir. Bu immobilizasyon yöntemi ile “etiketli” aptamer immobilizasyonu, yüzeye bağlanan oligonükleotid molekülü sayısı cinsinden, aldehit grubu ile işaretlenmiş oligonükleotid immobilizasyonu gerçekleştirilerek kıyaslanmıştır. Gerçekleştirilen deneysel çalışmaların maliyetinin düşürülmesi amacıyla, immobilizasyon parametrelerin belirlenmesi ve optimizasyonu sürecinde model oligonükleotid olarak poliA DNA fragmanları kullanılmıştır.

PoliA molekülleri kullanılarak plazma polimerizasyon parametreleri belirlenen ve optimize edilen “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesi, bir sonraki aşamada HD-22 trombin aptameri ile tekrar edilmiştir. Bu süreç içerisinde immobilize HD-22 DNA aptamerinin trombin enzimi ile yaptığı etkileşimler ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Çalışmanın son basamağında HD-22 trombin aptamerinin “Etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin sonucunda trombin enzimine karşı gösterdiği etkileşim, öncelik ile serbest HD-22 trombin aptameri ile trombin enzimin ITC cihazı ile elde edilen deneysel karakteristik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Yine bu süreç içerisinde “etiketsiz” aptamer immobilizasyon prosesinin ile geleneksel aptamer immobilizasyon yöntemlerinin verimlilikleri karşılaştırılmıştır.

### **3.1. Materyal**

#### **3.1.1. Kimyasal Malzemeler**

Çalışma sürecinde kullanılan HD-22 aptamer molekülleri ve poliA DNA fragmanları yurtdışından temin edilmiştir (ISOLAB, Almanya). HD-22 ve poliA moleküllerinin primer dizisi Çizelge 3.1.’de, ikincil yapılarının kestirimi ise Çizelge 3.2.’de verilmiştir. HD-22 aptamerlerinin hedef molekülü olarak insan trombin enzimi (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Aptamer ve trombin çözeltisi hazırlamak için PBS (0.154 M NaCl, 10 x PBS, Sigma, Almanya) tampon çözeltisi ve nükleaz- içermeyen su (Ambion, ABD) kullanılmıştır.

Çalışmanın immobilizasyon yönteminin geliştirilmesi aşamasında, immobilizasyon yönteminin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kuartz kristal mikrobals (QCM) sistemi kullanılmıştır. QCM sisteminde kristal olarak 5 MHz temel rezonans frekansına sahip, AT kesim, elektrot materyali titanyum, dış kaplaması altın olan yüzeyi parlatılmış kristaller kullanılmıştır (Maxtek, ABD). Kristallerin temizliği için etil alkol ve hegzan (HPLC Grade, Merk, Almanya) kullanılmıştır. Kristallerin yüzey modifikasyonu için plazma polimerizasyonu sisteminde monomer olarak dietil fosfit (DP), yüzeyde(-PO<sub>3</sub>) gruplarının oluşturulması, 1,2- Diaminosikloheksan (DASH) ise yüzeyde amin gruplarının oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. DP (%98, Aldrich, Almanya) ve DASH (Acros Organics, ABD) kimyasallarının moleküler yapıları va bağ enerjileri (Sanderson, 1976; Sanderson, 1983) Çizelge 3.3.’de verilmiştir. QCM kristalleri üzerine oligonükleotid immobilizasyonu, 0.01 M PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4, 10 x PBS, Sigma, Almanya) tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan aptamer moleküllerinin primer dizileri.

Aptamer	Primer Dizi
HD-22	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'
poliA	5'-AAAAAAAAA-3'

Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan aptamer molekülleri ve kestirilmiş ikincil yapıları (Tasset et al., 1997).

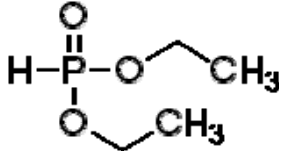
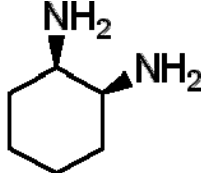
Aptamer	Kestirilmiş İkincil Yapı
HD-22	
poliA	

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Model Aptamer Sisteminin Belirlenmesi

Aptamer moleküllerinin kovalent bağ yardımı ile yüzeye immobilizasyonu tabanlı analitik uygulamaların birçoğunda model sistem olarak trombin aptamerleri kullanılmaktadır (Brock et al., 1992; Pavlov et al., 2004; Potyrailo et al., 1998; Lee and Walt, 2000; Hansen et al., 2006; Tasset et al., 1997). Literatürde gerçekleştirilmiş çalışmalarda sıklıkla; HD-1 (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') ve HD-22 (5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA-3') trombin aptamerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan monomerler ve bağ enerjileri (Sanderson, 1976; Sanderson, 1983).

Monomer	Kapalı Formül	Açık Formül
Dietil Fosfit (DP)	$(C_2H_5O)_2P(O)H$	
1,2- Diaminosikloheksan (DASH)	$C_6H_{14}N_2$	
Bağ Yapısı	$\Delta H^\circ (+)$ kcal/mol	
C-N	73.0	
H-P	77.0	
C-C	83.0	
C-O	85.5	
P-O	90.0	
H-N	93.0	
H-C	99.0	
P=O	110.0	

Trombin aptamerlerinin model aptamer sistemi olarak kullanılmasının en önemli nedenleri; (1) trombin aptamerlerinin kısa DNA fragmanlarından oluşmalarından dolayı kolay sentezlenebilmesi, (2) trombin aptamerlerinin DNA aptameri olmasından dolayı üç boyutlu moleküler yapısının göreceli olarak daha kararlı olması ve (3) trombin aptamerlerinin G-quarlet yapısının alternatiflerine göre çok daha detaylı bir şekilde karakterize edilmiş olmasıdır. Bu çalışmada model aptamer sistemi olarak 15 bazlık HD-1 (Brock et al., 1992) fragmanına kıyasla daha yüksek afinite gösterebilen 29 bazlık HD-22 (Tasset et al., 1997) trombin aptameri kullanılmıştır.

Ayrıca gerçekleştirilen deneysel çalışmaların maliyetinin düşürülmesi amacı HD-22 trombin aptamerinin yanı sıra 10 bazlık poliA (5'-AAAAAAAAA-3') DNA fragmanları kullanılmıştır. PoliA DNA fragmanlarının immobilizasyon parametreleri belirlenirken kullanılmasının temel nedenleri; (1) moleküler yapısının HD-22 DNA aptameri ile benzerlik göstermesi ve (2) bu moleküllerin HD-22 DNA aptamerine kıyasla daha az maliyet ile temin edilebilmeleridir.

### **3.2.2. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC)**

İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC), bağlayıcı bir bileşenin eklenmesiyle başlatılan bir kimyasal reaksiyonun gözlenmesi için kullanılan termodinamik bir tekniktir. ITC genellikle biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonu için tercih edilen bir deneysel çalışma metodudur.

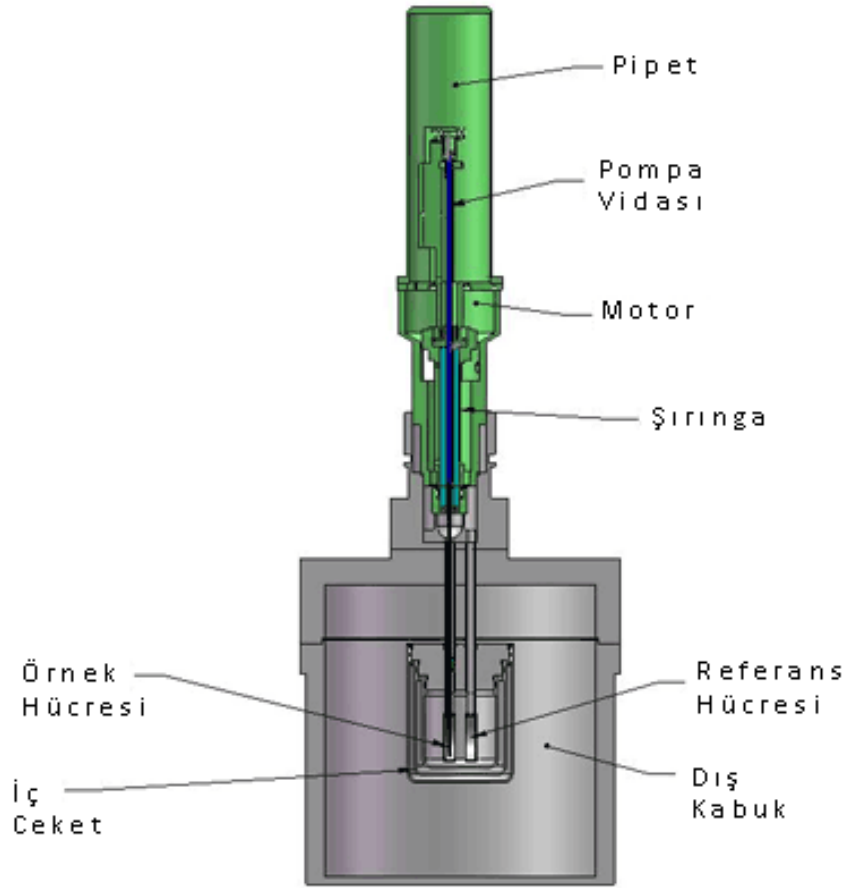
Maddeler bağlandığında ısı açığa çıkar veya absorbe edilir. Bu ısının ölçülmesi; bağlanma katsayısı ( $K_b$ ), reaksiyon sitokimetrisi ( $n$ ), entalpi ( $\Delta H$ ) ve entropi ( $\Delta S$ ) değerlerinin doğru bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. ITC cihazında ligand çözeltisi içeren bir şırınga makromolekül çözeltisi içeren bir hücre içine sabit sıcaklıkta titre edilmektedir. Ligand, hücre içine enjekte edildiğinde iki madde birbirini etkiler ve ısı bağlanmayla doğru orantılı olarak serbest kalır veya absorbe olur. Hücre içindeki makromolekül, liganda doymuş hale geldiğinde, sadece gerideki seyrelme ısı gözlenene dek ısı sinyali azalmaktadır (Salim and Feig, 2009, Feig, 2007). ITC cihazının resmi Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) cihazı.

VP-ITC (MicroCal, ABD) sistemi, temel olarak örnek ve referans hücre arasında üretilen ve absorbe edilen ısının farkına dayalı ölçümü için hücre geribildirim ağı kullanan, son derece hassas bir izotermal titrasyon kalorimetredir. Termoelektrik cihaz iki hücre arasındaki sıcaklık farkını ölçmekte ve ikinci bir cihaz da hücreler ve kapak arasındaki sıcaklık farkını ölçmektedir. Örnek hücresi içinde, kimyasal reaksiyonlar meydana geldiğinde, ısı oluşturulur veya absorbe edilir. Örnek ve referans hücreler arasındaki sıcaklık farkı ( $\Delta T_1$ ) örnek veya referans hücreye uygun şekilde ısı eklenmesiyle geribildirim sistemi kullanılarak sıfırlanır. Belirli sürede  $\Delta T_1 = 0$  eşitliğini sağlamak için gereken gücün integrali, çalışılan prosesten çıkan toplam ısının ölçüsünü verir (Salim and Feig, 2009). Şekil 3.2.'de ITC hücreleri ve şırıngası, Şekil 3.3.'de ise ITC cihazının şırınga sistemi gösterilmiştir.

HD-22 trombin aptameri ile trombin enzimi arasında gerçekleşen etkileşimler ve reaksiyonlar MicroCal (ABD) firması tarafından üretilen VP-ITC cihazı kullanılarak incelenmiştir (VP-ITC, Merkezi Laboratuvar, Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji AR-GE Merkezi, ODTÜ, Ankara). Bu çalışma sürecinde ITC cihazı; (1) 25°C sıcaklık, (2) 10  $\mu\text{Cal}/\text{sec}$  referans güç, (3) 3  $\mu\text{l}$  enjeksiyon hacmi, (4) 6 saniye enjeksiyon süresi, (5) 240 saniye iki enjeksiyon arası zamanı ve (6) 300 rpm karıştırma hızı parametreleri ile kullanılmıştır. ITC cihazı kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde uygulanan metod ve yöntem aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 3.2. ITC cihazının hücreleri ve şıringası.



Şekil 3.3. ITC cihazının şırınga sistemi. Şırınga ITC deneyi boyunca yerinde döner. Şırınganın ucu ITC hücresi içinde sürekli karıştırmayı sağlamak için adapte edilmiştir. Pompa bilgisayar kontrollüdür ve ligand hacimlerini doğru şekilde enjekte eder.

### **3.2.2.1. Örnek Hücresi ve Otomatik Pipet Şiringasının Temizlenmesi**

Olası deney kalıntılarını temizlemek amacı ile ITC cihazının örnek hücresi ve otomatik pipet ünitesi her bir deney öncesi aşağıdaki prosedür izlenerek temizlenmiştir:

1. Örnek hücresi oda sıcaklığında iken %10'luk deterjan çözeltisi (Contrad-70) ile doldurulmuştur.
2. Termostat ayarlanarak örnek hücresi 65°C'ye getirilmiştir.
3. 1 saat beklenmiştir.
4. Termostat ayarlanarak örnek hücresinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.
5. Şiringa yardımı ile deterjan örnek hücrelerinden uzaklaştırılmıştır.
6. Ultra saf su ile örnek hücresi 6 kere yıkanmıştır.
7. Deneyde kullanılacak PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tampon çözeltisi ile 1 kere yıkanmıştır ve hücrenin kuru kalmaması için tampon çözelti doldurulmuştur.
8. Otomatik pipete 3 kere deterjan çekilip bırakılarak temizlenmiştir.
9. Otomatik pipete 5 kere ultra saf su çekilip bırakılarak yıkanmıştır.
10. Otomatik pipet 1 kere deneyde kullanılacak PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

### **3.2.2.2. Örneklerin Hazırlanması**

ITC deneylerinde kullanılan trombin çözeltisi 0.5 µM konsantrasyonunda ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde nükleaz-içermeyen su kullanılarak son hacim 2 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

HD-22 aptamer çözeltisi ise 30 µM konsantrasyonunda ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde nükleaz-içermeyen su kullanılarak son hacim 400 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Aptamer çözeltisi daha sonra 95°C'de 5 dakika bekletilmiş ve daha sonra 25°C'ye sabitlenmiş oda sıcaklığına soğutulmuştur.

### **3.2.2.3. Örneklerin ITC Hücrelerine Yüklenmesi**

Referans hücresinin içerisine şırınga yardımıyla 1.4 ml, trombin ve HD-22 aptamer çözeltilerinin hazırlandığı, PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu yüklenmiştir. Örnek hücresinin içerisine ise şırınga yardımı ile 1.4 ml trombin çözeltisi eklenmiştir. HD-22 aptamer çözeltisi ITC cihazının otomatik pipet sisteminin içerisine 295 µl miktarında yüklenmiş ve otomatik pipet sisteminin ucundaki şırınga örnek hücresinin içerisine yerleştirilmiştir.

### **3.2.3. Kristal Temizliği**

QCM kristallerinin yüzeyleri, yüzeyde var olabilecek organik kalıntıların uzaklaştırılması amacı ile hegzan ve etanol kullanılarak temizlenmiştir. Yüzeydeki hidrofilik kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla kristal yüzeyleri etanol ile yıkanmış, hemen ardından yüzeydeki hidrofobik kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla hegzan ile yıkanmıştır. Kristaller yüzeylerinin kuruma esnasında kirlenmesini engellemek amacıyla, 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur.

