



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**MADDE BAĞIMLILIĞINDA ROL OYNAYAN FOS
AİLESİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN DNA
APTAMERLERİ İLE HEDEFLENMESİ**

Doktora Tezi

Özge UĞURLU

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**MADDE BAĞIMLILIĞINDA ROL OYNAYAN FOS
AİLESİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN DNA
APTAMERLERİ İLE HEDEFLENMESİ**

Özge UĞURLU

Danışman: Prof. Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Doktora Programı

İzmir

2023

KABUL ONAY SAYFASI

Özge UĞURLU tarafından **Doktora** tezi olarak sunulan “**Madde bağımlılığında rol oynayan Fos ailesi transkripsiyon faktörlerinin DNA aptamerleri ile hedeflenmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14/07/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Serap EVRAN
Raportör Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Canan ÖZYURT
Üye	: Prof. Dr. Suna TİMUR
Üye	: Prof. Dr. Zeki TOPÇU
Üye	: Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Madde bağımlılığında rol oynayan Fos ailesi transkripsiyon faktörlerinin DNA aptamerleri ile hedeflenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14/07/2023

İmzası

Özge UĞURLU



ÖZET**MADDE BAĞIMLILIĞINDA ROL OYNAYAN FOS AİLESİ
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN DNA APTAMERLERİ İLE
HEDEFLENMESİ**

UĞURLU, Özge

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap EVRAN

Temmuz 2023, 119 sayfa

Bağımlılık, beyindeki gen ekspresyon düzeyinin değişmesiyle ilişkilendirilmektedir. Spesifik genlerin düzenleyici bölgelerine bağlanarak gen ekspresyon seviyelerini kontrol eden transkripsiyon faktörleri, bu sayede bağımlılık sürecinde transkripsiyonel yollar aracılığıyla aktif rol alırlar. Fos ailesi proteinleri madde bağımlılığı ile ilişkilendirilmiş ve en kapsamlı şekilde araştırılmış transkripsiyon faktörlerindedir. Bu nedenle, Fos proteini içeren AP-1 kompleksi, özellikle beyindeki ödül mekanizmasının düzenlenmesindeki işlevi nedeniyle önemli bir hedefdir.

Bu doktora tezi kapsamında, c-Fos ve FosB proteinlerine spesifik olarak ve yüksek afinite ile bağlanan, protein-protein etkileşim bölgesini bloke eden ve AP-1 kompleksi oluşumunu inhibe eden DNA aptamerlerinin SELEX yöntemi ile geliştirilmesi hedeflendi. İlk olarak, FosB ve c-Fos transkripsiyon faktörlerinin Jun proteini ile heterodimer oluşturmasında rol oynayan bZIP domainleri, *Escherichia coli* hücrelerinde rekombinant olarak üretildi ve saflaştırıldı. Daha sonra, manyetik boncuk tabanlı SELEX teknolojisi kullanılarak FosB ve c-Fos'un bZIP domainleri için DNA aptamerlerini geliştirildi. SELEX turlarının ardından, zenginleştirilmiş DNA aptamerleri, NGS ile tanımlandı. Aday aptamerlerin bağlanma afinitesini (K_d) karakterize etmek için de ITC yöntemi kullanıldı. Buna göre, FosB'ye en iyi afinite gösteren iki aday aptamerin FosBApt_1 ve FosBApt_13 aptamerlerin K_d değeri sırasıyla 727 nM ve 634 nM olarak belirlendi. Ayrıca, c-Fos'a en iyi afinite gösteren cfosApt_1 ve cfosApt_2 aptamerlerin K_d değeri sırasıyla 302 nM ve 390 nM olarak belirlendi.

Hedeflerine en iyi afinite ile bağlanan DNA aptamerlerinin AP-1 kompleks üzerindeki inhibisyon etkisinin deneysel olarak doğrulanması için iki yöntem kullanıldı. FosBApt_1'in FosB:JunD protein kompleks oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi amacı ile His-tag pull-down assay yöntemi kullanılırken, cfosApt_2'nin c-Fos:MafB/c-Jun etkileşimleri üzerindeki inhibisyon etkisi içinse kolorimetrik analiz gerçekleştirildi. Her iki yöntem ile belirlenen inhibisyon yüzdesi, aptamer konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Son olarak, FosBApt_1 ve cfosApt_2 aptamerleri ayrı ayrı U-87 MG insan glioblastoma hücre hattına transfeksiyon ajanı yardımı ile uygulandı ve hücre morfolojisi ile hücre miktarındaki değişimler belirlendi. Kontrol aptamer ile karşılaştırıldığında, FosBApt_1 aptamerinin hem hücre canlılığında azalmaya hem de hücre morfolojide farklanmaya yol açtığı gösterildi. Bu farklanmalar, FosBApt_1 aptamerinin hedefine bağlanarak hücresel yanıtı açtığını göstermektedir. cfosApt_2 için kontrol aptamer ile karşılaştırıldığında, canlılık sonuçlarında anlamlı bir farklanma görünmemesine rağmen morfolojik değişimler gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Madde bağımlılığı, FosB, c-Fos, Transkripsiyon Faktörü, AP-1 kompleks, Aptamer, SELEX

ABSTRACT**TARGETING OF FOS FAMILY TRANSCRIPTION FACTORS
PLAYING ROLE IN DRUG ADDICTION WITH DNA APTAMERS**

UĞURLU, Özge

PhD in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Serap EVRAN

July 2023, 119 pages

Addiction is associated with changes in the level of gene expression in the brain. Transcription factors, which control gene expression levels by binding to the regulatory regions of specific genes, take an active role in the addiction process through transcriptional pathways. Fos family proteins have been associated with substance abuse and are among the most extensively studied transcription factors. Therefore, the AP-1 complex containing the Fos protein is an important target, particularly because it regulates the brain's reward mechanism.

In this doctoral thesis, it was aimed to develop DNA aptamers that bind to c-Fos and FosB proteins specifically and with high affinity, block the protein-protein interaction region and inhibit the formation of AP-1 complex by SELEX method. First, bZIP domains of FosB and c-Fos transcription factors, predominantly involved in heterodimer formation with Jun protein were produced recombinantly in *Escherichia coli* and purified. Subsequently, DNA aptamers were developed for the bZIP domains of FosB and c-Fos using magnetic bead-based SELEX technology. Following SELEX rounds, enriched DNA aptamers were identified by NGS. The ITC method was also used to characterize the binding affinity (K_d) of candidate aptamers. The K_d values of the two candidate aptamers FosBApt_1 and FosBApt_13 aptamers with the best affinity for FosB were determined as 727 nM and 634 nM, respectively. The K_d values of cfosApt_1 and cfosApt_2 aptamers with the best affinity for c-Fos were determined as 302 nM and 390 nM, respectively.

Two methods were used to experimentally confirm the inhibition effect of DNA aptamers that bind to their targets with the best affinity on the AP-1 complex. While the His-tag pull-down assay method was used on the inhibition effect of FosBApt_1 on FosB:JunD protein complex formation, colorimetric analysis was performed for the inhibition effect of cfosApt_2 on c-Fos:MafB/c-Jun interactions. Percent inhibition determined by both methods was plotted against aptamer concentration. Finally, FosBApt_1 and cfosApt_2 aptamers were applied separately to the U-87 MG human glioblastoma cell line with the help of a transfection agent, and changes in cell morphology and cell count were observed. Compared to the control aptamer, FosBApt_1 aptamer was shown to cause both a decrease in cell viability and differentiation in cellular morphology. This differentiation indicates that the FosBApt_1 aptamer binds to its target, leading to a cellular response. For cfosApt_2, morphological changes were observed when compared to the control aptamer, although no significant difference was observed in the viability results.

Keywords: Drug addiction, FosB, c-Fos, Transcription Factor, AP-1 complex, Aptamer, SELEX

ÖNSÖZ

“Madde bağımlılığında rol oynayan Fos ailesi transkripsiyon faktörlerinin DNA aptamerleri ile hedeflenmesi” başlıklı tezim kapsamında özellikle c-Fos ve FosB proteinlerinin bZIP domainleri hedeflenerek protein etkileşimlerini inhibe eden ve AP-1 kompleks oluşumunu bloke eden DNA aptamerlerinin geliştirilmesi süreci başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bağımlılığın gelişimde önemli rol oynadığı bilinen Fos ailesi transkripsiyon faktörlerine karşı geliştirilen bu DNA aptamerlerinin madde bağımlılığının etkilerinin tedavisinde ve tanısında kullanılmak üzere aptamer temelli yeni stratejilerin geliştirilmesi konusunda literatüre katkı sağlayacağını da şüphesizdir.