### **3.2.4. QCM Sistemiyle Frekans Ölçümü**

Piezoelektrik kristallerin rezonans frekanslarının ölçülmesi amacıyla salınım ölçer olarak Maxtek Ltd. (ABD) firmasından temin edilen RQCM sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.4). Ölçüm sistemi, bir bilgisayar (Pentium 4, 32 MB RAM), bir frekans ölçer (Maxtek RQCM) ve kristalin yerleştirildiği prob sisteminden oluşmaktadır. Kristalin rezonans frekansındaki değişim, cihaz ile birlikte verilen RQCM Data Log programı kullanılarak kaydedilmiştir.

RQCM sistemi; plazma polimerizasyonu ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarının etkinliğinin yüzeyde biriken kütle cinsinden belirlenmesi, bu yüzeylere oligonükleotid immobilizasyonu ve immobilize edilen oligonükleotid miktarının belirlenmesi amaçlarıyla kullanılmıştır. Frekans ölçümleri, yüzeye immobilize edilen oligonükleotidlerin kantitatif olarak Sauerbrey eşitliği ile belirlenebilmesi için havada gerçekleştirilmiştir (Ha et al., 2004).



Şekil 3.4. Maxtek RQCM ölçüm sistemi.

### 3.2.5. Plazma Polimerizasyonu Sistemiyle Yüzey Modifikasyonu

Yüzey modifikasyonları, Diener Electronics PICO plazma polimerizasyonu sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sisteme ait teknik veriler Çizelge 3.4'de verilmiştir. Yüzey modifikasyonundan önce, plazma polimerizasyonu sistemi 0.1 mbar basınca kadar vakumlanmış ve 100 W boşalım gücünde 30 dakika süreyle oksijen plazması ile reaktörün içi temizlenmiştir. Kristal örnekler reaktöre yerleştirildikten sonra sistem 0.10 mbar basınca kadar vakumlanmıştır. Kullanılacak monomer; monomer girişine takılmış ve sisteme, reaktör içi basıncı 0.14 mbar olacak şekilde beslenmiştir. Plazma oluşturulmadan önce reaktör içinin monomer buharı ile dolması için 5 dakika süreyle monomer akışı sağlanmıştır. Farklı boşalım gücü ve sürelerinde plazma polimerizasyonu ile kristal yüzeyleri modifiye edilmiştir.

Çizelge 3.4. Diener Electronics PICO plazma polimerizasyon sisteminin teknik verileri.

Özellik	Parametre
Kumanda Dolabı	G 550 mm, Y 330 mm, D 500 mm
Hücre	Ø 150 mm, L 320 mm
Hücre Hacmi	~ 5 Litre
Gaz Girişi	2 Gaz Kanalı
Alternatör	13,56 MHz
Vakum Pompası	Leybold, Trivac D25B (2,5 m <sup>3</sup> /h)
Kumanda	Yarı otomatik

Çizelge 3.5. Çalışma sürecinde uygulanan plazma polimerizasyon parametreleri.

Monomer	Boşalım Gücü (Watt)	Süre (Dakika)
Dietil Fosfit (DP)	25	5
Dietil Fosfit (DP)	50	5
Dietil Fosfit (DP)	50	15
Dietil Fosfit (DP)	50	25
Dietil Fosfit (DP)	75	5
1,2- Diaminosikloheksan (DASH)	45	5

### 3.2.6. Yüzey Modifikasyonunun Sulu Ortamdaki Stabilitesinin Belirlenmesi

Plazma polimerizasyonu yöntemiyle yüzeyde oluşturulan kaplama tabakasının, özellikle metal yüzeylerde, sıvı ortamla etkileşim halinde yüzeyden ayrılabilirdiği bilinmektedir. DP monomeri kullanılarak gerçekleştirilen kaplamanın sıvı ortamdaki stabilitesi, farklı plazma polimerizasyonu parametrelerinde kaplanan kristallerin osilasyon frekanslarının kaplama işleminin hemen ardından ölçülmesi, daha sonra bu yüzeylerin deiyonize su içerisinde 200 rpm karıştırma hızında 2 saat süreyle bekletildikten sonra tekrar ölçülmesi ile belirlenmiştir.

### 3.2.7. Aptamer Moleküllerinin Yapısında Aldehit Grubu Oluşturması

Literatürde biyolojik makromoleküllerin yapısına aldehit grubu kalıntıları eklemenin temel iki yolu bulunmaktadır: (1) diyol içeren karbonhidrat veya moleküllerin oksidasyonu (DNA molekülünde 3' (-OH) grubu, RNA molekülünde 2' ve 3' (-OH) grupları) ve (2) amino gruplarının aldehitlerle modifikasyonu. Her iki durumda da aldehitler, çok iyi bilinen Schiff baz oluşumu ile yüzey aminleri ile kovalent bağlanabilmektedir. Periyodat aktivasyonu, şeker kalıntılarındaki bitişik (-OH) gruplarının aldehite dönüştürülmesinde kullanılan en temel yöntemdir. Periyodat, bitişik (-OH) gruplarını taşıyan C-C bağını kırmakta ve (-OH) gruplarını aldehite dönüştürmektedir. Terminal cis-glikoller, formaldehit formunda bir karbon kaybederek 2' C atomunda bir aldehit grubu meydana gelmektedir (Hermanson, 1996).

Plazma polimerizasyonu-DP yöntemi ile "etiketsiz" aptamer immobilizasyon yönteminin etkinliğini kıyaslamak amacıyla, aldehit ile etiketlenmiş poliA DNA fragmanlarının amin grubu içeren yüzeye (plazma polimerizasyonu-DASH) immobilizasyonu incelenmiştir. PoliA moleküllerinin aldehit grubu ile etiketlenme prosesi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

PoliA çözeltisi PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponunda 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış ve 0°C'de tutulmuştur. Bu çözelti içerisine son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde sodyum periyodat eklenmiştir. Karışım ışıktan korunarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Çözeltinin hacmi başına 0.1 mL gliserol eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Bu çözelti immobilizasyon için doğrudan kullanılmıştır (Hermanson, 1996).

### **3.2.8. Oligonükleotid İmmobilizasyonu**

#### **3.2.8.1. Plazma Polimerizasyonu-DP Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzelere Model Oligonükleotid İmmobilizasyonu**

Etiketsiz aptamer immobilizasyonu için model oligonükleotid olarak poliA DNA fragmanları kullanılmıştır. Model oligonükleotid immobilizasyonu; oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla poliA molekülleri, 1 µM konsantrasyonunda PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde hazırlanmış ve yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen kristal yüzeyleri üzerine, yüzeyi kaplayacak şekilde yaklaşık 0.5 mL hacminde damlatılarak 12 saat süreyle immobilizasyona bırakılmıştır. Kristal yüzeyleri, immobilizasyon işleminden sonra, yüzeyde kalmış olabilecek bağlanmamış oligonükleotidlerin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla deiyonize su, PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu, 1 M NaCl çözeltisi ve tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır.

#### **3.2.8.2. Plazma Polimerizasyonu-DASH Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzelere Model Oligonükleotid İmmobilizasyonu**

Model oligonükleotid immobilizasyonu; oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önceden yapılarında aldehit grupları oluşturulmuş olan poliA DNA fragmanları, 1 µM konsantrasyonunda pH 7.4 olacak şekilde PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde hazırlanmış ve yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen kristal yüzeyleri üzerine, yüzeyi kaplayacak şekilde yaklaşık 0.5 mL hacminde damlatılarak 12 saat süreyle immobilizasyon sürecine bırakılmıştır. Kristal

yüzeyle, immobilizasyon işleminden sonra, yüzeyde kalmış olabilecek bağlanmamış oligonükleotidlerin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla deiyonize su, PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu, 1 M NaCl çözeltisi ve tekrar deionize su ile yıkanmıştır.

### **3.2.9. Yüzey Karakterizasyonu**

#### **3.2.9.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)**

Plazma polimerizasyonu yöntemiyle gerçekleştirilen kaplama prosesi ve yüzeye oligonükleotid immobilizasyonu sonrası yüzeylerin fiziksel karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskobu (AKM) kullanılarak elde edilmiştir (*PSIA, XE-100E, UNAM-Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü, Ankara*). Kullanılan AKM tekniği “Taramalı Prob Mikroskopisi” başlığı altında bir alt teknik olup analiz derinliği 10 Å’ dur. Yüzey çok ince bir uç ile taranarak yüzey topografyası hakkında bilgi edinilmektedir. Bu yöntem ile yüzeyde oligonükleotid varlığının doğrulanması amaçlanmıştır.

#### **3.2.9.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)**

Yüzeylerin kimyasal karakterizasyonu her basamakta, aynı parametrelerde kuartz kristallerle birlikte işlem görmüş altın kaplı cam referanslar (1x1 cm) üzerinden yapılmıştır. Yüzeylerin kimyasal karakterizasyonu, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (ESCA veya XPS) yöntemi ile yapılmıştır. Bu teknikle, yüzeyin 15-100 Å derinliği hakkında bilgi edinilmektedir. Altın kaplı cam örneklerin, plazma polimerizasyonu öncesi, plazma polimerizasyonu sonrası ve poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu sonrası ayrı ayrı XPS spektrumları elde edilmiştir. Analiz boyunca, Mg K $\alpha$  ışın kaynağı kullanılmıştır (*SPECS IE200, Merkezi Laboratuvar, AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi, ODTÜ, Ankara*).

### **3.2.10. “Etiketsiz” Aptamer İmmobilizasyonu**

#### **3.2.10.1. HD-22 DNA Aptameri İmmobilizasyonu**

Etiketsiz aptamer immobilizasyonu için model aptamer sistemi olarak HD-22 DNA aptamerleri kullanılmıştır. HD-22 DNA aptamerleri immobilizasyonu; oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. HD-22 aptamer çözeltisi ise 10  $\mu$ M konsantrasyonunda ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde nükleaz- içermeyen su kullanılarak hazırlanmıştır. Aptamer çözeltisi daha sonra 95°C’de 5

dakika bekletilmiş ve daha sonra 25°C'ye sabitlenmiş oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Hazırlanan HD-22 aptamer çözeltisi yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen kristal yüzeyleri üzerine, yüzeyi kaplayacak şekilde yaklaşık 0.5 mL hacminde damlatılarak 12 saat süreyle immobilizasyona bırakılmıştır. Kristal yüzeyleri, immobilizasyon işleminden sonra, yüzeyde kalmış olabilecek, bağlanmamış HD-22 aptamer moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla deiyonize su, PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu, 1 M NaCl çözeltisi ve tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır.

### **3.2.10.2. İmmobilize HD-22 DNA Aptamerleri Trombin Enzimi Etkileşimi**

İmmobilize HD-22 DNA aptamerleri, trombin enzimi etkileşiminin incelenmesi amacıyla, trombin çözeltisi 5.5 µM ve 11 µM konsantrasyonlarında ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde nükleaz-içermeyen su kullanılarak hazırlanmıştır.

0.5 mL hacminde hazırlanan trombin çözeltileri, HD-22 aptamer immobilize edilmiş kristal yüzeylerine damlatarak 15 dakika süreyle orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Bu işlemi takiben kristal yüzeyi PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu ile yıkanmış ve 1.5 bar basıncındaki Argon gazı akımında kurutulmuştur. Bu işlem frekans sapması sabit bir değere gelene kadar tekrarlanmıştır.

#### 4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Aptamer moleküllerinin, yapılarında herhangi bir kimyasal modifikasyon gerçekleştirilmeden, tutuklanmasını sağlamak için “etiketsiz” bir aptamer immobilizasyon yönteminin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu araştırmanın, deneysel çalışmaları aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

##### 4.1. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC)

İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) cihazı 25°C’de HD-22 trombin aptamerinin trombin enzimi ile yaptığı etkileşimin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Olası deney kalıntılarını temizlemek için ITC cihazının örnek hücresi ve otomatik pipet ünitesi her bir deney öncesi yukarıda ayrıntılı bir şekilde açıklanan prosedür izlenerek temizlenmiştir. Çalışma sürecinde kullanılan trombin çözeltisi 0.5 µM konsantrasyonunda ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde, nükleaz-ıçermeyen su kullanılarak son hacim 2 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. HD-22 aptamer çözeltisi ise 30 µM konsantrasyonunda ve PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu içerisinde nükleaz-ıçermeyen su kullanılarak, son hacim 400 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. ITC cihazına örnek yükleme sürecinde PBS, trombin ve HD-22 aptamer çözeltileri kaynaklı şırınga içi baloncuk oluşumunu engellemek amacıyla, her üç çözelti 25°C’de vakumlu ThermoVac (ABD) degaz ünitesinden geçirilerek içerdikleri olası çözünmüş gazlardan arındırılmışlardır.

ITC cihazı; (1) 25°C sıcaklık, (2) 10 µCal/sec referans güç, (3) 3 µl enjeksiyon hacmi, (4) 6 saniye enjeksiyon süresi, (5) 240 saniye iki enjeksiyon arası zamanı ve (6) 300 rpm karıştırma hızı parametreleri ile kullanılmıştır (*VP-ITC, Merkezi Laboratuar, Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji AR-GE Merkezi, ODTÜ, Ankara*).

ITC cihazının referans hücresinin içerisine PBS (0.154 M NaCl, pH 7.4) tamponu konulmuştur. Örnek hücresine yüklenmiş 1.4 ml trombin çözeltisi, otomatik pipet sistemi içerisindeki 295 µl HD-22 aptamer çözeltisi (Th-HD22) ile titre edilmiştir. Çalışma sürecinde dilüsyondan kaynaklanan termal değişimleri ortadan kaldırmak amacıyla, kontrol deneyi olarak 1.4 ml trombin çözeltisi içerisinde HD-22 aptamer bulundurmeyen 295 µl PBS tampon çözeltisine (Th-PBS) titre edilmiştir.