Zorlu bir süreç olan doktora eğitimim boyunca mutfağın her aşamasında tecrübe kazanma ve deneyim edinme fırsatını sağlayan sayın danışmanın Prof. Dr. Serap EVRAN’ın katkıları tartışılmaz. Bu süreç, bana ilk günden itibaren akademik hayatımda emin adımlarla ilerlememde büyük katkı sağladı. Doktora eğitimim tamamlandıktan sonra da edindiğim tecrübe ve bilgi donanımı ışığında aynı disiplin ve kararlılıkla akademik hayatıma devam edeceğim.

İZMİR

14/07/2023

Özge UĞURLU



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Madde Bağımlılığı	4
2.2 Transkripsiyon Faktörleri ve Madde bağımlılığı	5
2.3 CREB (cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein).....	6
2.4 Fos Ailesi Transkripsiyon Faktörleri	8
2.4.1 c-Fos ve diğer fos ailesi üyeleri	9
2.4.2 Δ FosB	10
2.5 Nükleik Asit Aptamerleri ve <i>in vitro</i> SELEX Yöntemi.....	14
2.5.1 Manyetik boncuk tabanlı SELEX	18
2.6 Aptamerler: Potansiyel Terapötik Ajanlar	19
2.7 Aptamerler: Hedef Olarak Transkripsiyon Faktörleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1 Proteinleri Kodlayan Genlerin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	23
3.1.1 DNA fragmentlerinin standart PCR ile amplifikasyonu.....	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2 DNA fragmentlerin restriksiyon endonükleazları ile kesimi	24
3.1.3 Agaroz jel elektroforezi	24
3.1.4 Ligasyon.....	25
3.1.5 Kimyasal kompetent <i>E.coli</i> hücrelerin hazırlanması	25
3.1.6 Transformasyon	26
3.1.7 Koloni PCR.....	26
3.1.8 Sanger sekans analizi	27
3.2 Proteinlerin Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması.....	27
3.2.1 Test ekspresyonu.....	27
3.2.2 Trisin-SDS-PAGE.....	28
3.2.3 Büyük ölçekli üretim.....	29
3.2.4 Metal şelat afinite kromatografisi	30
3.3 SELEX ile Hedef Spesifik DNA Aptamerlerinin Geliştirilmesi	30
3.3.1 Rekombinant proteinlerin Co-NTA manyetik agaroz boncuklara non-kovalent immobilizasyonu	30
3.3.2 <i>In vitro</i> spesifik DNA aptamerlerinin seçimi	31
3.3.3 Lambda ekzonükleaz ile ssDNA eldesi	32
3.3.4 Yeni-nesil sekanslama (NGS)	33
3.3.5 Aptamer dizilerinin analizi.....	34
3.4 Aptamerin Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi.....	34
3.4.1 İzotermal titrasyon kalorimetresi (ITC)	35
3.4.2 Elektroforetik mobilite shift assay (EMSA)	35
3.5 Aptamerin İnhibisyon Düzeylerinin Belirlenmesi	36
3.5.1 6xHis-etiketli protein pull-down assay	36
3.5.2 Ni-NTA manyetik agaroz boncuk temelli kolorimetrik analiz	37

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6 Aptamerlerin Hücre ile Etkileşiminin İncelenmesi	38
3.6.1 Hücre Kültürü ve Örneklerin Hazırlanması.....	38
3.6.2 Hücre İçi Aptamer Alımı	39
3.6.3 SRB Canlılık Testi.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1 Proteinleri Kodlayan Genlerin pET-21a(+) Vektörüne Klonlanması.....	41
4.1.1 FosB ve JunD proteinleri kodlayan genlerin pet21a(+) vektörüne klonlanması.....	41
4.1.2 c-Fos proteini kodlayan genlerin pET-21a(+) vektörüne klonlanması.....	43
4.1.3 pET-21a(+) ekspresyon vektörüne klonlanan genlerin dizi analizleri.....	45
4.2 Proteinlerin Büyük Ölçekli Üretimi ve Saflaştırılması.....	45
4.2.1 c-Fos, FosB ve JunD proteinlerinin büyük ölçekli üretimi ve saflaştırılması	45
4.3 <i>In vitro</i> Seçim	48
4.3.1 FosB proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve <i>in vitro</i> seçimi	48
4.3.2 c-Fos proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve <i>in vitro</i> seçimi	51
4.3.3 Tam uzunluktaki c-Fos proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve <i>in vitro</i> seçimi	53
4.4 Zenginleşen Aptamer Dizilerinin Belirlenmesi ve Dizi Analizi.....	56
4.4.1 FosB'ye spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi	56
4.4.2 c-Fos'ye spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi.....	61
4.4.3 Tam uzunluktaki c-Fos'a spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi	65
4.5 Aptamerlerin Bağlanma Afiniteilerinin Belirlenmesi.....	70
4.5.1 FosB için belirlenen aptamerlerin bağlanma afiniteilerinin belirlenmesi	70

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5.2 c-Fos için belirlenen aptamerlerin bağlanma afiniteilerinin belirlenmesi	75
4.6 Aptamerlerin Protein-Protein Etkileşimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi	78
4.6.1 Aptamerin FosB:JunD etkileşimi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi.....	78
4.6.2 Aptamerin c-Fos'un protein etkileşimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi.....	80
4.7 Aptamerlerin Hücre Canlılığına Etkisi ve Hücre İçine Alımı	82
4.7.1 Aptamer alımı	82
4.7.2 Aptamerlerin Hücre Canlılığına Etkisi	83
5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	85
KAYNAKLAR DİZİNİ	89
TEŞEKKÜR.....	115
ÖZGEÇMİŞ	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 AP-1 proteinlerinin dizileri ve yapıları.....	8
2.2 Fos ailesi proteinlerinin, akut bir uyararla nöronlardaki indüksiyon seviyelerinin zamansal özellikleri.....	10
2.3 Δ FosB'nin FosB'den farkının ve benzersiz stabilitesinin biyokimyasal temeli.....	11
2.4 Δ FosB'nin tekrarlanan uyarılarla nöronlardaki indüksiyon seviyelerinin zamansal özellikleri.....	12
2.5 Aptamerin spesifik bir üç boyutlu yapı oluşumuna bağlı olarak hedefine bağlanmasının şematik gösterimi.....	14
2.6 SELEX yönteminin akış şeması.....	17
3.1 FosB (153-219. amino asitler), JunD (266-332. amino asitler) ve c-Fos (139-193. amino asitler) bZIP domaini.....	23
3.2 FosB:JunD kompleks oluşumunun inhibisyonun doğrulanması amacı ile gerçekleştirilen pull-down assay şematik gösterimi.....	36
3.3 c-fos ile c-Jun/MafB kompleks oluşumunun inhibisyonuna ilişkin kolorimetrik analizin şematik gösterimi.....	38
4.1 JunD ve FosB proteinlerini kodlayan gen fragmentlerinin gradient PCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	41
4.2 Restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş pET-21a(+) vektörü.....	42
4.3 Rastgele seçilen koloniler için uygulanan koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/ <i>fosB</i> içerdiği belirlenen koloniler.....	42
4.4 Koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/ <i>junD</i> içerdiği belirlenen koloniler.....	43
4.5 c-Fos proteinini kodlayan gen fragmentlerinin gradient PCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	43
4.6 pET-21a(+) vektörü ve c-Fos DNA fragmentlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasındaki agaroz jel görüntüsü.....	44
4.7 Koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/ <i>c-fos</i> içerdiği belirlenen koloniler.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 c-Fos, FosB ve JunD proteinlerini kodlayan genleri içeren pET-21a(+) vektörünün <i>BamHI</i> ve <i>XhoI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü.....	45
4.9 FosB (A) ve JunD (B) IMAC ile saflaştırılmasına ilişkin kromatogram.	46
4.10 FosB ve JunD proteinlerinin Trisin-SDS-PAGE görüntüsü.	47
4.11 c-Fos IMAC ile saflaştırılmasına ilişkin kromatogram.	47
4.12 c-Fos proteininin Trisin-SDS-PAGE görüntüsü.	47
4.13 FosB proteinine ilişkin her bir SELEX turu sonucunda PCR ile elde edilen dsDNA'nın agaroz jel görüntüleri.....	49
4.14 FosB proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA agaroz jel görüntüsü.	50
4.15 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonucunda PCR ile elde edilen dsDNA'nın agaroz jel görüntüleri.....	53
4.16 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA'nın agaroz jel görüntüsü.	53
4.17 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında PCR ile elde edilen dsDNA'nın agaroz jel görüntüleri.	55
4.18 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA'nın agaroz jel görüntüsü.	56
4.19 FosB için gerçekleştirilen SELEX sonrası R9 aptamer kütüphanesinde en sık tekrar eden 50 aptamerin motif analiz sonucu.	56
4.20 R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi eşleştirmesi.	57
4.21 R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç.....	58
4.22 FosB'ye spesifik seçilen 6 aptamerin R2, R5, R7 ve R9 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.....	59
4.23 FosB için zenginleşen altı adet aptamerin sekonder yapıları.	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.24 c-Fos için gerçekleştirilen SELEX sonrası R5 aptamer kütüphanesinde en sık tekrar eden 50 aptamerin motif analiz sonucu.	61
4.25 R5 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi eşleştirmesi.	62
4.26 R5 kütüphanesinin en popüler 50 aptameri için filogenetik ağaç.	63
4.27 c-Fos için zenginleşen altı aptamerin R1, R2, R4 ve R5 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.	63
4.28 c-Fos için aday altı aptamerin sekonder yapıları.	65
4.29 Tam uzunluktaki c-Fos için gerçekleştirilen SELEX sonrası R13 aptamer kütüphanesinde en sık tekrar eden 50 aptamerin motif analiz sonucu.	66
4.30 R13 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi eşleştirmesi.	67
4.31 R13 kütüphanesinin en popüler 50 aptameri için filogenetik ağaç.	68
4.32 Tam uzunluktaki c-Fos için seçilen altı aptamerin R1, R8, R10 ve R13 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.	68
4.33 Tam uzunluktaki c-Fos için aday altı aptamerin sekonder yapıları.	70
4.34 Farklı konsantrasyonlarda FosB'nin etiketsiz FosBApt_1 veya FosBApt_3 (125nM) aptamerleri ile inkübasyonu sonrasında elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü.	71
4.35 Tampon (A) ve aptamerin (B) kör ITC ölçümleri.	72
4.36 FosBApt_1'in FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.	73
4.37 FosBApt_1'in FosB ile etkileşimine ilişkin 37 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.	73
4.38 FosBApt_3'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 37 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.	74
4.39 FosBApt_3'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.	74
4.40 FosBApt_13'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.	75