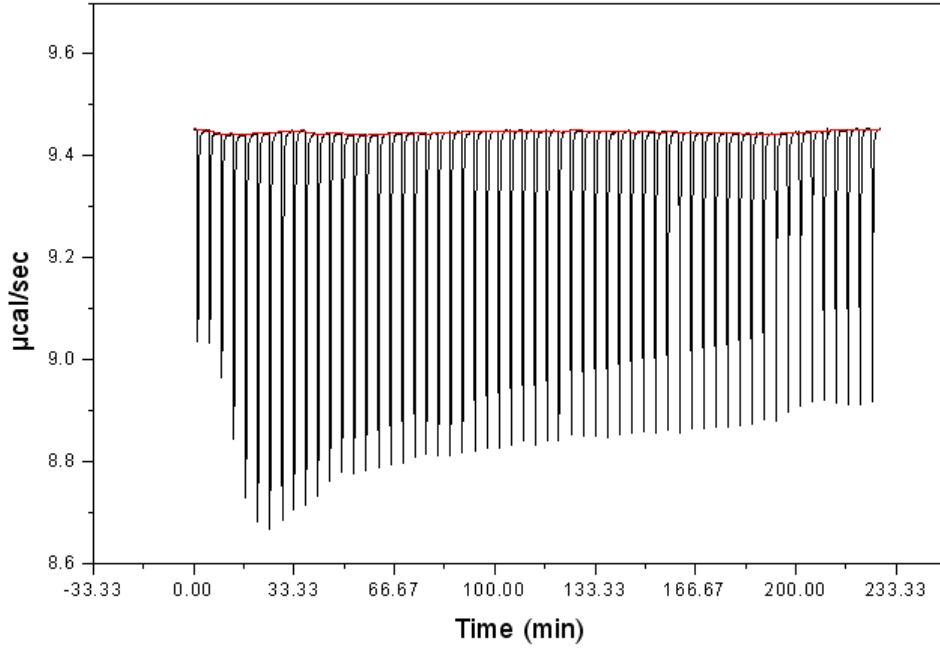
Bu çalışmada kalorimetrik entalpi her bir enjeksiyon için Th-PBS titrasyonu sonucu elde edilen dilüsyon ısısının, Th-HD22 entalpi değerlerinden çıkarılması ile düzeltilmiştir (Pagano et al., 2008). ITC cihazı kullanılarak elde edilen kalorimetrik veriler, cihaz ile birlikte verilen MicroCal ORIGIN paket programının yardımı ile analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen doğrusal olmayan regresyon analizleri literatürde ITC cihazı kullanılarak trombin aptameri ve trombin enzimi arasındaki etkileşimlerin incelediği çalışmalara paralel olarak MicroCal ORIGIN programının bağlanma modelleri modülü (Pagano et al., 2008; Nallagatla et al., 2009) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

25°C'de trombin enziminin HD-22 aptamer çözeltisi içerisine kalorimetrik titrasyonunun sonuçları (Th-HD22) Şekil 4.1a.'da verilmiştir. Şekil 4.1b.'de ise Th-HD22 kalorimetrik titrasyon verilerinden Th-PBS kontrol deneyinin çıkarılması sonucu, dilüsyondan kaynaklanan termal değişimler elimine edilmiş deney sonuçları (Th-HD22/PBS) sunulmuştur.

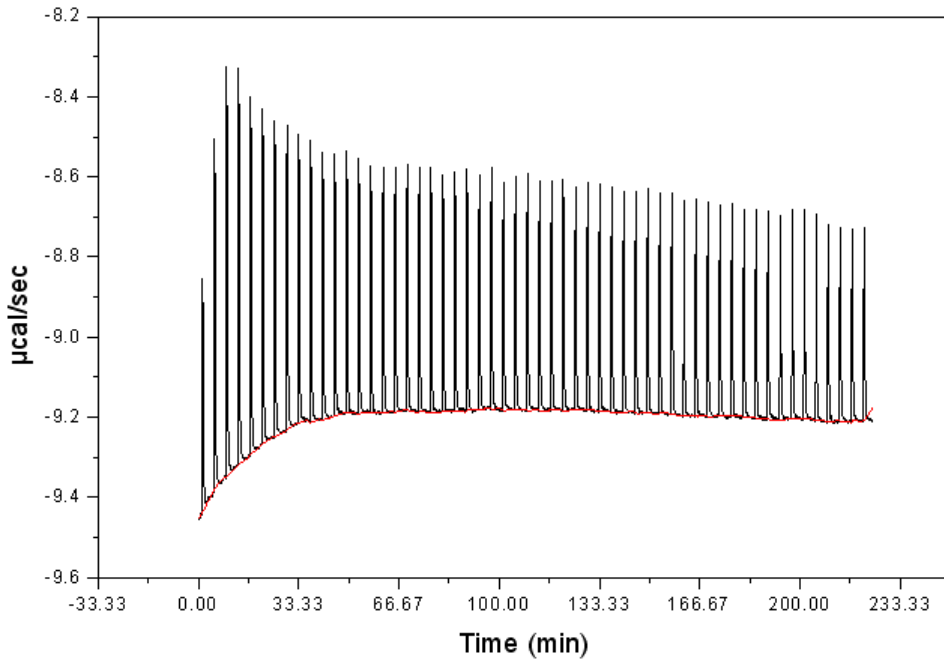
Şekil 4.1b.'de gözlenen Th-HD22/PBS ısı piklerinin alanları MicroCal ORIGIN programının yardımı ile entegre edilmiştir. Elde edilen ısı değişimleri, enjekte edilen trombin çözeltisinin molar değerine bölünerek Şekil 4.2.'de sunulmuş termogram verileri hesaplanmıştır.

Literatürde HD-1 aptameri (ve türevleri) ile trombin enziminin etkileşimlerinin termodinamik karakterizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalarda, genellikle MicroCal ORIGIN programının bağımsız tek bağlanma bölgesi modeli kullanılmıştır (Pagano et al., 2008; Nallagatla et al., 2009). 1992 yılında Bock ve arkadaşları tarafından bulunan HD-1 aptamerinin, trombin molekülü ile gerçekleştirdiği etkileşim ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiş ve HD-1 aptamerinin trombin molekülünün exosite I bölgesine bağlandığı tespit edilmiştir (Bock et al., 1992; Wu et al., 1992; Paborsky et al., 1993; Tsiang et al., 1995). Ancak HD-1 aptamer-trombin kompleksi ile gerçekleştirilen kristalografi çalışmaları, HD-1 aptamerinin trombin enziminin hem exosite I bölgesine hem de exosite II bölgesine bağlanabildiğini ortaya koymuştur (Padmanabhan et al., 1993; Padmanabhan and Tulinsky 1996).

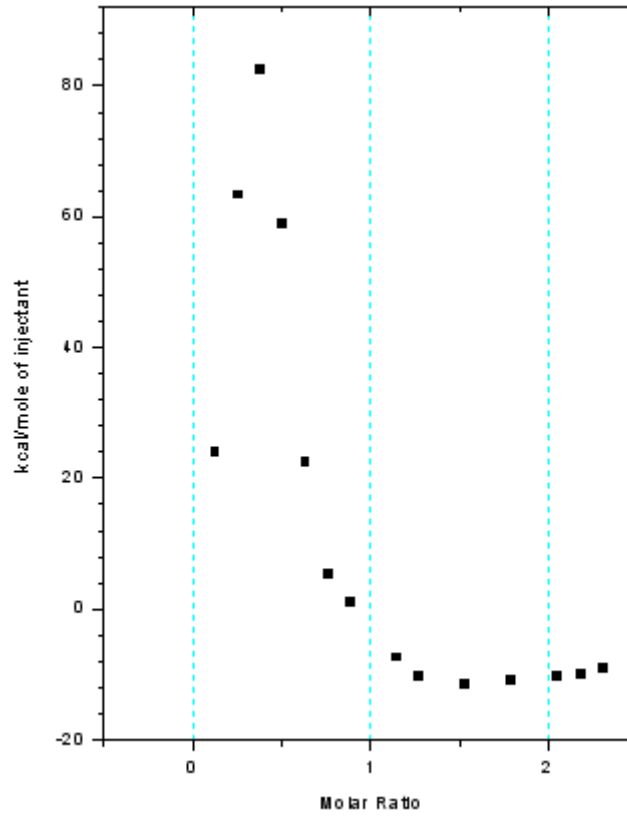
a) Th-HD22 Kalorimetrik Titrasyon Sonuçları



b) Th-HD22/PBS Kalorimetrik Titrasyon Sonuçları



Şekil 4.1. ITC cihazında gerçekleştirilmiş Th-HD22 ve Th-HD22/PBS deneylerinin kalorimetrik titrasyon sonuçları.



Şekil 4.2. Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verilerinin MicroCal ORIGIN programı ile oluşturulmuş termogramı.

Literatürdeki genel olarak kabul gören exosite I bölgesine spesifik HD-1 aptameri yaklaşımı, ITC cihazı ile gerçekleştirilen termodinamik karakterizasyon çalışmalarında bağımsız tek bağlanma bölgesi modeli kullanılmasına sebep olmuştur (Nallagatla et al., 2009). Ancak Şekil 4.1b.'de verilen dilüsyon kaynaklı termal değişimler elimine edilmiş kalorimetrik titrasyon verilerinin (Th-HD22/PBS) taban çizgisinde gözlenen kayma, Th-HD22/PBS verilerinin analizinde bağımsız tek bağlanma bölgesi modelinin geçerliliğini ortadan kaldırmıştır (MicroCal., 2004). Şekil 4.2.'de verilen MicroCal ORIGIN programı ile oluşturulmuş Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verilerinde gözlemlenen pik, HD-22 aptamerinin trombin enzimi arasındaki etkileşimlerin iki ayrı bölgede gerçekleştiğini göstermektedir. Bu çalışma sürecinde Şekil 4.2.'de verilen Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verileri ile uyumlu olarak, Padmanabhan tarafından 1993 ve 1996 yıllarında önerilen exosite spesifik olmayan bağlanma modelinin kullanılmıştır.

Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verilerinin entegre edilmiş moleküler bağlanma grafiği, sıralı bağlanma ve iki bağlanma bölgesi modelleri ile test edilmiştir. MicroCal ORIGIN programıyla gerçekleştirilen Th-HD22/PBS bağlanma analizlerinde sıralı bağlanma modeli kullanılarak elde edilen veriler, alternatifine (iki bağlanma bölgesi modeli) kıyasla yüksek güven aralığında (minumum hata oranı ve en iyi uyum) sonuç üretmiştir. Çizelge 4.1.'de Th-HD22/PBS termogram verilerine sıralı bağlanma modeli uygulanarak elde edilmiş  $K_{b1}$ ,  $\Delta H_1$ ,  $\Delta S_1$  ve  $K_{b2}$ ,  $\Delta H_2$ ,  $\Delta S_2$  değerleri sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Th-HD22/PBS termogram verilerine sıralı bağlanma modeli uygulanarak elde edilmiş  $K_{b1}$ ,  $\Delta H_1$ ,  $\Delta S_1$  ve  $K_{b2}$ ,  $\Delta H_2$ ,  $\Delta S_2$  değerleri.

<b>Aptamer*</b>	<b><math>K_{b1}</math> (<math>M^{-1}</math>)</b>	<b><math>\Delta H_1</math> (cal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta S_1</math> (cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)</b>
Th-HD22/PBS (25°C)	$4.07 \times 10^7$ ( $\pm 1.6 \times 10^8$ )	$5.820 \times 10^4$ ( $\pm 2.04 \times 10^4$ )	230
<b>Aptamer*</b>	<b><math>K_{b2}</math> (<math>M^{-1}</math>)</b>	<b><math>\Delta H_2</math> (cal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta S_2</math> (cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)</b>
Th-HD22/PBS (25°C)	$3.43 \times 10^6$ ( $\pm 2.2 \times 10^7$ )	$-7.056 \times 10^4$ ( $\pm 1.40 \times 10^4$ )	-207

\* Standart sapmalar MicroCal Origin 7.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu (Çizelge 4.1) verileri “Eş. 4.1.” olarak aşağıda verilen denklemde uygulanarak Gibbs Serbest Enerji ( $\Delta G$ ) değerleri ve “Eş. 4.2.” olarak aşağıda verilen denklemde uygulanarak ise Ayrılma Sabiti ( $k_d$ ) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.1)$$

“Eş. 4.1.” denkleminde;  $\Delta G$  = Gibbs Serbest Enerji (kcal.mol<sup>-1</sup>),  $\Delta H$  = Entalpy (kcal.mol<sup>-1</sup>),  $\Delta S$  = Entropy (kcal.mol<sup>-1</sup>) ve T = Sıcaklık (Kelvin) parametrelerini ifade etmektedir.

$$k_d = \frac{1}{k_b} \quad (4.2)$$

“Eş. 4.2.” denkleminde;  $k_d$  = Ayrılma Sabiti (nM),  $k_b$  = Bağlanma Sabiti (nM<sup>-1</sup>) parametrelerini ifade etmektedir.

Çizelge 4.2. HD-22 aptameri ile trombin enzimi arasındaki etkileşimlerinin termodinamik karakterizasyonu sonucu hesaplanmış gibbs serbest enerji ( $\Delta G$ ) ve ayrılma sabiti ( $k_d$ ) değerleri.

<b>Aptamer*</b>	<b><math>k_{d1}</math> (nM)</b>	<b><math>\Delta G_1</math> (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>
Th-HD22/PBS (25°C)	24.57 (±6.25)	-10.34
<b>Aptamer*</b>	<b><math>k_{d2}</math> (nM)</b>	<b><math>\Delta G_2</math> (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>
Th-HD22/PBS (25°C)	291.54 (±45.45)	-37.27

\* Standart sapmalar MicroCal Origin 7.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Th-HD22/PBS bağlanma analizlerinin gerçekleştirildiği MicroCal ORIGIN programının sıralı bağlanma modeli, iki bağlanma bölgesi parametresi ile kullanılmıştır. Sıralı bağlanma modeli, birbirinden bağımsız bağlanma bölgelerine sahip olan moleküllerin reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (MicroCal., 2004). Sıralı bağlanma modeli kullanılarak yapılan analizler, HD-22 aptamerinin trombin molekülünde birbirinden bağımsız iki bölgeye bağlandığını göstermektedir. Çizelge 4.1.’de verilen HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu sonucu HD-22 aptamerinin trombin enzimi üzerinde exosite II bölgesine yüksek afinite ile bağlanırken, exosite I bölgesine de düşük bir afinite ile bağlanıyor olabileceğini ortaya koymuştur. Şekil 4.2.’deki bağlanma kinetiği, HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile etkileşiminin kooperatif bağlanma karakteristikleri gösterme olasılığını ortaya koymaktadır.

HD-22 aptamerinin Çizelge 4.1.'de gösterilen ayrılma sabiti değerleri; exosite II bölgesi için  $k_{d1}=24.57 (\pm 6.25)$  nM ve exosite I bölgesi için  $k_{d2}=291.54 (\pm 45.45)$  nM olarak hesaplanmıştır. HD-22 aptamerinin literatürde genel kabul gören ayrılma sabiti  $k_d=0.5$  nM (exosite II bölgesi spesifik) olarak filtre bağlanma deneyleri sonucu ortaya konmuştur (Bock et al., 1992; Cho et al., 2006). Ancak ITC metodolojisinin filtre bağlanma deneylerine kıyasla daha hassas ölçüme olanak tanınmasından dolayı, ITC kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda standart ayrılma sabiti değerlerinden farklılık gösteren  $k_d$  değerleri hesaplanmıştır (Pagano et al., 2008; Nallagatla et al., 2009).

2008 yılında Pagano ve arkadaşları tarafından ITC cihazı kullanılarak gerçekleştirilen HD-1 trombin aptamerinin (exosite I bölgesi spesifik) termodinamik karakterizasyonu sonucu, ayrılma sabiti değeri  $k_d=333.33$  nM olarak bulunmuştur. Bu sonuç filtre bağlanma deneyleri ile hesaplanan ayrılma sabiti değerlerinin yaklaşık 30 kat daha fazladır (Pagano et al., 2008). ITC cihazının hassasiyeti göz önüne alındığında, HD-22 aptamerinin termodinamik karakterizasyonu sonucu elde edilen ayrılma sabiti değerleri ( $k_{d1}$  ve  $k_{d2}$ ) hem exosite I bölgesi hem de exosite II bölgesi için beklenen değerler aralığı içindedir.

#### **4.2. Plazma Polimerizasyonu ile Yüzey Modifikasyonu**

Plazma polimerizasyonu yöntemi ile Dietil Fosfit (DP) monomeri kullanılarak yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzeyde oluşturulan kaplamanın varlığı ilk aşamada, modifiye edilen kristallerin osilasyon frekanslarında gerçekleşen değişim ile belirlenmiştir. QCM ölçüm sisteminde kullanılan kristallerin plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyonu öncesi ve 25 W, 50 W ve 75 W boşalım gücünde beşer dakika süre ile modifiye edildikten sonraki osilasyon frekansları ile frekans düşüşleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek standart sapmaları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. QCM ölçüm sisteminde kullanılan kristallerin plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyonu öncesi ve 25 W, 50 W ve 75 W boşalım gücünde 5 dakika süre ile modifiye edildikten sonraki osilasyon frekansları ile frekans düşüşleri.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) $F_1$	Plazma polimerizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_2$	Frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_2-F_1$ )
PP-DP (25W5dk)	5.003.561 ( $\pm 14$ Hz)	5.003.594 ( $\pm 19$ Hz)	+33
PP-DP (50W5dk)	5.012.225 ( $\pm 1$ Hz)	5.012.214 ( $\pm 1$ Hz)	-11
PP-DP (75W5dk)	5.010.080 ( $\pm 8$ Hz)	5.010.087 ( $\pm 7$ Hz)	+7

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

Yukarıda verilen sonuçlar, plazma polimerizasyonu ile kristal yüzeylerinde DP monomeri kullanılarak, yalnızca 50 W boşalım gücü ve 5 dakika modifikasyon süresi ile kaplama yapılabildiğini göstermiştir. Bu parametre için  $\Delta F$  değeri -11 Hz'dir. 25 W ve 75 W boşalım güçleri için elde edilen pozitif  $\Delta F$  değerleri; yüzeyde kaplama yerine, yüzeyden parçaların ayrılması ile "etching" gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, plazma polimerizasyonu işleminde boşalım gücü olarak 50 W seçilmiştir. 50 W boşalım gücünde 15 ve 25 dakikalık modifikasyon sürelerinin kristal yüzeyindeki kaplama işlemine etkisi belirlenmiş ve sonuçları Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 50 W boşalım gücünde 15 ve 25 dakikalık plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyon sürelerinin kristal yüzeyindeki kaplama işlemine etkisi.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) $F_1$	Plazma polimerizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_2$	Frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_2-F_1$ )
PP-DP (50W5dk)	5.012.225 ( $\pm 1$ Hz)	5.012.214 ( $\pm 1$ Hz)	-11
PP-DP (50W15dk)	5.007.055 ( $\pm 10$ Hz)	5.006.688 ( $\pm 3$ Hz)	-367
PP-DP (50W25dk)	5.010.090 ( $\pm 4$ Hz)	5.009.995 ( $\pm 2$ Hz)	-94

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

Bu sonuçlara göre, plazma polimerizasyonu yöntemi ile 50 W boşalım gücünde, işlem süresi 5 dakikadan 15 dakikaya çıkartıldığında, kristal yüzeyindeki kütle birikimi artmakta ancak işlem süresinin 15'den 25 dakikaya çıkartılmasıyla kristal yüzeyindeki kütle birikimi tekrar azalmaktadır. Bu durum plazma polimerizasyonu yönteminin doğasıyla uyumludur. Buna göre işlem süresi arttıkça başlangıçta birikim miktarı artmakta ve reaktördeki baskın reaksiyon birikim olmaktadır, işlem süresi uzadıkça, yüzeyde etching işlemi baskın hale gelmektedir. Yukarıda elde edilen sonuçlar ışığında oligonükleotid immobilizasyonu amacıyla, çalışmanın ilerleyen basamaklarında 50 W boşalım gücü ve 5, 15 ve 25 dakikalık işlem süresi ile modifiye edilmiş kristallerin kullanımı uygun görülmüştür.

#### 4.3. Yüzey Modifikasyonunun Sulu Ortamdaki Stabilitésinin Belirlenmesi

DP monomeri kullanılarak gerçekleştirilmiş yüzey modifikasyonunun sulu ortamdaki stabilitesi, kristallerin plazma polimerizasyonu işlemi sonrası ve sulu ortamla etkileşimleri sonrası osilasyon frekanslarının ölçülmesi ile belirlenmiş ve Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek standart sapmaları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5. DP monomeri kullanılarak gerçekleştirilmiş yüzey modifikasyonunun sulu ortamdaki stabilitesi, kristallerin plazma polimerizasyonu işlemi sonrası ve sulu ortamla etkileşimleri sonrası osilasyon frekansları.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) $F_1$	Sulu ortam ile etkileşim sonrası osilasyon frekansı	Frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_2-F_1$ )
PP-DP (50W5dk)	5.012.214 ( $\pm 1$ Hz)	5.012.212 ( $\pm 4$ Hz)	0
PP-DP (50W15dk)	5.006.688 ( $\pm 3$ Hz)	5.006.890 ( $\pm 5$ Hz)	+202
PP-DP (50W25dk)	5.009.995 ( $\pm 2$ Hz)	5.009.995 ( $\pm 2$ Hz)	0

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

Yukarıda verilen sonuçlar; 50 W boşalım gücünde 5 ve 25 dakika süreyle işlem görmüş kristal yüzeylerdeki kaplamanın sulu ortamdan da etkilenmediğini ve yüzeyden herhangi bir ayrılma olmadığını göstermektedir. 50 W boşalım gücünde 15 dakika süreyle işlem görmüş kristal yüzeyinden ise, sulu ortamda sıyrılma olduğu görülmektedir.

Bu sonucun muhtemel sebebi; 50 W 15 dakika işlem parametresinde yüzeyde oluşan kaplama tabakasının diğerlerine oranla daha kalın olması, kaplamanın dış tabakaları plazma polimerizasyon sisteminde oluşurken yüzeydeki tabaka ile bağlanma oranının, kendi arasındaki bağlanma oranına kıyasla daha az olmasıdır. Bu durum, dış tabakaların sulu ortamda ve karıştırmanın etkisiyle yüzeyden ayrılmasına, ancak yüzeyde halen, yaklaşık +165 Hz'lik bir değişime neden olan bir kaplamanın kalmasına neden olmuş olabilir.

Bu sonuçlara göre plazma polimerizasyonu ile DP kullanılarak modifiye edilmiş yüzeylerin sulu ortamdaki stabilitelerinin, kabaca +100 Hz' lik bir frekans sapmasının altındaki değerlerde sapma sağlandığı durumlarda stabil olduğunu, bu değer üstünde yüzeyden sıyrılmaların meydana geldiği söylenebilir. Bu durum, yüzeyden sıyrılmaların meydana geldiği kristalde, yüzeyde ancak 165 Hz değişim yaratan bir tabakanın kalması ile de örtüşmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, oligonükleotid immobilizasyonunun incelenmesi için PP-DP (50W5dk) ve PP-DP (50W25dk) modifiye edilen kristaller seçilmiştir.

#### **4.4. Oligonükleotid Immobilizasyonu**

##### **4.4.1. Plazma Polimerizasyonu-DP Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzeyle Oligonükleotid Immobilizasyonu**

Etiketsiz aptamer immobilizasyonu için plazma polimerizasyonu yöntemiyle yeni bir yöntem geliştirilmesi amacıyla, model oligonükleotid olarak poliA DNA fragmanlarının seçilmiştir. Plazma polimerizasyonu yöntemi ile DP monomeri kullanılarak yapılan yüzey modifikasyonu çalışmaları sonucunda, PP-DP (50W5dk) ve PP-DP (50W25dk) modifiye edilen kristaller kullanılarak poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu incelenmiştir.

Yüzele poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma ile belirlenmiştir. Bahsi geçen bu sonuçlar Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Kontrol deneyi olarak yüzeyi modifiye edilmemiş kristal, poliA DNA fragmanları ile inkübe edilmiştir. Bu kontrol deneyinin amacı; altın yüzeyi ile oligonükleotid arasında elektrostatik bir etkileşimin gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesidir. İkinci kontrol deneyi olarak, PP-DP (50W5dk) kaplanmış ancak poliA DNA fragmanları yerine PBS tamponunda 12 saat süreyle inkübe edilmiş kristal kullanılmıştır. İkinci kontrol deneyinin amacı; tampondaki fosfat grupları ile yüzeydeki fosfat grupları arasındaki olası bir etkileşimin olup olmadığının görülmesi ve kristallerin osilasyon frekanslarındaki sapmanın, yalnızca poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonundan kaynaklandığının ispatlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6.'de verilen sonuçlara göre; poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonunun PP-DP (50W5dk) ve PP-DP (50W25dk) kristalleri için gerçekleştirildiği görülmektedir. PoliA DNA fragmanlarının molekülleri boş altın yüzeyi ile herhangi bir etkileşim göstermemekte ve PP-DP kaplı yüzeyler immobilizasyonda kullanılan PBS tampon çözeltisi ile etkileşime girmemektedir.

Çizelge 4.6. Plazma Polimerizasyonu-DP yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) F <sub>1</sub>	PoliA immobilizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) F <sub>2</sub>	Frekans sapması, ΔF (Hz) (F <sub>2</sub> -F <sub>1</sub> )
PP-DP (50W5dk) (PoliA)	5.012.214 (±1 Hz)	5.012.091 (±2 Hz)	-123
PP-DP (50W25dk) (PoliA)	5.009.995 (±2 Hz)	5.009.836 (±1 Hz)	-159
Boş kristal (Kontrol#1)	5.006.759 (±2 Hz)	5.006.755 (±3 Hz)	-1
PP-DP (50W5dk) (Kontrol#2-PBS)	5.006.670 (±1 Hz)	5.006.668 (±2 Hz)	0

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

#### 4.4.2. Plazma Polimerizasyonu-DASH Yöntemiyle Modifiye Edilmiş Yüzeyle Oligonükleotid İmmobilizasyonu

Etiketsiz aptamer immobilizasyonu için geliştirilen yöntem ile geleneksel etiketlenmiş oligonükleotid kullanılan yöntemin kıyaslanabilmesi amacıyla, kristal yüzeyleri 1,2- Diaminosikloheksan (DASH) monomeri ile, daha önce PABB grunda optimum olarak belirlenen 45 W boşalım gücü 5 dakika işlem süresi parametrelerinde, plazma polimerizasyonu yöntemi kullanılarak modifiye edilmiş ve yapılarında aldehit grubu oluşturulmuş, poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Çökeller, 2006). Yüzey modifikasyonu ve yüzeylere poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu, her aşamada ölçülen kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Plazma Polimerizasyonu-DASH yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere, poliA DNA fragmanlarının immobilizasyonu ve immobilizasyon sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) $F_1$	Plazma polimerizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_2$
PP-DASH (45W5dk)	5.005.219 ( $\pm 2$ Hz)	5.005.200 ( $\pm 2$ Hz)

Kristal*	PoliA immobilizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_3$	Plazma polimerizasyonu ile oluşan Frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_2-F_1$ )	PoliA immobilizasyonu ile oluşan Frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_3-F_2$ )
PP-DASH (45W5dk)	5.005.185 ( $\pm 2$ Hz)	-19	-15

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 5 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

#### 4.5. İmmobilize Edilen Molekül Sayısının Hesaplanması

Kuartz kristal mikrobalsans sistemi kullanılarak, kristal yüzeyi üzerindeki ufak kütle değişikliklerinin ölçebileceği ilk olarak Sauerbrey tarafından ortaya konulmuştur. Sauerbrey'nin geliştirdiği temel eşitlik, günümüzde birçok farklı uygulama alanında kullanılmaktadır (Saurbery, 1959). Sauerbrey denklemi "Eş. 4.3." olarak aşağıda verilmiştir.

$$\Delta f = -C_f \times \Delta m \quad (4.3)$$

"Eş. 4.3." denkleminde;  $\Delta f$  = Frekans Değişimi (Hz),  $C_f$  = Kristalin Hassasiyet Faktörü (Hz.cm<sup>2</sup>/ng) ve  $\Delta m$  = Birim Alan Basına Kütle Değişimi (g/cm<sup>2</sup>) parametrelerini ifade etmektedir.

Sauerbrey denkleminde, kristal üzerine biriken filmin ya da kütlenin kuartz ile aynı akusto-elastik özellik gösterdiği varsayımı yapılır. Bu varsayım, QCM kristalin temel özelliği olan  $C_f$ 'in hesaplanmasını gerektirmektedir.  $C_f$ 'in hesaplanmasına olanak tanıyan denklem "Eş. 4.4." olarak aşağıda verilmiştir.

$$C_f = \frac{2n \times f^2}{\sqrt{\rho_q \times \mu_q}} \quad (4.4)$$

"Eş. 4.4." denkleminde; n = Kristalin Harmonik Sayısı, f = Kristalin Rezonans Frekansı,  $\rho_q$  = Kuartzın Yoğunluğu (2.648 g/cm<sup>3</sup>) parametrelerini ifade etmektedir.  $\mu_q$  = Kuartzın Shear Modulus Değeri (2.947x10<sup>11</sup> g/cm.sn<sup>2</sup>) Maxtek firmasından temin edilmiş kristallerin hassasiyet faktörü: 0.0566 Hz.cm<sup>2</sup>/ng (20°C çalışma sıcaklığı, 5 MHz'lik kristal için) olarak hesaplanmıştır.

Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan poliA miktarı, havada alınan ölçümler ile “Eş. 4.3.” ve “Eş. 4.4.” kullanılarak hesaplanmış ve elde edilmiş sonuçlar Çizelge 4.8.’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan poliA DNA fragmanları.

Kristal	poliA miktarı ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	poliA miktarı ( $\text{pmol}/\text{cm}^2$ )
PP-DP (50W5dk)	0,76	247,47
PP-DP (50W25dk)	0,99	322,36
PP-DASH (45W5dk)	0,09	29,31

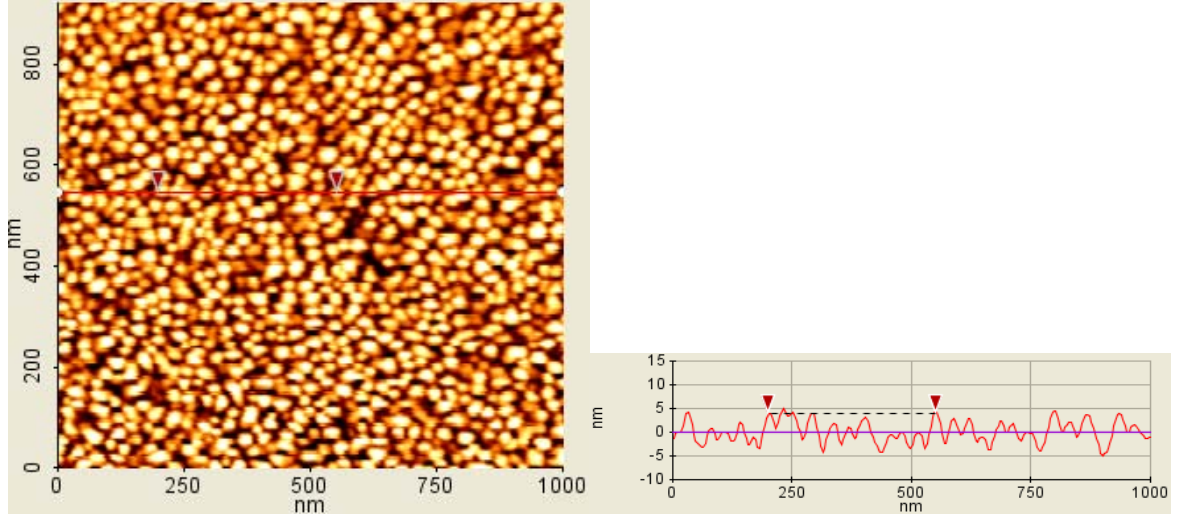
Saurebery eşitliği kullanılarak hesaplanmış bu sonuçlar; “etiketsiz” aptamer immobilizasyonu (Plazma Polimerizasyonu-DP) yöntemi ile geleneksel aptamer immobilizasyonu (Plazma Polimerizasyonu-DASH) metodlarının karşılaştırılmasına imkan vermiştir. Plazma Polimerizasyonu-DASH modifikasyonu sonrası kristal yüzeyinde oluşan kütle birikiminin PP-DP (50W5dk) kristali ile yaklaşık aynı olduğu halde, PP-DASH (45W5dk) kristal yüzeyine immobilize olan poliA DNA fragmanlarının molekül sayısının PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine immobilize olan poliA DNA fragmanlarının molekül sayısının yaklaşık 1/8 oranında daha düşük olduğu görülmektedir. PoliA DNA fragmanlarının en yoğun olarak yüzeye immobilize edildiği plazma polimerizasyonu parametresi de PP-DP (50W25dk) olarak belirlenmiştir.