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.41 cfosApt_2/Apt_3'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.....	76
4.42 cfosApt_1/Apt_5'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.....	76
4.43 cfosApt_11'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.....	77
4.44 cfosApt_19'un c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.....	77
4.45 Apt_1'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.....	78
4.46 FosBApt_1 aptamerin farklı konsantrasyonları varlığında gerçekleştirilen pull-down assay sonrasında FosB:JunD kompleksine ilişkin Trisin-SDS-PAGE görüntüsü.....	79
4.47 FosBApt_1 aptamerinin farklı konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği.....	79
4.48 Aptamer konsantrasyonunun FosB:JunD etkileşimi üzerine etkisini gösteren yüzde inhibisyon grafiği.....	80
4.49 c-Fos:MafB protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.....	81
4.50 Tam uzunluktaki c-Fos:MafB protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.....	81
4.51 Tam uzunluktaki c-Fos:c-Jun protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.....	82
4.52 DAPI ve FAM/ FosBApt_1 uygulanmış U-87 MG hücrelerine ait epifloresans görüntüsü.....	82
4.53 cfosApt_2/Apt_3(c-Fos) ve FosBApt_1 (FosB) aptamerlerin U-87 MG hücre canlılığına 48 saatlik etkisi.....	83
4.54 SRB ile boyalı hücrelerin morfolojik incelenmesi.....	84

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1 Bağımlılık yapan ilaçlar.....	5
2.2 Nükleik asit aptamerleri ile monoklonal antikorların karşılaştırılması.	16
3.1 %16 Trisin-SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan kimyasalların oranları.	28
3.2 PCR reaktif içeriği.	32
4.1 FosB proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.	49
4.2 FosB proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.	50
4.3 c-Fos proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.	52
4.4 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.	52
4.5 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.	54
4.6 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.	55
4.7 NGS sonucunda elde edilen ve FosB'ye spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi.....	59
4.8 FosB için zenginleşen altı aptamerin arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler.	61
4.9 NGS sonucunda elde edilen ve c-Fos'a spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi.....	64
4.10 c-Fos için zenginleşen altı aptamer arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler.	65
4.11 NGS sonucunda elde edilen ve tam uzunluktaki c-Fos'a spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi.	69
4.12 Tam uzunluktaki c-Fos için zenginleşen altı aptamer arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler..	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

bp	Baz çifti
°C	Derece Celcius
dk	Dakika
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
pmol	Pikomol
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
U	Unit
V	Volt
rpm	devir/dakika

Kısaltmalar

AP-1	Aktivatör protein-1
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ssDNA	Tek zincirli DNA
dsDNA	Çift zincirli DNA
dNTP	Deoksiribonükleotit fosfat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Trisin-SDS-PAGE	Trisin Sodyum dedosil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
APS	Amonyum persülfat
TCEP	Tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DAPI	Diamino-2-fenilindol
FBS	Fetal sığır serumu
SRB	Sulforhodamine B Testi
ITC	İzotermal Titrasyon Kalorimetrisi
EMSA	Elektroforetik mobilite shift assay
NGS	Yeni nesil sekanslama
NAC	Nükleus akumbens

1. GİRİŞ

Bağımlılık, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan karmaşık bir davranış bozukluğudur (Morrow and Flagel, 2016). Bağımlılık, zorunlu madde kullanımı ile karakterize edilen ve bireylerin yoğun uyuşturucu özlemi gösterdiği, yıllarca yoksunluktan sonra bile tekrarlama riskinin arttığı ve yaşam boyu sürme potansiyeline sahip kronik bir hastalıktır. Bu durum, bağımlılığın beyinde uzun ömürlü davranışsal anormalliklerden sorumlu olan son derece kararlı değişiklikleri içerdiği anlamına gelmektedir (Nestler, 2005; Nestler, 2001; Berke and Hyman, 2000).

Bağımlılık, toplum üzerinde muazzam bir oranda hem insani ve hem de mali maliyetlere neden olmaya devam ederken mevcut tedaviler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (Nestler, 2001). Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2021) verilerine göre, 2019 yılında, dünya çapında yaklaşık 275 milyon kişi (15-64 yaş arası dünya nüfusunun %5,5'i) en az bir kez uyuşturucu madde kullanmıştır. 2019'da dünya çapında yaklaşık 36,3 milyon kişi uyuşturucu madde kullanım bozukluğu yaşamış ve yaklaşık 0,5 milyon ölüm uyuşturucu kullanıma bağlanmıştır.

Madde bağımlılığının biyolojik temelini daha iyi anlaşılması, nihayetinde daha etkili tedavi stratejilerinin ve önleyici tedbirlerin ortaya konulmasını sağlayacaktır. Bu yüzden de bağımlılıkla ilişkili uzun süreli davranışsal plastisitenin altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, daha etkili tedavilerin ve önleyici tedbirlerin ortaya çıkmasına katkıda bulunacaktır.

Kötüye kullanılan ilaçlara maruz kalma, beyinde kısa ve uzun vadeli adaptif değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişikliklerin birçoğunun da gen ifadesinin düzenlenmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, madde bağımlılığının altında yatan moleküler mekanizmalar hala anlaşılammıştır. Gen ekspresyonu, transkripsiyon faktörleri olarak bilinen belirli DNA dizilerini bağlayan proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bu yüzden de transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonunu düzenleyerek bağımlılık mekanizmasında önemli rol oynadığı da öne sürülmektedir.

Çok sayıda farklı transkripsiyon faktörü bulunmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda özellikle Δ FosB ve CREB'nin bağımlılık ile ilişkili nöroplastisiteye dahil edilmektedir. Ek olarak, literatürdeki bir çalışmada, kısa süreli (5 günlük) kokain kullanımı ile kısa süreli Δ FosB (1-2 hafta) ve CREB ifadesinin aynı genlerin birçoğunu düzenlediği, daha uzun süreli (4 haftalık) kokain kullanımının ise uzun süreli Δ FosB (4-8 hafta) tarafından düzenlenen genlerin daha fazlasını indüklediği gösterilmiştir (McClung and Nestler, 2003). Bu durum, Δ FosB'nin, kronik kokain kullanımının bir sonucu olarak meydana gelen gen ekspresyonundaki değişikliklere aracılık etmede daha baskın bir rol oynadığını desteklemektedir. Ayrıca, diğer Fos ailesi proteinleri (c-Fos, Fra-1, Fra-2), kötüye kullanılan maddelerin akut uygulanmasından sonra belirli beyin bölgelerinde hızla ve geçici olarak uyarılırken, Δ FosB isoformları, stabilitesinin yüksek olmasından dolayı bağımlılık yapıcı maddeye maruz kaldıktan sonra bile en az birkaç hafta daha nöronlarda kalmaya devam eder. Sonuç olarak, Δ FosB izoformlarının bu stabilitesi, madde alımından nispeten uzun süre geçmiş olmasına rağmen, gen ekspresyonundaki değişim mekanizmasını desteklemeye devam etmektedir (Larson et al., 2010; Nestler, 2008).

Bu doktora tezi kapsamında bağımlılıkta etkin hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan ve Jun:Fos heterodimeri oluşturan AP-1 transkripsiyon faktörüne odaklanıldı. Öncelikle, c-Fos ve FosB proteinlerinin bZIP domainlerinin rekombinant üretimi *Escherichia coli* hücrelerinde gerçekleştirildi. Ardından, FosB ve c-Fos proteinlerinin bZIP domainleri için ayrı ayrı manyetik boncuk tabanlı SELEX (Ligandların Üstel Zenginleştirme ile Sistemik Evrimi) teknolojisi kullanılarak yüksek afiniteye sahip DNA aptamerleri geliştirildi. SELEX sonrası, zenginleşen DNA aptamerleri belirlendikten sonra bağlanma afinitelerinin (K_d) ölçümü için izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) kullanıldı. Seçilen hedef-spesifik aptamerlerin K_d ölçümleri tamamlandıktan sonra belirlenen aptamerlerin c-Fos ve FosB proteinlerinin sırasıyla c-Jun/MafB ve JunD partnerleri ile olan etkileşimleri üzerindeki inhibisyon etkisi belirlendi. Son olarak da seçilen aptamerler, U-87 MG hücre kültürüne uygulanarak hücre içi girişi, canlılıktaki değişim ve hücre morfolojisi üzerine etkileri incelendi.

Bu tez kapsamında elde edilen verilerin, Fos ailesi transkripsiyon faktörlerine karşı geliştirilmiş olan DNA aptamerlerinin, madde bağımlılığının etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması, tedavisinde ve tanısında kullanılmak üzere yeni stratejilerin geliştirilmesi açısından literatüre katkı yapması beklenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Madde Bağımlılığı

Madde bağımlılığı, kronik olarak tekrarlayan bir hastalıktır (Koob and Le Moal, 2001). Bağımlılığın temel özellikleri, olumsuz sonuçlara rağmen maddeyi arama ve alma zorunluluğu, madde alımını sınırlandırmada kontrol kaybı ve maddeye erişim engellendiğinde olumsuz bir duygusal durumun (kaygı, sinirlilik gibi) ortaya çıkmasını içermektedir (Koob and Le Moal, 2008; Koob and Le Moal 2001). Bu durum, kötüye kullanılan bir ilaca tekrar tekrar maruz kalma süreci sırasında kademeli ve ilerleyici bir şekilde gelişir ve uyuşturucu kullanımının kesilmesinden sonra da aylarca veya yıllarca devam edebilir (Nestler, 2004).

Madde kullanımı ile ilgili üç terim yaygın olarak kullanılmaktadır: tolerans (tolerance), fiziksel bağımlılık (dependence) ve bağımlılık (addiction). Tolerans, bir ilaca sabit bir dozda tekrar tekrar maruz kalındığında azalan etkiyi veya aynı etkiyi sürdürmek için artan bir doza duyulan ihtiyacı temsil eder. Fiziksel bağımlılık, ilaç kesildiğinde yoksunluk sendromundan (fiziksel ve/veya psikolojik rahatsızlıklar) kaçınmak için ilaca sürekli maruz kalma ihtiyacı olarak tanımlanır. Ayrıca, disforiye ve yoksunluğun erken evrelerinde görülen yüksek nüks oranlarına katkıda bulunabilir. Bağımlılık, olumsuz sonuçlarına rağmen bir uyuşturucuyu zorunlu olarak kullanmak olarak tanımlanmaktadır (Bodnar, 2019; Nestler, 2001).

Madde bağımlılığındaki en tutarlı bulgu, kötüye kullanılan maddelerin hem farmakolojik hem de doğal ödülleri pekiştiren mezolimbik dopamin sistemini harekete geçirmesidir. Mezolimbik sistem, ventral tegmental alandaki (VTA) dopaminerjik nöronlardan ve bunların nükleus akumbens (NAc) ve prefrontal korteksteki terminal alanlara aksonal projeksiyonlarından oluşur. Opioidler, alkol, nikotin, kannabinoidler ve psikostimülanlar gibi maddeler beyinde belirli reseptörler ile etkileşir ve bu sistem üzerine etki ederek sinaptik dopamin (DA) düzeylerini artırır (Gupta and Kulhara, 2007). Tablo 2. 1'de verilen kötüye kullanımı olan maddeler, VTA ve NAc'yi innerve eden endojen opioid yollarını taklit ederek (opiatlar) veya aktive ederek (alkol, nikotin gibi) mezolimbik dopamin sistemini de aktive eder. Diğer ilaçlar, NAc'de başka mekanizmalar

(kannabinoidler ve fensiklidin gibi) aracılığıyla doğrudan etki etmektedir (Nestler 2001; Hyman and Malenka, 2001).

Tablo 2.1 Bağımlılık yapan ilaçlar. (Nestler, 2001; Hyman and Malenka, 2001).

Madde ismi	Bağımlılıkla ilgili moleküler hedefler
Opioidler (eroïn dahil morfin benzeri ilaçlar)	μ - ve δ -opioid reseptörleri (agonistler)
Kannabinoidler	CB1 ve CB2 kannabinoid reseptörleri (agonist)
Nikotin	Nikotinik asetilkolin reseptörü (agonist)
Etanol	GABA _A reseptör fonksiyonunu kolaylaştırır ve NMDA reseptör fonksiyonunu inhibe eder
Psikomotor uyarıcılar (kokain ve amfetaminler)	Kokain, dopamin, serotonin (5-HT) ve noradrenalin taşıyıcılarını bloke eder; amfetaminler, taşıyıcı aracılı salınma neden olur; dopamin taşıyıcı (DAT) en önemli hedeftir
Fensiklidin (PCP) ve ilgili ilaçlar	NMDA glutamat reseptör (antagonist)
İnhalanlar	Bilinmiyor

Kronik ilaç kullanımı ile beyindeki bazı nöronal hücre tiplerinin morfolojisinde ve çeşitli nörotransmitter sistemlerin işleyişinde meydana gelen değişiklikler kısmen gen ekspresyonundaki değişiklikler aracılığıyla düzenlenmektedir (Nestler, 2012). Gen ekspresyonunun transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar tarafından düzenlenmesi, bağımlılığı tanımlayan davranışsal anormalliklerin ortaya çıkmasını hızlandıran kötüye kullanımı olan ilaçlar tarafından beyin fonksiyonunda uzun süreli değişikliklerde önemli bir rol oynamaktadır (Bali and Kenny, 2022).

2.2 Transkripsiyon Faktörleri ve Madde bağımlılığı

Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik roller oynayan DNA bağlayıcı proteinlerdir. Bu proteinler, büyüme, gelişme ve homeostaz dahil olmak üzere tüm ana hücrel süreçleri kontrol etmektedir (Mondragón and Maher, 2016).

Birçok transkripsiyon faktörünün bağımlılık sürecinde de aktif rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde, hedef genlerin promotor bölgelerindeki spesifik yanıt elementlerine bağlanan ve bu genlerin ekspresyonunu düzenlenmesinde rol oynayan bazı transkripsiyon faktörlerinin madde bağımlılığındaki rolüne dair çalışmalar mevcuttur (Namba et al., 2022; Larson et al., 2011). Bağımlılığın transkripsiyonel mekanizması üzerine yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu NAc bölgesine odaklanmıştır. Madde kullanımı ile gen ekspresyon seviyelerindeki meydana gelen değişimler, bağımlılığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır ve bu nedenle ilgili transkripsiyon faktörleri büyük önem arz etmektedir (Nestler, 2012). Şimdiye kadar, çeşitli transkripsiyon faktörleri madde bağımlılığı ile ilişkilendirilmiştir (Bali and Kenny, 2022; Pulipparacharuvil et al., 2008; Ang et al., 2001). Ancak, madde bağımlılığı kapsamında en kapsamlı şekilde araştırılmış transkripsiyon faktörleri, Fos ailesi proteini (Δ FosB) ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) transkripsiyon faktörleridir (McClung and Nestler, 2008; McClung and Nestler, 2003).