#### 4.6. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)

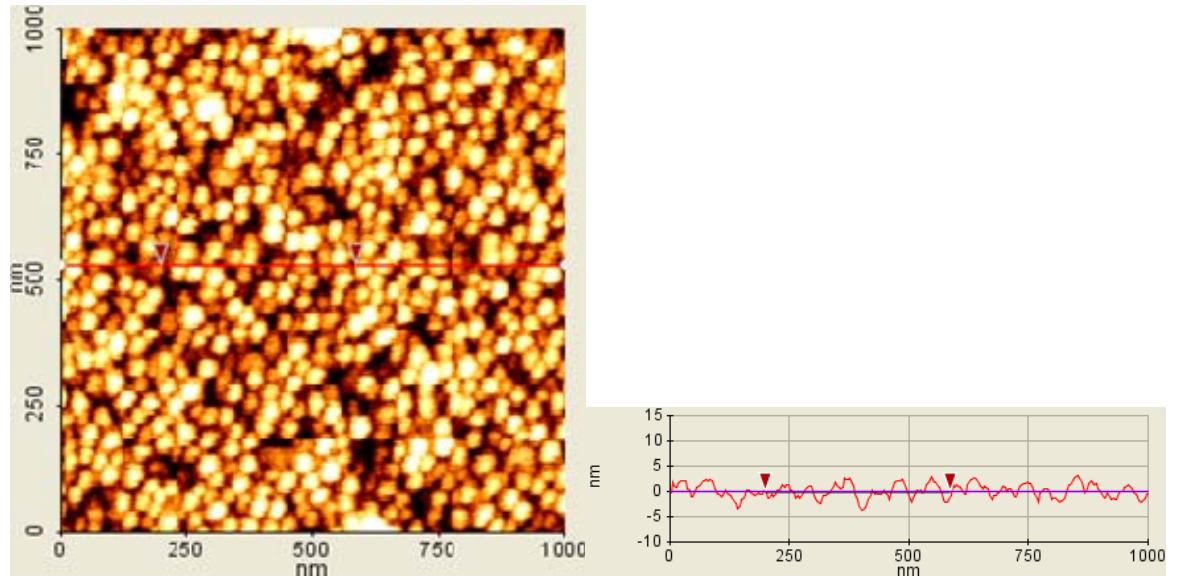
Atomik kuvvet mikroskobu (AKM) görüntülemelerinin gerçekleştirilmesi için; boş altın yüzey, PP-DP (50W5dk) kaplı yüzey ve PP-DP (50W5dk) kaplı ve poliA DNA fragmanları immobilize edilmiş yüzey kullanılmıştır.

AKM imajları kontak içermeyen görüntü alma yöntemi kullanılarak alınmıştır. AKM imajları alınırken, kristal yüzeyindeki 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ 'lik bir alan 0.8 Hz hızında taramıştır. Elde edilen AKM görüntüleri Şekil 4.3.'de verilmiştir. AKM görüntüleri, cihazın paket yazılımı olan XEI a.6 kullanılarak işlenmiştir (*PSIA, XE-100E, UNAM-Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü, Ankara*).

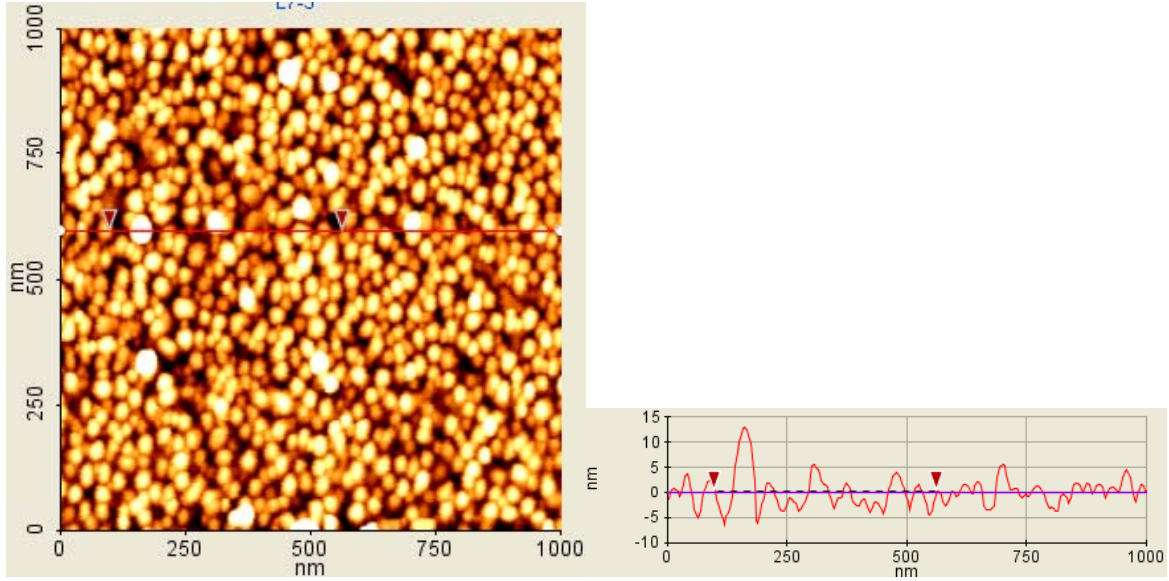
a) Boş altın yüzey (rms: 2.24 nm)



b) PP-DP (50W5dk) (rms: 1.40 nm)



c) PP-DP (50W5dk)-PoliA DNA fragmanları (rms: 3.09 nm)



Şekil 4.3. Boş altın yüzey, PP-DP (50W5dk) kaplı yüzey ve PP-DP (50W5dk) kaplı ve poliA DNA fragmanları immobilize edilen yüzeylerin AKM görüntüleri.

Şekil 4.3.'de verilen AKM sonuçlarının ortaya koyduğu gibi, boş kristal yüzeyi 2.24 nm'lik bir rms değeri ile oldukça pürüzlü bir özellik göstermektedir. Bu değer, PP-DP (50W5dk) kristali için 1.40 nm'ye düşmektedir. PP-DP (50W5dk) kristalinin rms değerindeki bu düşüş, yüzeyin DP monomeri ile kaplanması sonucunda, yüzeyde oluşan homojen ve daha az pürüzlü bir yapıdan kaynaklanmaktadır. Bu sonuç, literatürde plazma polimerizasyon yöntemi ile yapılan kaplamaların özellikleriyle uyum göstermektedir (Çökeliler, 2006).

PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine poliA DNA fragmanları immobilize edildikten sonra, rms değerinin 3.09'a çıktığı görülmektedir. AKM görüntülerinden de poliA DNA fragmanlarının yüzeyde, yaklaşık 40 nm çapında yuvarlak yumrular halinde bulunduğu anlaşılmaktadır. PP-DP (50W5dk) kristalinin AKM görüntülerinde gözlenen bu yapı, literatürde verilen ss-DNA AKM görüntüleri ile elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir (Ha et al., 2004). Bu sonuç, poliA DNA fragmanlarının yüzeyde teker teker değil de kümeler halinde immobilize olduğunu göstermektedir.

#### 4.7. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

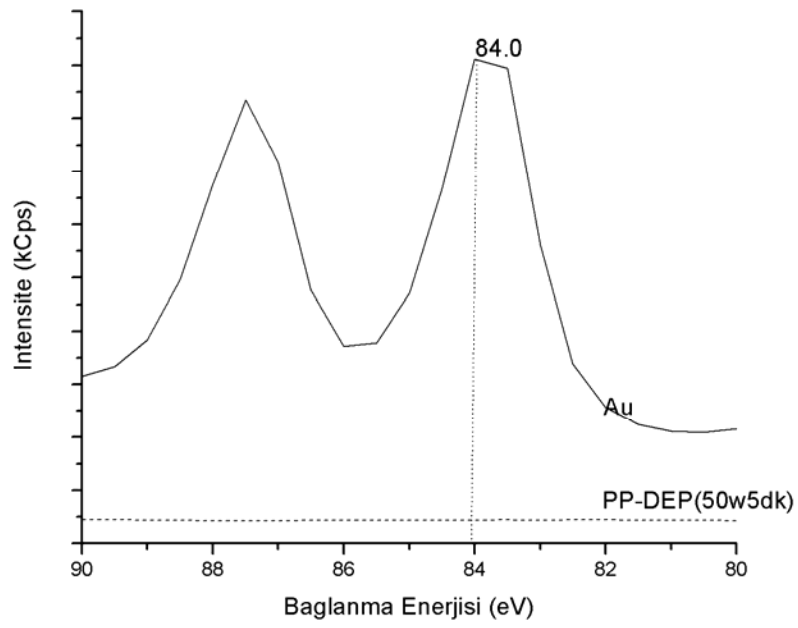
X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) yöntemiyle, ilk aşamada kaplanma gerçekleştirilmemiş altın yüzey ve PP-DP (50W5dk) ile kaplanmış kristal yüzey

incelenmiştir. Burada plazma polimerizasyonu yöntemi ile yüzeyde oluşan kimyasal değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Kaplanmamış altın yüzeyde, Au ve hidrokarbon kontaminantlarından gelecek olan C elementlerinin görülmesi beklenmektedir. PP-DP (50W5dk) ile kaplanmış kristal yüzeylerinde ise, monomerden gelecek olan P elementi kaplamanın başarıyla gerçekleştiğinin göstergesi olacaktır. Boş altın yüzey ve PP-DP (50W5dk) ile kaplı yüzeyde N elementinin görünmesi beklenmemektedir. poliA DNA fragmanlarının yapısındaki bazlarda N içerdiğinden, N elementinin varlığı aptamerin yüzeye immobilize olduğunu gösterecektir.

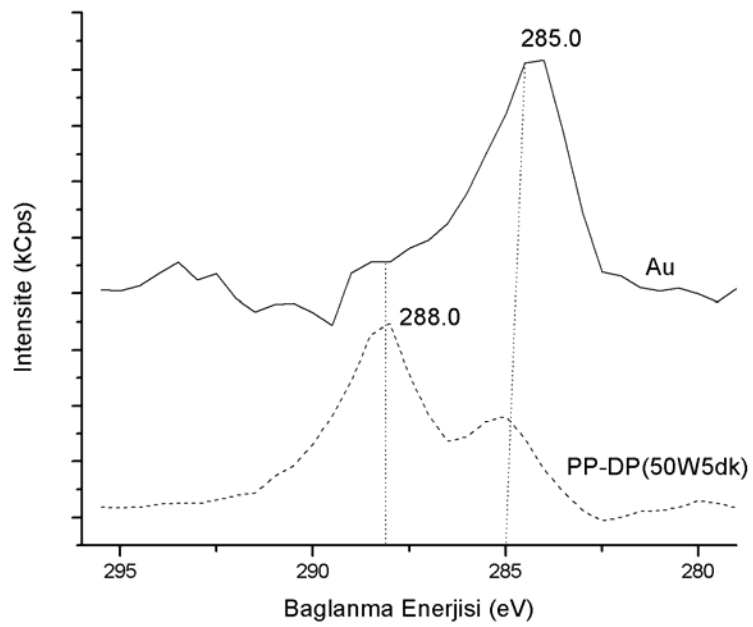
Kaplanmamış altın yüzeyi, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyi, plazma polimerizasyonu ile kaplamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması açısından, yüzeydeki Au, C ve P elementleri cinsinden kıyaslanmıştır ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. Buna göre; kaplanmamış altın yüzeyde 84.0 eV karakteristik bağlanma enerjisi değerinde Au (4f/2) elementi görülürken (Lee et al., 2007; Gong et al., 2006), PP-DP (50W5dk) yüzeyinde Au elementine rastlanmamıştır (Şekil 4.4a). Bu durum yüzeyin plazma polimerizasyonu ile modifikasyonu sonucu tamamen kaplandığını göstermektedir. İki yüzey C1s spektrumları cinsinden incelendiğinde; kaplanmamış yüzeyde 285 eV bağlanma enerjisinde belirgin bir pik görülmüş ve C-C, C-H bağları ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.4b). Bu pikin, hidrokarbon kontaminantlardan geldiği düşünülmektedir (Lee et al., 2007).

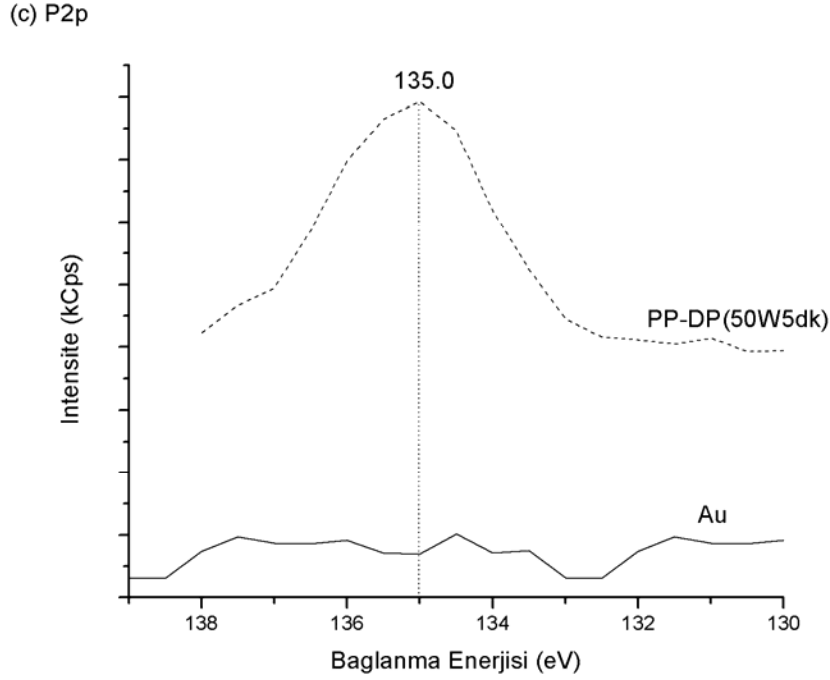
Ayrıca PP-DP (50W5dk) yüzeyinde, 285 ve 288 eV bağlanma enerjisi değerlerinde, C-C, C-H ve C=O bağlarına spesifik pikler elde edilmiştir (Lee et al., 2007; Gong et al., 2006; Rats et al., 1995). Bu iki pik, kaplanmamış yüzey için üst üste binmiş olduğu halde PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyde daha belirgindir. Plazma polimerizasyonu yöntemi ile modifikasyonun belirleyicisi, altın yüzeyinde bulunmayan ancak DP monomerinin yapısında bulunan P elementidir. Şekil 4.2c.'de verilen XPS spektrumlarında, 135 eV bağlanma enerjisi değerinde elde edilen pik P (2p) elementi ile ilişkilendirilmiş ve P=O bağına ait olduğu sonucuna varılmıştır (Lee et al., 2007). P elementi, beklendiği gibi kaplanmamış yüzeyde gözlemlenememişken, PP-DP (50W5dk) yüzeyinde görülmüştür. Bu durum plazma polimerizasyonu yöntemi ile DP monomerinin kaplandığını göstermektedir.