2.3 CREB (cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein)

cAMP yanıt elemanı (CRE) bağlayıcı protein (CREB) transkripsiyon ailesi, hücreSEL metabolizmanın kontrolünde, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde, anksiyete ve madde bağımlılığı gibi patofizyolojik süreçlerde, sinaptik plastisite ve sinir sistemi gelişiminde önemli roller üstlenmektedir. Kronik olarak kötüye kullanılan bazı maddelere maruz kalma, NAc'de transkripsiyon faktörü olan CREB'in aktivitesini artırır (Teague et al., 2023; Larson et al., 2011). CREB, homodimerler oluşturarak hedef genlere bağlanırlar. Protein kinaz A ve diğer protein kinazlar, CREB'ye bağlı transkripsiyonu aktive etmek için CREB'yi serin kalıntısı 133'te fosforile eder. Fosforilasyonun ardından, CRE'ye bağlı CREB, hedef gen transkripsiyonu üzerindeki etkisini gösterebilir ve promotora bağlı kofaktörlerle etkileşime girebilir (Nestler, 2012; McPherson and Lawrence, 2007). Bu homodimerlerin yarı ömrü 10-20 dakika olup CREB aktivasyonu, akut ilaç uygulamasına yanıt olarak oldukça geçicidir ve ilacın kesilmesinden sonraki bir veya iki gün içinde normal seviyelere döner (McPherson and Lawrence, 2007). Kokaine veya diğer bazı kötüye kullanılan ilaçlara kronik maruz kalma, cAMP düzeylerini ve

NAc'deki cAMP'ye bağı protein kinaz (PKA) aktivitesini artırır. Bu durum, CREB'nin sürekli aktivasyonuna neden olur (Barrot et al., 2002).

CREB'nin hedef genleri

CREB, transkripsiyon faktörü olarak, hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık ederek etki göstermektedir. CREB, bağımlılık yaratan maddeler tarafından stimülasyona yanıt olarak uzun süreli yukarı regülasyon gösteren genlerin ve Fos gibi hızlı ve geçici olarak indüklenen genlerin ifadesinde görev almaktadır (Hyman and Malenka, 2001).

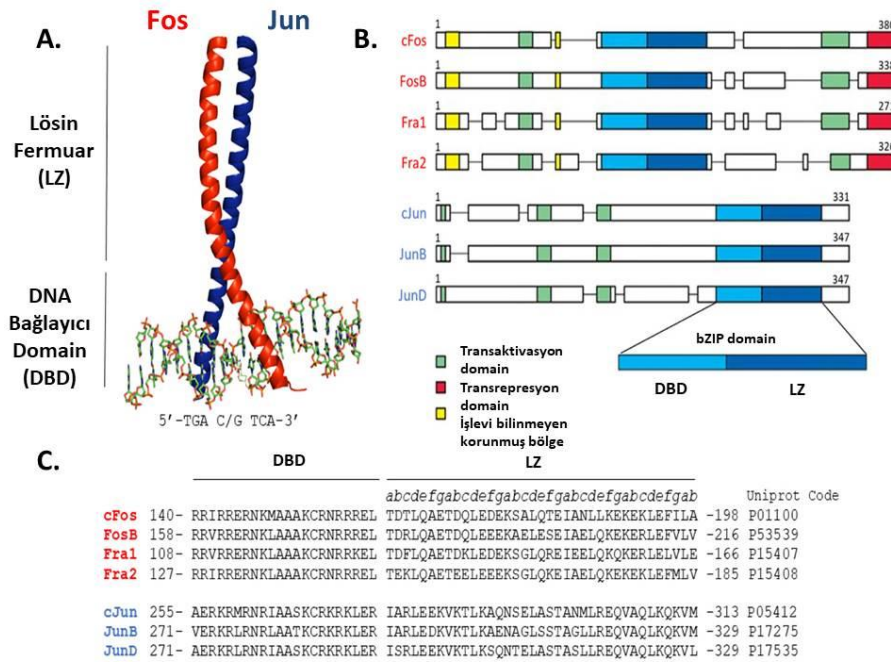
En çok çalışılan hedef genler arasında, NAc'e dopaminerjik sinyali geri besleyen ve baskılayan opioid peptid dinorfin yer almaktadır. NAc nöronlarının terminallerinden salınan dinorfin, sinir terminallerinde ve DA nöronlarının hücre gövdelerinde bulunan κ -opioid reseptörlerine etki ederek işlevlerini engeller. Kokain veya opioidlere kronik maruziyet, cAMP yolunun yukarı regülasyonu, CREB'nin aktivasyonu ve dinorfin indüksiyonu yoluyla bu negatif geri bildirim döngüsünün aktivitesini yukarı regüle eder (McClung and Nestler, 2003; Nestler 2001). cAMP yolu, CREB ve dinorfin'in regülasyonu, madde alımı bırakıldıktan birkaç gün veya bir hafta sonra sistemin normale dönmesi nedeniyle nispeten kısa ömürlüdür. Bu durum, geri çekilmenin erken aşamalarında olumsuz duygusal duruma katkıda bulursa da bağımlılıkla ilişkili daha istikrarlı davranışsal anormalliklere doğrudan aracılık etmesi olası görülmemektedir (McClung and Nestler, 2008; Nestler 2001).

CREB'nin bilinen hedeflerinden biri olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), CREB tarafından düzenlenen nörotrofik bir faktördür (Muschamp and Carlezon, 2013). BDNF, ödül bilgisini işleyen beyin bölgelerindeki sinaptik plastisiteyi düzenlemede önemlidir. Kokainin ödüllendirici etkileri için kritik bir beyin alanı olan NAc'deki BDNF, kalıcı kokain arama davranışlarını teşvik eder ve nüksetmeye karşı savunmasızlığı artırır (Graham et al., 2007; Schoenbaum et al., 2007).

CREB indüksiyonunun ayrıca kokainin NAc'de orta dikenli nöronlar üzerindeki dendritik dikenleri indüklemesine katkıda bulunduğu da gösterilmiştir (Anderson et al., 2017; Cahill et al., 2018).

2.4 Fos Ailesi Transkripsiyon Faktörleri

Fos transkripsiyon faktörleri ailesi, c-Fos, FosB, Fra-1 ve Fra-2'nin yanı sıra FosB varyantlarını içerir (Milde-Langosch, 2005). Bu proteinler, yüksek oranda korunmuş α -sarmal-sarmal oluşumuyla moleküller arası bir etkileşimin kolaylaştırarak dimerizasyonda ve DNA bağlamada etkin olan bazik lösin fermuar (bZIP) ile karakterize edilir (Yin et al., 2019; Milde-Langosch, 2005). Bu domain, N-terminal DNA bağlama domaini bir de C-terminal bZIP yapısını içerir (Şekil 2.1) (Brennan et al., 2020). Fos proteinleri, Jun proteinleri (c-Jun, JunB ya da JunD) ile heterodimer aktivatör protein-1 (AP-1) kompleksini oluşturur (Nestler, 2008). AP-1 transkripsiyon faktörü, regüle ettikleri genlerin promotorlarında yer alan AP-1 DNA bağlama bölgelerine (TGA(G/C)TCA) bZIP domaini aracılığıyla bağlanır (Nestler, 2008; Yin, et al., 2019). Bu sayede, AP-1, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, hayatta kalma, hücre migrasyonu ve transformasyon gibi çok çeşitli hücresel süreçleri de düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (Ye et al., 2014; Matthews et al., 2007; Garces de los Fayos Alonso et al., 2018).

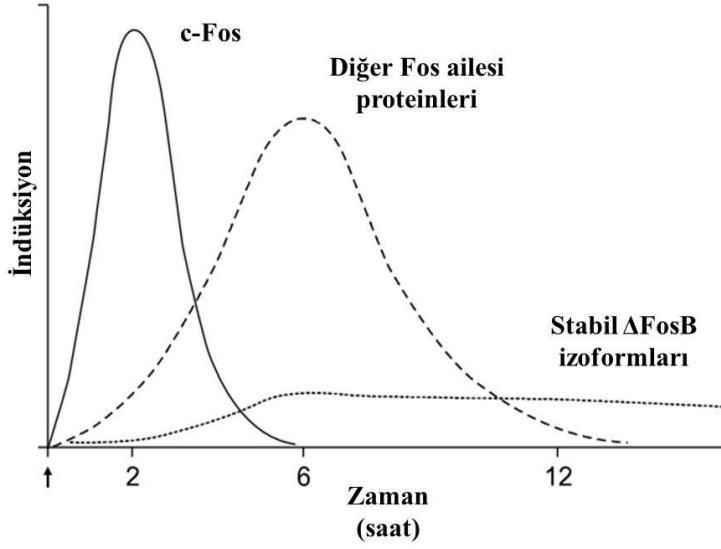


Şekil 2. 1 AP-1 proteinlerinin dizileri ve yapıları. **A.** DNA'ya bağlanan Fos:Jun heterodimerinin yapısı (PDB kodu: 1FOS); **B.** AP-1 proteinlerinin özel bölgelerinin yapılarının şematik gösterimi; **C.** Seçilen AP-1 proteinlerinden bZIP domainlerinin dizi hizalaması (Brennan et al., 2020).

Fos ailesindeki proteinler, madde bağımlılığında hem kronik hem de akut madde kullanımından sonra beyinin spesifik bölgelerinde hızla ve geçici olarak uyarılırlar (Larson et al., 2011). Bu yüzden hücresel uyarılara karşı Fos ailesi protein genleri ilk cevap veren genler (IEG'ler) arasındadır. Bu tepkiler, ilacın ödüllendirici ve lokomotor hareketlerinin önemli araçları olan nukleus akumbens ve dorsal striatumda en belirgin olarak görülür (Larson et al., 2010; Nestler, 2008).

2.4.1 c-Fos ve diğer fos ailesi üyeleri

c-Fos, Fos protein ailesinin en çok çalışılan üyelerinden biridir. Nöronlarda, c-Fos ifadenmesinin, CREB/CRE kompleksinin aktivasyonu yoluyla cAMP ve Ca^{2+} tarafından uyarıldığı görülmektedir (Gallo et al., 2018). AP-1, c-Fos ve c-Jun proteinlerinin bir heterodimeri olarak karakterize edilir (Faubert and Kaminski, 2000). AP-1 transkripsiyon faktörleri ailesi, hem homodimer hem de heterodimer yapıları oluşturabilirler. c-Fos proteini kararlı homodimerler oluşturmazlar ancak, Maf proteinleri (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, ve Nrl) veya c-Jun ile daha kararlı olan heterodimer yapıları oluşturabilmektedirler (Shaulian and Karin, 2001; Szalóki et al., 2015). AP-1, kompleksi oluşturan proteinlere bağlı olarak DNA'ya değişken afinite ile bağlanır: heterodimer Fos:Jun, DNA'yı bir homodimerden (Jun:Jun) daha yüksek afiniteyle bağlar (Ye et al., 2014). Jun:Jun ve Jun:Fos dimerleri, TPA'ya yanıt veren eleman (TRE, 5'-TGA(C/G)TCA-3') olarak bilinen palindromik konsensüs DNA dizisine bağlanır (Ozanne et al., 2007). c-Fos ve c-Jun, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve onkogeneze dahil olmak üzere çeşitli süreçleri düzenler (Shaulian and Karin, 2001).



Şekil 2. 2 Fos ailesi proteinlerinin, akut bir uyarana nöronlardaki indüksiyon seviyelerinin zamansal özellikleri. c-Fos hızla indüklenir ve akut uyarandan sonraki saatler içinde yıkılır. FosB, Fra-1 ve Fra-2 bir süre sonra indüklenir ve c-Fos'tan biraz daha uzun süre devam eder (Nestler, 2012).

c-Fos çeşitli hücrel uyarana yanıt olarak geçici ve hızlı bir şekilde indüklenmektedir (Şekil 2. 2) (Kovács, 2008; Hoffman et al., 1993). Akut madde kullanımlarında c-Fos ve diğer Fos ailesi proteinlerinin seviyesindeki hızlı artış özellikle c-Fos proteinini maddeye verdiği yanıtın saptanmasında etkin hedef yapmaktadır. Fos ailesindeki proteinler stabil değillerdir ve saatler içinde bazal seviyelere geri dönerler (Nestler, 2008; Nestler, 2012). Bu sayede, ilaç kullanımının kısa süreli etkilerinin gözlemlenmesi için etkili hedef proteinlerdir.

2.4.2 ΔFosB

Fos ailesi içinde en ilgi çeken transkripsiyon faktörlerinden biri olan FosB proteini, AP-1 kompleksinin biyolojik süreçlerinde önemli bir role sahiptir. FosB, DNA bağlanma domaini, dimer oluşumu için gerekli bZIP ve C-terminal transaktivasyon domaini ile Fos ailesinden c-fos ile yapısal benzerlikler göstermektedir (Wagner, 2010). FosB kodlayan gen, inflamasyon cevabı, stres ve antikanser tedaviler gibi çeşitli süreçler tarafından düzenlenmektedir (Nascimento et al., 2021; Na et al., 2016). FosB'nin, hücre proliferasyonunu, apoptozu ve inflamasyon yanıtlarını düzenlediği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (Liao et al., 2020; Wagner, 2010; Tang et al., 2016; Cervantes-Madrid et al., 2017; Park et al.,

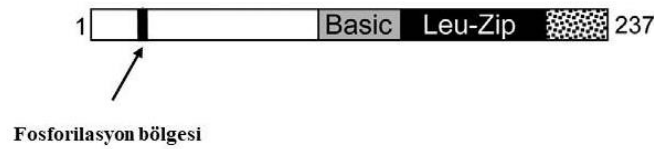
2019). Diğer Fos proteinleri, birçok akut uyaran tipine yanıt olarak hızlı ve geçici olarak indüklenir ve birkaç saat içinde bazal seviyelere dönerler. Ancak, Δ FosB için, tekrarlanan stimülasyondan sonra eşsiz kararlı yapıya sahip 35-37 kDa izoformlarının kademeli olarak birikimi söz konusudur (Nestler, 2008; Nestler et al., 2001).

Δ FosB, *fosB* geni tarafından kodlanan Fos transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. (Nestler, 2012). Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, Δ FosB, FosB proteininin kısa formudur (Ulery et al., 2006). Δ FosB, alternatif splicing ile ortaya çıkmaktadır. Diğer tüm Fos ailesindeki proteinlerin C-terminalinde bulunan 101 amino asitlik kısım olan iki degran domain'in Δ FosB 'de bulunmaması ve proteazomal degradasyondan koruyan fosforilasyonu Δ FosB transkripsiyon faktörünün stabilitesini artırmaktadır (Ulery-Reynolds et al., 2009; Carle et al., 2007; Ulery et al., 2006). Δ FosB, eşsiz uzun yarı ömrü nedeniyle kronik ilaca maruz kalma durumunda birikimi söz konusudur. Ayrıca, maruziyetin sonlandırılmasında sonra da en az birkaç hafta boyunca nöronlarda gözlenmektedir (Nestler et al., 2001).

FosB (338 aa, M_r ~38 kD)



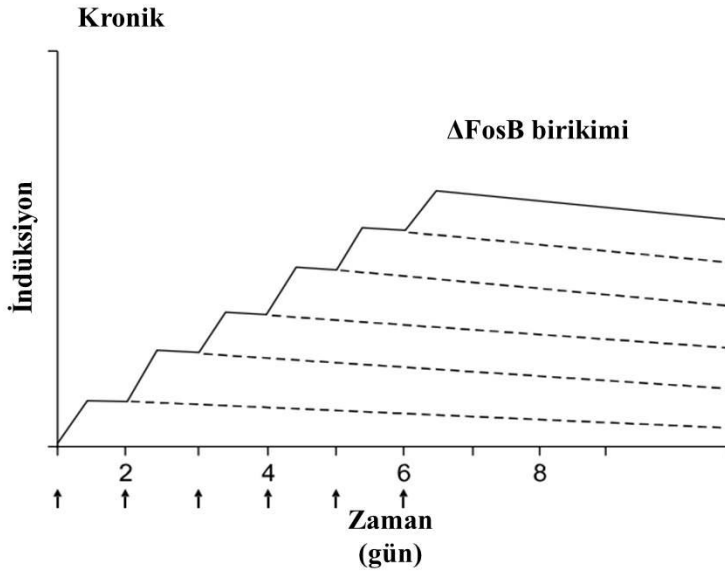
Δ FosB (237 aa, M_r ~26 kD)



Şekil 2. 3 Δ FosB'nin FosB'den farkının ve benzersiz stabilitesinin biyokimyasal temeli. (Nestler, 2015).

Kokain, opioidler ve nikotin dahil olmak üzere, neredeyse tüm kötüye kullanımı olan maddeler Δ FosB'yi indükler. Bu indüksiyon ağırlıklı olarak nükleus akumbens ve dorsal striatuma görülür, ancak prefrontal korteks ve

amigdala gibi diğer bazı beyin alanlarında daha düşük indüksiyon seviyeleri görülür. Δ FosB, bu beyin bölgelerinde aktif ve uzun vadeli bir fonksiyonel form olan AP-1 kompleksini oluşturmak için esas olarak JunD ile dimerize olur (Bejjani et al., 2019; Alibhai et al., 2007). Bu durum, gen ifadesinde maddeye bağlı değişikliklerin nispeten uzun süre kullanılmamasına rağmen devam edebildiği bir moleküler mekanizma sağlamaktadır. (Nestler, 2008). Diğer Fos proteinlerine göre göreceli olarak sahip olduğu yüksek stabilite, Δ FosB proteinini, madde bağımlılığı, stres tepkileri, psikoterapötik ilaçların klinik etkileri gibi faktörler dahil olmak üzere, çeşitli uyarılara kronik maruziyetin yol açtığı uzun süreli etkilerinin gözlemlenmesinde önemli bir odak noktası haline getirmiştir. (Nestler, 2008; Alibhai et al., 2007). Δ FosB'nin bu kararlı izoformlarının, çeşitli kronik uyarın türlerine yanıt olarak beyinde bölgeye özgü olarak indüklendiğini, bağımlılıkla ilgili nöroplastisitenin gelişmesinde ve madde kullanımının davranışsal etkilerine karşı artan duyarlılığını inceleyen çalışmalar mevcuttur (Grueter et al., 2013; García-García et al., 2021; Robison et al., 2013; Andersson et al., 2003; Gajewski et al., 2016; Noback et al., 2021).