(a) Au 4f



(b) C1s

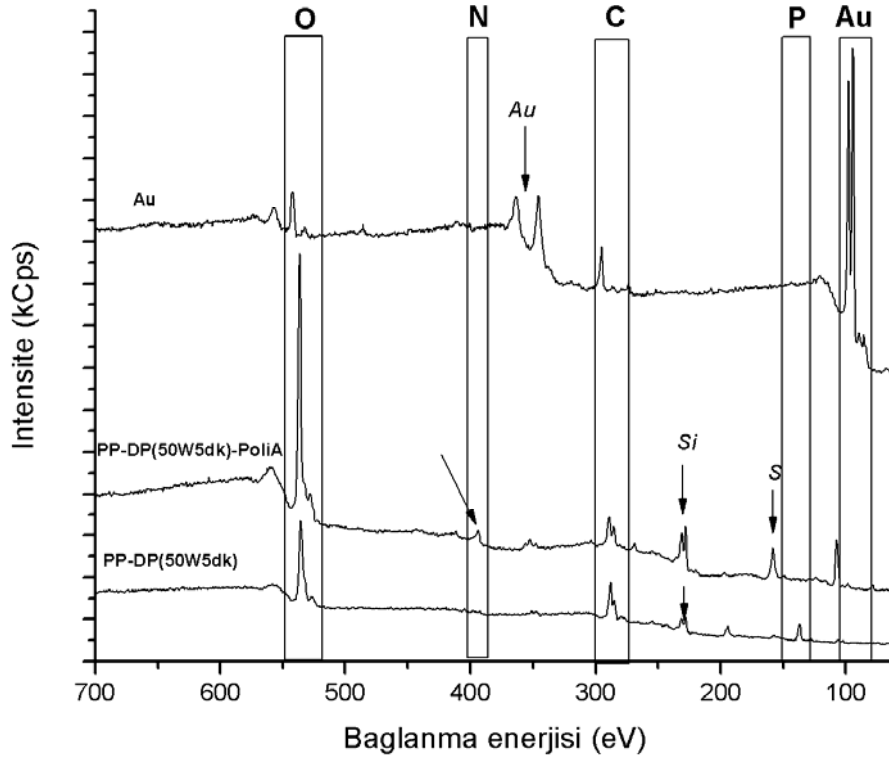




Şekil 4.4. Kaplanmamış altın ve PP-DP (50W5dk) kristal yüzeylerinin XPS ile gerçekleştirilen incelemeleri.

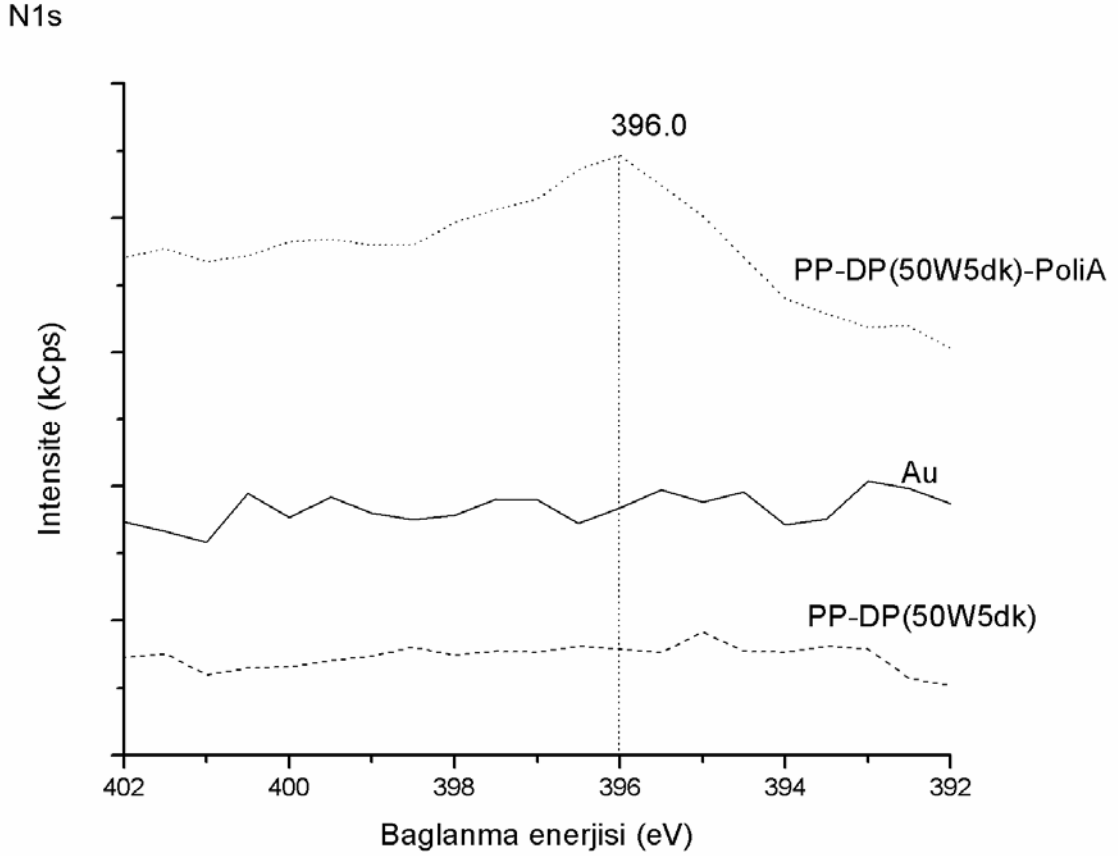
Kaplanmamış altın yüzeyinin, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyinin ve PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyinin XPS spektrası Şekil 4.5.'de verilmiştir. Buna göre 84 eV'de görülen Au piki PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyde de görülmemiştir. Spektrumlarda, kaplanmamış yüzey için Au (4f/2) (84eV), C (1s, 285 ve 288 eV) ve O (1s, 530 eV) elementleri görülmektedir.

PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyindeyse C (1s, 285 ve 288 eV) ve O (1s, 530 eV) elementlerinin yanı sıra, DP monomerinden kaynaklanan P (2p, 135 eV) elementi belirlenmiştir. Ayrıca PP-DP (50W5dk) yüzeyinde eser miktarda Si (2p, 99.2 eV) ve S (2p, 166 eV) elementlerine rastlanmıştır. Si, kuartzın yapısında bulunmakta ve örneklerin hazırlanması esnasında kristal yüzeyinin çizilmiş olmasından dolayı, Şekil 4.5.'de verilmiş XPS spektrasında gözlemlenmiştir. S elementinin ise örnek hazırlanması esnasında yüzey ile temas eden cımbız "tweezer" setinden gelmiş olması kuvvet ile muhtemeldir.



Şekil 4.5. Kaplanmamış altın yüzeyi, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyi ve PP-DP (50W5dk)-PoliA DNA fragmanları içeren yüzeyinin XPS spektrisi.

PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyde; C (1s, 285 ve 288 eV), O (1s, 530 eV), DP monomerinden ve poliA DNA fragmanlarının yapısında bulunan fosfat gruplarından kaynaklanan P (2p, 135 eV) ve Si (2p, 99.2 eV) elementleri belirlenmiştir. PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyde ayrıca, kaplanmamış ve DP (50W5dk) kristal yüzeyinde bulunmayan, N (1s, 396 eV) elementine rastlanmıştır. 396 eV'daki N piki N-C bağı ile ilişkilendirilmiştir (Lee et al., 2007; Jouan et al., 1993). N elementi, poliA DNA fragmanlarının yapısında adenin bazında bulunmaktadır ve beklendiği gibi yalnızca PP-DP (50W5dk)-poliA spektrumunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Bu durum, poliA DNA fragmanlarının yüzeye başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. PoliA DNA fragmanları içeren PP-DP (50W5dk)-poliA yüzeyinin XPS spektrası.

#### 4.8. “Etiketsiz” Aptamer İmmobilizasyonu

##### 4.8.1. HD-22 DNA Aptameri İmmobilizasyonu

PP-DP (50W5dk) ile modifiye edilmiş kristalin osilasyon frekansında meydana gelen sapma ve daha sonra bu kristal üzerine HD-22 DNA aptamerinin immobilizasyonu sonucu oluşan osilasyon frekansındaki değişim Çizelge 4.9.’da verilmiştir. Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan HD-22 DNA aptamerinin miktarı, “Eş. 4.3.” ve “Eş. 4.4.” denklemlerinin havada alınan ölçüm verileriyle kullanılması sonucu hesaplanmıştır ve elde edilmiş sonuçlar ise Çizelge 4.10.’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Plazma Polimerizasyonu-DP yöntemiyle modifiye edilmiş yüzeylere HD-22 DNA aptamerinin immobilizasyonu sonrası kristallerin osilasyon frekanslarında meydana gelen sapma.

Kristal*	Plazma polimerizasyonu öncesi osilasyon frekansı (MHz) $F_1$	Plazma polimerizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_2$
PP-DP (50W5dk)	5.007.456 ( $\pm 1$ Hz)	5.007.427 ( $\pm 1$ Hz)

Kristal*	HD-22 immobilizasyonu sonrası osilasyon frekansı (MHz) $F_3$	Plazma polimerizasyonu ile oluşan frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_2-F_1$ )	HD-22 immobilizasyonu ile oluşan frekans sapması, $\Delta F$ (Hz) ( $F_3-F_2$ )
PP-DP (50W5dk-HD22)	5.007.334 ( $\pm 1$ Hz)	-29	-93

\* Standart sapmalar, her bir kristal için frekans ölçümleri 3 kere tekrar edilerek hesaplanmıştır.

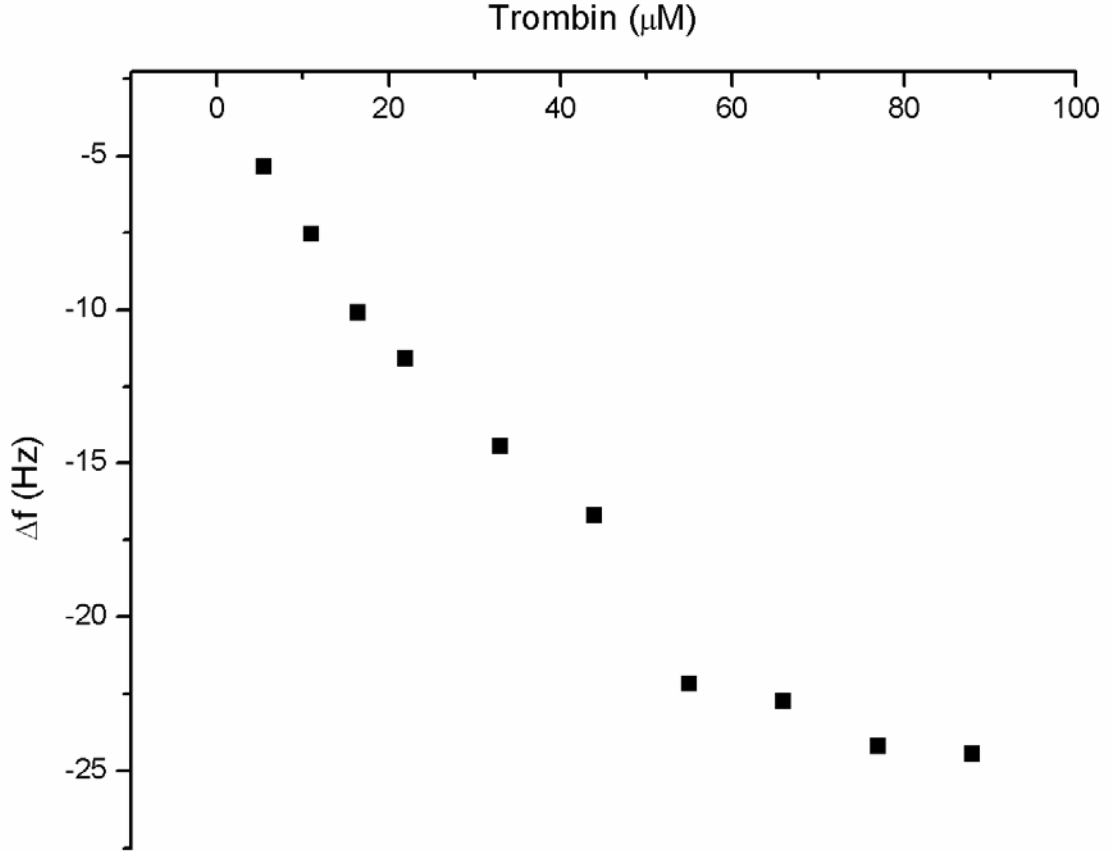
Çizelge 4.10.'da sunulan veriler, HD-22 DNA aptameri kristal yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. "Etiketsiz" immobilizasyon yöntemiyle, PP-DP (50W5dk-HD22) kristal yüzeyine tutuklanan HD-22 DNA aptamerinin miktarı  $180.82 \text{ pmol/cm}^2$  olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine, "etiketsiz" immobilizasyon yöntemi ile tutuklanan poliA DNA fragmanlarının miktarı ( $247,47 \text{ pmol/cm}^2$ ) ile karşılaştırıldığında; HD-22 DNA aptamerinin poliA DNA fragmanlarına göre 0.27 oranında daha az tutuklanmış olduğu gözlemlenmektedir. HD-22 DNA aptameri ile poliA DNA fragmanlarının yüzeye farklı oranlarda bağlanmasının temel nedeni; HD-22 DNA aptamerinin moleküler büyüklüğünün, poliA DNA fragmanından fazla olması kaynaklı yüzeyde oluşturduğu sterik engelleme miktarındaki artıştır.

Çizelge 4.10. Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylere immobilize olan HD-22 DNA aptameri miktarı.

Kristal	HD-22 miktarı ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	HD-22 miktarı ( $\text{pmol/cm}^2$ )
PP-DP (50W5dk-HD22)	1.64	180.82

#### 4.8.2. İmmobilize HD-22 DNA Aptamerleri Trombin Enzimi Etkileşimi

PP-DP (50W5dk) kaplanmış ve yüzeyine HD-22 DNA aptameri immobilize edilmiş kristalin, trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler QCM sisteminde incelenmiş ve farklı trombin konsantrasyonlarına karşı osilasyon frekansında meydana gelen değişimler Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. PP-DP (50W5dk-HD22) kristali üzerine immobilize HD-22 DNA aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimler.

Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere PP-DP (50W5dk-HD-22) yüzeyi yaklaşık 77 μM trombin konsantrasyonunda doymuş hale gelmiştir. “Eş. 4.3.” ve “Eş. 4.4.” kullanılarak hesaplanmış, 77 μM konsantrasyonunda PP-DP (50W5dk-HD-22) kristalinin yüzeyi üzerindeki trombin miktarı Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. PP-DP (50W5dk-HD-22) kristalinin yüzeyi üzerindeki trombin miktarı.

Kristal	Trombin miktarı ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Trombin miktarı ( $\text{pmol}/\text{cm}^2$ )
PP-DP (50W5dk-HD22)	0,02	0,64

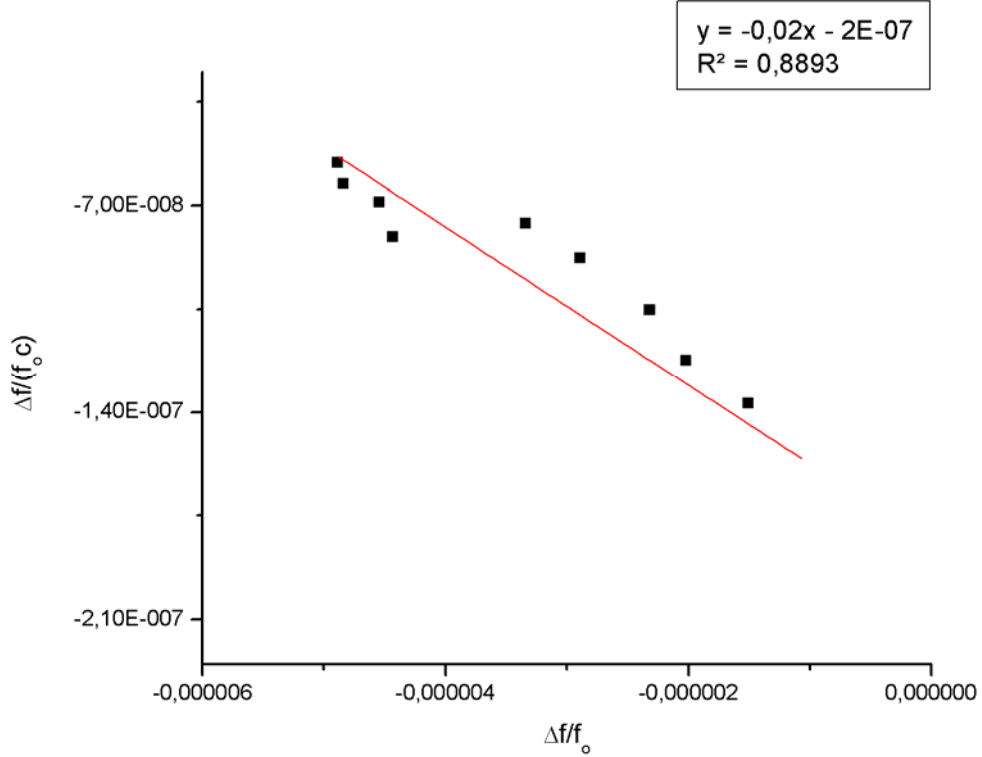
HD-22 DNA aptamerleri “etiketsiz” immobilizasyon yöntemi sonrası aktivitelerini kaybetmeyip, trombin enzimi ile etkileşime girmeleri, immobilizasyon prosesinin başarı ile sonuçlandırıldığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar ile uyumlu bir şekilde, PP-DP (50W5dk-HD-22) kristalinin yüzeyi üzerindeki trombin miktarı  $0.64 \text{ pmol}/\text{cm}^2$  olarak hesaplanmıştır (Klussmann, 2006; Hianik et al., 2005). Kristal yüzeyindeki HD-22 DNA aptamerleri ile etkileşime giren trombin enziminin miktarını kısıtlayan faktörler; (1) immobilizasyon sürecinde oryantasyonu ve konformasyonu bozulmuş aptamer moleküllerinin yüzey üzerinde bulunma olasılığı ve (2) HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile etkileşiminin kooperatif bağlanma karakteristikleri olarak belirlenmiştir.

Literatürde QCM sistemi ile gerçekleştirilen aptamer-ligand çalışmalarında bağlanma sabiti hesaplama yöntemi olarak Scatchard denklemi (Scatchard, 1949) kullanılmıştır (Hianik et al., 2005). Scatchard denklemi “Eş. 4.5.” olarak aşağıda verilmiştir.

$$\frac{\Delta f}{f_0 c} = k_b N - k_b \frac{\Delta f}{f_0} \quad (4.5)$$

“Eş. 4.5.” denkleminde;  $\Delta f$  = Trombin Eklenmesini Takiben Oluşan Frekans Sapması (Hz),  $f_0$  = Trombin Eklenmesinden Önce Kristalin Osilasyon Frekansı (Hz),  $c$ : Eklenen Trombin Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ ),  $k_b$  = Bağlanma Sabiti ( $\mu\text{M}^{-1}$ ),  $N$  = Bağlanma Bölgesi Sayısı parametrelerini ifade etmektedir.

Scatchard denklemine göre;  $\Delta f/f_0$  'a karşı  $\Delta f/(f_0c)$  grafiği çizildiği zaman elde edilen grafiğin eğilimi  $-k_b$ 'yi vermektedir. “Eş. 4.5.” denklemi kullanılarak elde edilen Scatchard plot grafiği Şekil 4.8.'de verilmiştir. Scatchard plot grafiğinin eğilimi hesaplanarak elde edilmiş HD-22 DNA aptamerinin bağlama sabiti ( $K_b$ ) ve “Eş. 4.3.” denklemi kullanılarak hesaplanmış ayrılma sabiti ( $k_d$ ) değerleri Çizelge 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. PP-DP (50W5dk-HD22) kristali üzerine immobilize HD-22 DNA aptamerinin trombin enzimi ile gerçekleştirdiği etkileşimlerin Scatchard plot grafiği.

Çizelge 4.12. “Etiketsiz” aptamer immobilizasyonu prosesinden sonra HD-22 DNA aptamerinin Scatchard denklemi kullanılarak hesaplanan Bağlanma Sabiti ( $k_b$ ) ve Ayrılma Sabiti ( $k_d$ ) değerleri.

Kristal	$K_b$ ( $nM^{-1}$ )	$k_d$ (nM)
PP-DP (50W5dk-HD22)	20	0.05

HD-22 aptamerinin, literatürde genel kabul gören ayrılma sabiti değerleri; (1) serbest halde (Bock et al., 1992; Cho et al., 2006)  $k_d=0.5$  nM ve (2) klasik immobilizasyon yöntemleri sonrası QCM ölçüm sisteminde (Hianik et al., 2005) ise

$k_d=5.8$  nM'dır. Bu çalışmada, "etiketsiz" immobilizasyon yöntemiyle PP-DP (50W5dk-HD22) kristal yüzeyine tutuklanan HD-22 DNA aptamerinin, "Eş. 4.3." denklemini kullanılarak ayrılma sabiti  $k_d=0.05$  nM olarak hesaplanmıştır. Bu değer "etiketsiz" immobilizasyon yönteminin alternatiflerine kıyasla çok daha başarılı bir immobilizasyon yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır.

## 5. SONUÇLAR

Aptamer moleküllerinin yapılarında herhangi bir kimyasal modifikasyon gerçekleştirilmeden tutuklanmasını sağlamak için, “etiketsiz” bir aptamer immobilizasyon yönteminin araştırılmasını hedef alan bu çalışmada elde edilen önemli kazanımlar aşağıda özetlenmiştir.

Literatürde genel olarak kabul gören exosite I bölgesine spesifik HD-1 aptameri yaklaşımı, İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) cihazı ile gerçekleştirilen termodinamik karakterizasyon çalışmalarında bağımsız tek bağlanma bölgesi modeli kullanılmasına sebep olmuştur (Nallagatla et al., 2009). Ancak bu çalışmada elde edilen dilüsyon kaynaklı termal değişimler elimine edilmiş kalorimetrik titrasyon verilerinin (Th-HD22/PBS) taban çizgisinde gözlenen kayma, bağımsız tek bağlanma bölgesi modelinin geçerliliğini ortadan kaldırmıştır.

MicroCal ORIGIN programı ile oluşturulmuş Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verilerinde gözlemlenen pik, HD-22 aptamerinin trombin enzimi arasındaki etkileşimlerin iki ayrı bölgede gerçekleştiğini göstermektedir (MicroCal., 2004). Bu çalışma sürecinde elde edilen Th-HD22/PBS kalorimetrik titrasyon verileri, Padmanabhan tarafından 1993 ve 1996 yıllarında önerilen exosite spesifik olmayan bağlanma modelinin geçerliliğini artırmıştır.

Th-HD22/PBS bağlanma analizlerinin gerçekleştirildiği MicroCal ORIGIN programının sıralı bağlanma modeli, iki bağlanma bölgesi parametresi ile kullanılmıştır (MicroCal., 2004). Sıralı bağlanma modeli kullanılarak yapılan analizler, HD-22 aptamerinin trombin molekülünde birbirinden bağımsız iki bölgeye bağladığını göstermektedir. HD-22 aptamer-trombin enzim kompleksinin termodinamik karakterizasyonu sonucu HD-22 aptamerinin trombin enzimi üzerinde exosite II bölgesine yüksek afinite ile bağlanırken, exosite I bölgesine de düşük bir afinite ile bağlanıyor olabileceğini ortaya koymuştur. HD-22 aptamerinin trombin enzimi arasındaki bağlanma kinetiği, HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile etkileşiminin kooperatif bağlanma karakteristikleri gösterme olasılığını ortaya koymaktadır.

Saurebery eşitliği kullanılarak hesaplanmış kristal yüzeyine immobilize olmuş molekül miktarları (Saurebery, 1959); “etiketsiz” aptamer immobilizasyonu (Plazma

Polimerizasyonu-DP) yöntemi ile geleneksel aptamer immobilizasyonu (Plazma Polimerizasyonu-DASH) metotlarının karşılaştırılmasına imkan vermiştir. Plazma Polimerizasyonu-DASH modifikasyonu sonrası kristal yüzeyinde oluşan kütle birikiminin PP-DP (50W5dk) kristali ile yaklaşık aynı olduğu halde, PP-DASH (45W5dk) kristal yüzeyine immobilize olan poliA DNA fragmanlarının molekül sayısının PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine immobilize olan poliA DNA fragmanlarının molekül sayısının yaklaşık 1/8 oranında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç “etiketsiz” aptamer immobilizasyon yönteminin klasik immobilizasyon yöntemlerine karşın üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine poliA DNA fragmanları immobilize edildikten sonra gerçekleştirilen atomik kuvvet mikroskobu (AKM) çalışmaları, boş kristal yüzeyi 2.24 nm’lik bir rms değeri ile oldukça pürüzlü bir özellik göstermekte olduğunu ortaya koymuştur. Bu değer, PP-DP (50W5dk) kristali için 1.40 nm’ye düşmektedir. PP-DP (50W5dk) kristalinin rms değerindeki bu düşüş, yüzeyin DP monomeri ile kaplanması sonucunda, yüzeyde oluşan homojen ve daha az pürüzlü bir yapıdan kaynaklanmaktadır. Bu sonuç, literatürde plazma polimerizasyon yöntemi ile yapılan kaplamaların özellikleriyle uyum göstermektedir (Çökeliler, 2006).

AKM çalışmaları ayrıca, poliA DNA fragmanlarının yüzeyde, yaklaşık 40 nm çapında yuvarlak yumrular halinde bulunduğunu göstermiştir. PP-DP (50W5dk) kristalinin AKM görüntülerinde gözlenen bu yapı, literatürde verilen ss-DNA AKM görüntüleri ile elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir (Ha et al., 2004). Bu sonuç, poliA DNA fragmanlarının yüzeyde teker teker değil de kümeler halinde immobilize olduğunu göstermektedir.

PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyde gerçekleştirilen X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analizleri sonucu; C (1s, 285 ve 288 eV), O (1s, 530 eV), DP monomerinden ve poliA DNA fragmanlarının yapısında bulunan fosfat gruplarından kaynaklanan P (2p, 135 eV) ve Si (2p, 99.2 eV) elementleri belirlenmiştir. PP-DP (50W5dk)-poliA DNA fragmanları içeren yüzeyde ayrıca, kaplanmamış ve DP (50W5dk) kristal yüzeyinde bulunmayan, N (1s, 396 eV) elementine rastlanmıştır. 396 eV’daki N piki N-C bağı ile ilişkilendirilmiştir (Lee et al., 2007; Jouan et al., 1993). N elementi, poliA DNA fragmanlarının yapısında

adenin bazında bulunmaktadır ve yalnızca PP-DP (50W5dk)-poliA spektrumunda gözlemlenmiştir. Bu durum, poliA DNA fragmanlarının yüzeye başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.

“Etiketsiz” immobilizasyon yöntemiyle, PP-DP (50W5dk-HD22) kristal yüzeyine tutuklanan HD-22 DNA aptamerinin miktarı  $180.82 \text{ pmol/cm}^2$  olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, PP-DP (50W5dk) kristal yüzeyine, “etiketsiz” immobilizasyon yöntemi ile tutuklanan poliA DNA fragmanlarının miktarı ( $247,47 \text{ pmol/cm}^2$ ) ile karşılaştırıldığında; HD-22 DNA aptamerinin poliA DNA fragmanlarına göre 0.27 oranında daha az tutuklanmış olduğu gözlemlenmektedir. HD-22 DNA aptameri ile poliA DNA fragmanlarının yüzeye farklı oranlarda bağlanmasının temel nedeni; HD-22 DNA aptamerinin moleküler büyüklüğünün, poliA DNA fragmanından fazla olması kaynaklı yüzeyde oluşturduğu sterik engelleme miktarındaki artıştır.