Şekil 2. 4 Δ FosB'nin tekrarlanan uyarılarla nöronlardaki indüksiyon seviyelerinin zamansal özellikleri. Tekrarlanan uyarılarla, her uyarın düşük bir Δ FosB düzeyine neden olur ve bu da Δ FosB düzeylerinde kademeli bir artışa neden olur. Bu, her bir akut uyarın tarafından indüklenen Δ FosB'yi gösteren üst üste binen alt dizi ile gösterilir (Nestler, 2012).

Çeşitli maddelerin akut kullanımı, NAc ve dorsal striatumda Fos ailesi üyelerinin (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) hızlı indüksiyonuna neden olur. Bu indüksiyon aynı zamanda oldukça geçicidir; bu proteinlerin ve mRNA'larının kararsızlığı nedeniyle madde kullanımından birkaç saat sonra bazal seviyeye döner (McClung et al., 2004; Kelz and Nestler, 2000). Buna karşılık, Δ FosB, akut ilaç uygulamasıyla düşük seviyelerde indüklenirler, ancak kararlılıkları nedeniyle beyinde uzun süre kalırlar. Tekrarlanan ilaç uygulamasıyla, her bir akut uyarın, düşük seviyede stabil Δ FosB izoformlarını indükler (Şekil 2.4). Sonuç olarak, tekrarlanan uyarınlarla beyindeki toplam Δ FosB düzeylerinde kademeli bir artış gözlenir (Nestler, 2012).

Δ FosB hedef genleri

Transkripsiyon faktörü Δ FosB, kötüye kullanımı olan maddelerin tekrar tekrar uygulanmasıyla NAc ve dorsal striatumda indüklenir (Wallace et al., 2008; Zachariou et al., 2006). Δ FosB, JunD ile aktif ve uzun süreli bir AP-1 kompleksi oluşumu yoluyla gen ekspresyonunu etkiler. AMPA glutamat reseptörü alt birimi GluR2, Δ FosB için varsayılan hedeflerden biridir. İndüklenebilir bitransgenik farelerde Δ FosB aşırı ekspresyonu, NAc'ta GluR2 ekspresyonunu seçici olarak artırırken diğer AMPA glutamat reseptörü alt biriminin ekspresyon seviyesinde değişikliğe neden olmamaktadır (Vialou et al., 2010; Peakman et al., 2003). Kronik olarak madde kullanımı, GluR2 de dahil olmak üzere çok sayıda hedef geni düzenleyen Δ FosB'yi indükler. Bu durum, NAc'de GluR2 alt birimini içeren nöronlarda AMPA reseptörlerinin (AMPA-R) oranını artırarak AMPA'nın genel iletkenliğinin ve Ca^{+2} geçirgenliğinin azalmasına neden olur. Bu azaltılmış uyarılabilirlik, nöronları ilaçların akut inhibitör etkilerine ve dolayısıyla ilaçların güçlendirici etkilerine karşı daha duyarlı hale getirebilir. Bu azalan uyarılabilirlik, nöronları ilaçların etkilerine karşı daha duyarlı hale getirerek kötüye kullanılan bir ilaca verilen yanıtları artırabilir (Vialou et al., 2010).

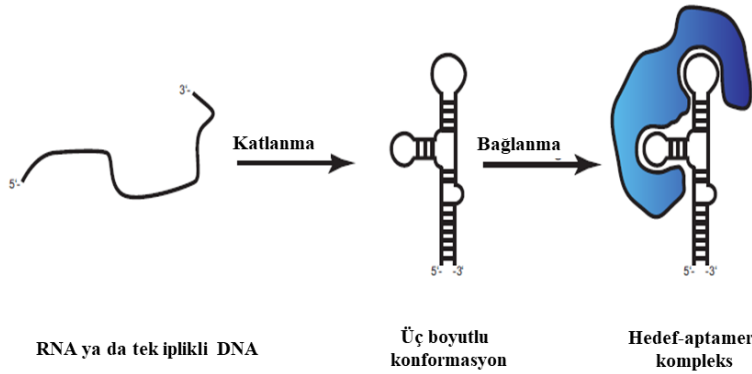
Dinorfin, Δ FosB için bir diğer hedef olarak karşımıza çıkmaktadır. Dinorfin, GABAerjik sinir terminallerinden salınır ve NAc ve VTA'daki dopaminerjik nöronlar üzerinde bulunan κ opioid reseptörleri aracılığıyla etki eder (Andersson et al., 2003; Nestler et al., 2001). NAc'de dinorfin ekspresyonunun Δ FosB aracılı

baskılanması, kötüye kullanılan ilaçların ödüllendirici etkilerine duyarlılığı artırabilir.

Diğer bir Δ FosB geni hedefi Cdk5 olarak ifade edilen sikline bağımlı kinaz 5'dir. Δ FosB, Cdk5 genini, genin promotörü içinde bulunan bir AP-1 bölgesi aracılığıyla aktive eder. Kokainin Δ FosB yoluyla Cdk5 ekspresyonunu indüklediği bir mekanizmayı desteklediği bilinmektedir (Nestler et al., 2001; Pulipparacharuvil et al., 2008). Kronik kokain kullanımı, NAc'deki Cdk5 seviyelerini ve aktivitesini artırır ve Cdk5 aktivitesi, dendritik dikensi yapının yoğunluğunda artışa neden olur. Δ FosB birikiminin, dendritik omurga yoğunluğundaki artışı kolaylaştırmak için kilit yapıları fosforile eden Cdk5'i yukarı doğru düzenlemektedir. (Bibb et al., 2001; Norrholm et al., 2003).

2.5 Nükleik Asit Aptamerleri ve *in vitro* SELEX Yöntemi

Nükleik asit aptamerleri, monoklonal antikörlere rakip olan, spesifik hedef moleküllere bağlanma yeteneklerine sahip, yaklaşık 25-80 baz uzunluğundaki tek zincirli (DNA veya RNA) oligonükleotid dizileridir. (Guo et al., 2023; Ni et al., 2011). Küçük moleküler ağırlığa sahip (5-40 kDa) aptamerler, spesifik bir üç boyutlu yapıya katlanabilmeleri sayesinde hedeflerine yüksek bağlanma afinitesi (pikomolar-düşük nanomolar aralığında) ile bağlanabilirler (Şekil 2. 5) (Afrasiabi et al., 2020; Sefah et al., 2010). Ayrıca, aptamerler, benzersiz ve çeşitli üst düzey yapıların (hairpin loop, bulge, G-kuadrupleks (G4), çift sarmal, üçlü, baz-fosfat fermuar) oluşumuyla hedeflerini tanırlar (Saito, 2021; Spiegel et al., 2020; Sullivan et al., 2019).



Şekil 2. 5 Aptamerin spesifik bir üç boyutlu yapı oluşumuna bağlı olarak hedefine bağlanmasının şematik gösterimi (Wolter and Mayer, 2017).

Aptamerlerin bu yapıları, aptamer-hedef tanıma yoluyla hedeflerine spesifik bir şekilde bağlanmasını sağlar ve bu etkileşim, aromatik halkalar, elektrostatik etkileşimler, π - π sistemi istifleme, van der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağı ile gerçekleşmektedir (Zou et al., 2019).

Tablo 2.2’de daha ayrıntılı gösterildiği gibi aptamerler,

- kimyasal olarak hızlı ve düşük maliyetli sentezlenebilmeleri,
- lotlar arası farklılık olmaması,
- kolaylıkla modifiye edilebilmeleri,
- proteinler için uygun olmayan çevresel koşullarda da yüksek stabiliteye sahip olmaları,
- küçük molekül yapıları olmaları,
- dokuya hızlı penetrasyona ve düşük immünojeniteye sahip olmaları gibi özellikleri nedeniyle antikorlara üstünlük sağlamaktadır (Afrasiabi et al., 2020; Ni et al., 2020; Thiviyanathan and Gorenstein, 2012).

Tablo 2. 2 Nükleik asit aptamerleri ile monoklonal antikorların karşılaştırılması (Ni et al., 2020).