HD-22 DNA aptamerleri “etiketsiz” immobilizasyon yöntemi sonrası aktivitelerini kaybetmeyip, trombin enzimi ile etkileşime girmeleri, immobilizasyon prosesinin başarıyla sonuçlandırıldığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar ile uyumlu bir şekilde, PP-DP (50W5dk-HD-22) kristalinin yüzeyi üzerindeki trombin miktarı  $0.64 \text{ pmol/cm}^2$  olarak hesaplanmıştır (Klussmann, 2006; Hianik et al., 2005). Kristal yüzeyindeki HD-22 DNA aptamerleri ile etkileşime giren trombin enziminin miktarını kısıtlayan faktörler; (1) immobilizasyon sürecinde oryantasyonu ve konformasyonu bozulmuş aptamer moleküllerinin yüzey üzerinde bulunma olasılığı ve (2) HD-22 aptamerinin trombin enzimi ile etkileşiminin kooperatif bağlanma karakteristikleri olarak belirlenmiştir

HD-22 aptamerinin, literatürde genel kabul gören ayrılma sabiti değerleri; (1) serbest halde (Bock et al., 1992; Cho et al., 2006)  $k_d=0.5 \text{ nM}$  ve (2) klasik immobilizasyon yöntemleri sonrası QCM ölçüm sisteminde (Hianik et al., 2005) ise  $k_d=5.8 \text{ nM}$ 'dir. Bu çalışmada, “etiketsiz” immobilizasyon yöntemiyle PP-DP (50W5dk-HD22) kristal yüzeyine tutuklanan HD-22 DNA aptamerinin, ayrılma sabiti  $k_d=0.05 \text{ nM}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer “etiketsiz” immobilizasyon yönteminin alternatiflerine kıyasla çok daha başarılı bir immobilizasyon yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Akman, MA., 1993, Mechanical Properties of Plasma Surface Modified Calcium Carbonate/PP Composites, Master's Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Science, Middle East Technical University, Ankara.
- Andersson, K., Hamalainen, M. and Malmqvist, M., 1999, Identification and Optimization of Regeneration Conditions for Affinity-Based Biosensor Assays. A Multivariate Cocktail. Approach Anal. Chem., 71, 2475-2481.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, SA., McCarley, RL., Spivak, DA., 2006, Designing Highly Specific Biosensing Surfaces Using Aptamer Monolayers on Gold. Langmuir, 22, 6446-6453.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, SA., Spivak, DA., 2008, Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. Anal. Bioanal. Chem., 390, 1009-1021.
- Baldrich, E., Restrepo, A. and O'Sullivan, CK., 2004, Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. Anal. Chem., 76, 7053-7063.
- Bock, LC., Griffin, LC., Latham, JA., Vermass, EH., Toole, JJ., 1992, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature, 355, 564-566.
- Brody, EN. and Gold, L., 2000, Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. J. Biotechnol., 74, 5-13.
- Buchanan, DD., Jameson, EE., Perlette, J., Malik, A., Kennedy, RT., 2003, Effect of buffer, electric field, and separation time on detection of aptamer-ligand complexes for affinity probe capillary electrophoresis. Electrophoresis, 24, 1375-1382.
- Bunka, DH. and Stockley, PG., 2006, Aptamers come of age - at last. Nat. Rev. Microbiol., 4, 588-596.
- Burke, DH. and Gold, L., 1997, RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX. Nucleic Acids Res., 25, 2020-2024.
- Buurma, NJ., Haq, I., 2007, Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand-DNA interactions. Methods, 42, 162-172.
- Centi, S., Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M., 2007, Aptamer-Based Detection of Plasma Proteins by an Electrochemical Assay Coupled to Magnetic Beads. Anal. Chem., 79, 1466-1473.
- Chen, F., Zhou, J., Luo, F., Mohammed, AB., Zhang, XL., 2007, Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 357, 743-748.

- Cho, E.J., Collett, J.R., Szafranska, A.E., Ellington, A.D., 2006, Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets. *Anal. Chim. Acta.*, 564, 82-90.
- Choi, J.H., Chen, K.H. and Strano, M.S., 2006, Aptamer-Capped Nanocrystal Quantum Dots: A New Method for Label-Free Protein Detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 12, 15584-15585.
- Clark, S.L. and Remcho, V.T., 2002, Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 23, 1335-1340.
- Conroy, J., Hearty, S., Leonard, P., O'Kennedy, R.J., 2009, Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 10-26.
- Çökeliler, D., 2006, Afla Toksin Tayini İçin Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Kütle Hassas İmmunosensör Hazırlanması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 121s.
- Deisingh, A.K., 2006, Aptamer-based biosensors: biomedical applications. *Handbook Exp. Pharmacol.*, 173, 341-357.
- Drolet, D.W., Jenison, R.D., Smith, D.E., Pratt, D., Hicke, B.J., 1999, A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 5, 271-278.
- Eaton, B.E., Gold, L., Hicke, B.J., Janjić, N., Jucker, F.M., Sebesta, D.P., Tarasow, T.M., Willis, M.C., Zichi, D.A., 1997, Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 1087-1096.
- Ellington, A.D. and Szostak, J.W., 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822.
- Feig, A.L., 2007, Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics. *Biopolymers*, 87, 293-301.
- Fischer, N.O., Tarasow, T.M. and Tok, J.B., 2007, Aptasensors for biosecurity applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11, 316-328.
- Flosch, D., Clarotti, G., Geckeler, K. E., Schue, F., Gopel, W., 1992, Characterization of plasma-treated poly (hydroxybutyrate) membrane surfaces by ESCA and contact angle measurements, *Journal of Membrane Science*, 73, 163-172.
- Geiger, A., Burgstaller, P., Von der Eitz, H., Roeder, A., Famulok, M., 1996, RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1029-1036.
- German, I., Buchanan, D.D. and Kennedy, R.T., 1998, Aptamers as Ligands in Affinity Probe Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 70, 4540-4545.

- Gold, L., 1996, Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J. Biol. Chem.*, 270,13581-13584.
- Gong, P., Lee, CY., Gamble, LJ., Castner, DG., Grainger, DW., 2006, Hybridization behavior of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by surface plasmon resonance and <sup>32</sup>P radiometric assay. *Anal. Chem.*, 78, 3326-3334.
- Gopinath, SC., 2007, Methods developed for SELEX. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 171-182.
- Gronewold, TMA., Glass, S., Quandt, E., Famulok, M., 2005, Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2044-2052.
- Ha, T. H., Kim, S., Lim, G., Kim, K., 2004, Influence of liquid medium and surface morphology on the response of QCM during immobilization and hybridization of short oligonucleotides. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 378-389.
- Hansen, JA., Wang, J., Kawde, AN., Xiang, Y., Gothelf, KV., Collins, G., 2006, Quantum-Dot/Aptamer-Based Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2228-2229.
- Heegaard, NHH., 2003, Applications of affinity interactions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, 3879-3891.
- Hermanson, GT., 1996, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, New York.
- Hianik, T., Ostatná, V., Zajacová, Z., Stoikova, E., Evtugyn, G., 2005, Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 291-295.
- Ho, HA. and Leclerc, M., 2004, Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1384-1387.
- Ho, HA., Béra-Abérem, M. and Leclerc, M., 2005, Optical sensors based on hybrid DNA/conjugated polymer complexes. *Chem. Eur. J.*, 11, 1718-1724.
- Holeman, LA., Robinson, SL., Szostak, JW., Wilson, C., 1998, Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold. Des.*, 3, 423-431.
- Huang, C-C., Cao, Z., Chang, H-T., Tan, W., 2004, Protein-protein interaction studies based on molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 76, 6973-6981.
- Huang, CC., Huang, YF., Cao, Z., Tan, W., Chang, HT., 2005, Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors. *Anal. Chem.*, 77, 5735-5741.

- Hurst, S.J., Lytton-Jean, A.K.R. and Mirkin, C.A., 2006, Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.*, 78, 8313-8318.
- Inagaki, N., Kishi, A., Katsuura, K., 1982, Surface properties of polymers prepared from trimethylsilyldimethyl-amine and hexamethyldisilazane by glow discharge polymerization, *Int. J. Adhesion and Adhesives*, 233-238.
- James, W., 2001, Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1, 540-546.
- Jayasena, S.D., 1999, Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, 45, 1628-1650.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., 1994, High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263, 1425-1429.
- Jiang, Y., Zhu, C., Ling, L., Wan, L., Fang, X., Bai, C., 2003, Specific aptamer-protein interaction studied by atomic force microscopy. *Anal. Chem.*, 75, 2112-2116.
- Jouan, P., Peignon, M., Cardinaud, Ch., Lemperiere, G., 1993, Characterisation of TiN coatings and of the TiN/Si interface by X-ray photoelectron spectroscopy and Auger electron spectroscopy. *Applied surface science*, 68, 595-603.
- Kaminska, A., Kaczmarek, H., Kowalonek, J., 2002, The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action, *European Polymer Journal*, 38, 1915-1919.
- Keefe, A.D. and Cload, S.T., 2008, SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 448-456.
- Kimura-Suda, H., Petrovykh, D.Y., Tarlov, M.J., Whitman, L.J., 2003, Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9014-9015.
- Klussmann, S., 2006, *The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, Weinheim.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A., Fürste, J.P., 1996, Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1112-1115.
- Koutny, L.B., Schmalzing, D., Taylor, T.A., Fuchs, M., 1996, Microchip Electrophoretic Immunoassay for Serum Cortisol. *Anal. Chem.* 68, 18-22.
- Kusser, W., 2000, Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J. Biotechnol.*, 74, 27-38.
- Lee, C.Y., Harbers, G.M., Grainger, D.W., Gamble, L.J., Castner, D.G., 2007, Fluorescence, XPS, and TOF-SIMS surface chemical state image analysis of DNA microarrays. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 9429-9438.

- Lee, M. and Walt, DR., 2000, A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamers as Receptors. *Analytical Biochemistry*. 282, 142-146.
- Leung, A., Shankar, P.M., Mutharasan, R., 2007, A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 125, 688-703.
- Li, R., Ya, L., Mai, YW., 1997, Application of plasma technologies in fibre-reinforced polymer composites: a review of recent developments, *Composites Part A*, 28A, 73-86.
- Lim, DV., Simpson, JM., Kearns, EA., Kramer, MF., 2005, Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 583-607.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. and Prohaska, E., 2002, An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem.*, 74, 4488-4495.
- Mairal, T., Ozalp, VC., Lozano Sánchez, P., Mir, M., Katakis, I., O'Sullivan, CK., 2008, Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, Feb;390, 989-1007.
- Marshall, KA. and Ellington, AD., 2000, In vitro selection of RNA aptamers. *Methods Enzymol.*, 318, 193-214.
- Mendonça, SD. and Bowser, MT., 2004, In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 20-21.
- Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., Peyrin, E., 2003, A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8672-8679.
- MicroCal, LLC., 2004, ITC Data Analysis in Origin. Northampton, Massachusetts.
- Minunni, M., Tombelli, S., Gullotto, A., Luzi, E., Mascini, M., 2004, Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein. *Biosens. Bioelectron.*, 20, 1149-1156.
- Mutlu., S, Alp, B., Özmelles, R.S., Mutlu, M., 1997, Amperometric Determination of Enzymatic Activity by Multienzyme Biosensors, *J. Food Engineering*, 33, 81-86.
- Nallagatla, SR., Heuberger, B., Haque, A., Switzer, C., 2009, Combinatorial synthesis of thrombin-binding aptamers containing iso-guanine. *J. Comb. Chem.*, 11, 364-369.
- Nimjee, SM., Rusconi, CP. and Sullenger, BA., 2005, Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.*, 56, 555-583.
- Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, VA., Fürste, JP., Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1116-1119.

- Paborsky, LR., McCurdy, SN., Griffin, LC., Toole, JJ., Leung, LL., 1993, The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J. Biol. Chem.*, 268, 20808-20811.
- Padmanabhan, K. and Tulinsky, A., 1996, An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 52, 272-282.
- Padmanabhan, K., Padmanabhan, KP., Ferrara, JD., Sadler JE., Tulinsky, A., 1993, The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J. Biol. Chem.*, 268, 17651-17654.
- Pagano, B., Martino, L., Randazzo, A., Giancola, C., 2008, Stability and binding properties of a modified thrombin binding aptamer. *Biophys. J.*, 94, 562-569.
- Patel, DJ., Suri, AK., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar. RA., Nonin, S., 1997, Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J. Mol. Biol.*, 272, 645-664.
- Pavlov, V., Xiao, Y., Shlyahovsky, B., Willner, I., 2004, Aptamer-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Optical Detection of Thrombin. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 11768-11769.
- Potyrailo, RA., Conrad, RC., Ellington, AD., Hieftje, GM., 1998, Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors. *Analytical Chemistry*, 70, 3419-3425.
- Rats, D., Vandenbulcke, L., Herbin R., Benoit, R., Erre, R., Serin, V., Sevely, J., 1995, Characterization of diamond films deposited on titanium and its alloys. *Thin Solid Films*, 270, 177-183,
- Ravelet, C., Grosset, C. and Peyrin, E., 2006, Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers. *J. Chromatogr. A.*, 1117,1-10.
- Robertson, DL. and Joyce GF., 1990, Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 344, 467-468.
- Salim, NN. and Feig, AL., 2009, Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods*, 47, 198-205.
- Sanderson, RI., 1976, Chemical bonds and bond energy. Academic Press, New York.
- Sanderson, RI., 1983, Polar covalence. Academic Press, New York.
- Saurbery, GA., 1959, Use a quartz vibrator from weight thin films on a microbalance. *Z. Physik.*, 155, 206-210.
- Scatchard, G., 1949, The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660-672.

- So, HM., Won, K., Kim, YH., Kim, BK., Ryu, BH., Na, PS., Kim, H., Lee, JO., 2005, Single-Walled Carbon Nanotube Biosensors Using Aptamers as Molecular Recognition Elements. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 11906-11907.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., Zhao, J., 2008, Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 108-117.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B., 2007, SELEX - a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.*, 24, 381-403.
- Su, S., Nutiu, R., Filipe, CD., Li, Y., Pelton, R., 2007, Adsorption and covalent coupling of ATP-binding DNA aptamers onto cellulose. *Langmuir*, 23, 1300-1302.
- Tasset, DM., Kubik, MF. and Steiner, W., 1997, Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.*, 272, 688-698.
- Thevenot, DR., Toth, K., Durst, RA., Wilson, GS., 1999, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Apl. Chem.*, 71, 2333-2348.
- Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M., 2005, Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, 20, 2424-2234.
- Tsiang, M., Jain, AK., Dunn, KE., Rojas ME., Leung LL., Gibbs, GS., 1995, Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J. Biol. Chem.*, 270, 16854-16863.
- Tuerk, C. and Gold, L., 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510.
- Tusek, L., Nitschke, M., Werner, C., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V., 2001, Surface characterisation of NH<sub>3</sub> plasma treated polyamide 6 foils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195, 81-95.
- Uphoff, KW., Bell, SD. and Ellington, AD., 1996, In vitro selection of aptamers: the dearth of pure reason. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 281-288.
- Wilson, DS. and Szostak, JW., 1999, In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 611-647.
- Win, MN., Klein, JS., Smolke, CD., 2006, Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay. *Nucleic Acids Res.*, 34, 5670-5682.
- Wittmann, C., 2005, *Topics in current chemistry*, vol 260. Immobilisation of DNA on chips I. Springer, New York.
- Wittmann, C., 2006, *Topics in current chemistry*, vol 261. Immobilisation of DNA on chips II. Springer, New York.

- Wu, Q., Tsiang, M. and Sadler, J.E., 1992, Localization of the singlestranded DNA binding site in the thrombin anion-binding exosite. *J. Biol. Chem.*, 267, 24408-24412.
- Xiao, Y., Lubin, A.A., Heeger, A.J., Plaxco, K.W., 2005, Electrochemical Detection of Protein Using a Double Aptamer Sandwich. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 5456-5459.
- Yasuda, H., 1984, Plasma polymerization for protective coatings and composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 18, 273-284.
- Zhan, L.S., Shao, N.S., Peng, J.C., Sun, H.Y., Wang, Q.L., 2003, A procedure for SELEX screening aptamers from ssDNA random library. *Prog. Biochem. Biophys.*, 30, 151-155.
- Zuker, M., 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3406-3415.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ozan Selvi

Doğum Yeri : Adana

Doğum Yılı : 19.12.1979

Medeni Hali : Bekâr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1994-1997 Ankara Atatürk Anadolu Lisesi

Lisans 1998-2001 Başkent Üniversitesi Endüstri Mühendisliği Bölümü

Lisans 2002-2006 Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2006-2007 Hacettepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2006-2007 Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik A.B.D.

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2007-2009 Proje Yöneticisi, RNA ART