	Nükleik Asit Aptamerleri	Monoklonal Antikorlar
Stabilite	<ul style="list-style-type: none"> ➤ denatürasyon/renatürasyon adımlarına karşı dirençlidir. ➤ oda sıcaklığında kararlıdır. ➤ uzun depo ömrü (birkaç yıl) vardır. ➤ liyofilize edilebilir. ➤ nükleaz degradasyonuna hassastır. ➤ proteaz dirençlidir. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ kolayca denatüre olur. ➤ sıcaklığa karşı hassastır. ➤ sınırlı depo ömrü vardır. ➤ depolama ve transport için soğuk zincir gerekir. ➤ proteaz degradasyonuna hassastır. ➤ nükleaz dirençlidir.
Hazırlama	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>in vitro</i> SELEX 2-8 hafta sürer. ➤ lotlar arası farklanma gözlenmez. ➤ sentez maliyeti düşüktür. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>in vivo</i> üretimi 6 aydan fazla sürer. ➤ lotlar arası farklanma gözlenir. ➤ üretim maliyeti yüksektir.
Hedef Potansiyeli	<ul style="list-style-type: none"> ➤ iyonlardan ve küçük moleküllerden tüm hücrelere ve canlı hayvanlara kadar geniş hedef yelpazesi vardır. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hedefin güçlü bir immun cevap oluşturması gerekir.
Boyut	<ul style="list-style-type: none"> ➤ küçük moleküllerdir. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ aptamerlere kıyasla büyük moleküllerdir.
Modifiye Edilebilirliği	<ul style="list-style-type: none"> ➤ afinitede düşüş olmaksızın modifiye edilebilirler. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ modifikasyon genellikle aktivite kaybına neden olur.
Afinite	<ul style="list-style-type: none"> ➤ yüksek ve multivalent aptamerler ile arttırılabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ antijendeki epitop sayısına bağlıdır.
Spesifiklik	<ul style="list-style-type: none"> ➤ nokta mutasyonları ayırt edilebilir. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ farklı antikorlar aynı antijene bağlanabilir.
Dokuya Alınım/Böbrek Filtrasyonu	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hızlıdır. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ yavaştır.

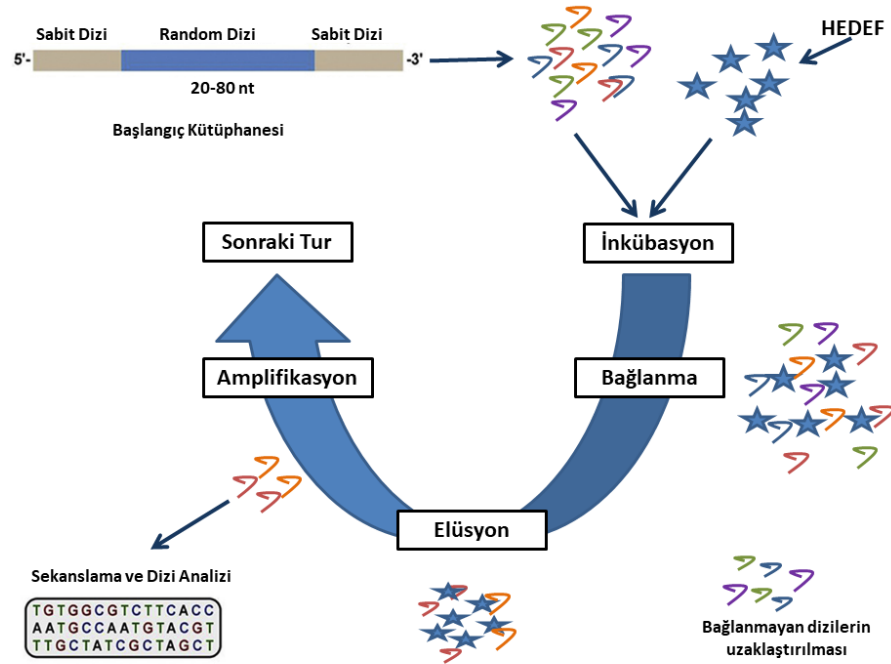
Aptamerlerin geliştirilmesi için kullanılan *in vitro* seçim yöntemi olan SELEX ilk olarak 1990 yılında gerçekleştirilmiştir (Ellington and Szostak, 1990;

Tuerk and Gold, 1990). Günümüze kadar da SELEX yöntemi veya diğer modifiye edilmiş SELEX stratejileri kullanılarak hücre içi ve hücre dışı proteinler (Roca et al., 2022; Murakami et al., 2022; Chen et al., 2015; Mendonsa and Bowser, 2004), antibiyotik, iyon, pestisit gibi küçük moleküller (Yu et al., 2021; Bor et al., 2020; Paniel et al., 2017; Qu et al., 2016), virüsler (Narayan et al., 2020), bakteri (Farrel Côttes et al., 2022) ve kanser hücreleri (Li et al., 2021b) gibi yapılara yüksek afinite ve spesifikliğe sahip birçok aptamer geliştirilmiştir.

SELEX yönteminin temel adımları Şekil 2.6 'da gösterilmiştir. SELEX yöntemi şu adımları içermektedir:

- i. Hedef moleküllerin hem 5' hem de 3' uçlarda sabit primer bölgeleri bulunan 20-60 nükleotitli 10^{13} - 10^{15} randomize dizilerden oluşan bir tek zincirli oligonükleotit kütüphanesi ile inkübasyonu,
- ii. Hedefe bağlanmamış oligonükleotitlerin uzaklaştırılması ve bağlanan oligonükleotitlerin fiziksel veya kimyasal yollarla elüsyonu,
- iii. Hedefe bağlanan oligonükleotitlerin PCR ile amplifikasyonu.

Bu döngü, hedefe yüksek afinite ile bağlanan diziler zenginleşene kadar tekrarlanmaktadır (Amini et al., 2022; Lyu et al., 2021; Wu et al., 2014).



Şekil 2. 6 SELEX yönteminin akış şeması.

SELEX yöntemini, daha az zaman alıcı hale getirmek, seçilen aptamerleri daha yüksek afinitelere ulaştırmak, sürecin otomasyonunu sağlamak ve verimi arttırmak için yıllar içinde farklı şekillerde modifikasyonlar yapılmıştır (Kohlberger and Gadermaier, 2022; Stoltenburg et al., 2007). SELEX'in 1990 yılında geliştirilmesinden bu yana, grafen oksit (GOx)-SELEX (Kong et al, 2022; Özyurt et al., 2019), kapiler elektroforez (CE)-SELEX (Uemachi et al., 2021), flow sitometri SELEX (Mayer et al., 2010), hücre-SELEX (Bakhtiari et al., 2021; Lyu, et al., 2016; Ninomiya et al., 2013), mikroarray-SELEX (Yu et al., 2019), manyetik boncuk temelli SELEX (Lu et al., 2022; Wang et al., 2020) gibi modifiye SELEX yöntemleri yaygın olarak tercih edilmektedir.

2.5.1 Manyetik boncuk tabanlı SELEX

Manyetik boncuklar (MB), süperparamanyetik özellikleri, hedef-spesifik ligandların immobilizasyonu yoluyla hedef analitin karmaşık matrislerden saflaştırılmasına imkan vermeleri ve analizi kolaylaştırmaları nedeni ile yaygın olarak kullanılan çok yönlü materyallerdir (Modh et al., 2018). MB'ler, bir mıknatıs kullanılarak hedefe bağlı ve bağlı olmayan aptamerlerin basit ve hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlayan bu özellikleri sayesinde SELEX'te yaygın olarak kullanılan boncuklar arasındadır (Kim et al., 2021; Modh et al., 2018; Stoltenburg et al., 2012).

Farklı amaçlar doğrultusunda kullanılmak üzere, MB'ler geçiş metalleri (Ni^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} gibi), streptavidin, amino, karboksil ve tosil gibi çeşitli reaktif gruplarla fonksiyonel hale getirilebilir ve SELEX'in hedefi olan molekül manyetik boncuk yüzeyine immobilize edilebilir (Silwal et al., 2022; Nikam et al., 2022; Li et al., 2021a; Kökpınar et al., 2011).

En yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan Ni-NTA ya da Co-NTA manyetik boncuklar, 6XHis-tag içeren peptit/proteinlerin boncuk yüzeyine immobilize edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, 6XHis-tag içeren hedeflere karşı DNA aptamerlerinin seçimi için sıklıkla kullanılır (Yang et al., 2020). Bu yöntem, çok küçük miktarlarda hedef molekül ve sert yıkama koşulları kullanılarak, bağlı ve bağlı olmayan aptamerlerin hızlı ve verimli bir şekilde ayrılması sağlamaktadır (Liu et al., 2021).

Manyetik boncuk tabanlı SELEX'i daha etkili hale getirmek için, farklı tekniklerle kombine edildiği çalışmalar da literatürde mevcuttur. Özellikle, manyetik boncuk tabanlı SELEX işleminin mikroakışkan teknoloji ile entegrasyonu sonucunda, hızlı, yüksek verimli, otomatize edilebilen ve çok çeşitli hedeflere uygulanabilen yöntemler geliştirilmiştir (Saito, 2021; Olsen et al., 2017; Lou et al., 2009).

2.6 Aptamerler: Potansiyel Terapötik Ajanlar

Aptamerler kendilerine has bir üç boyutlu katlanmaya sahip olmaları nedeni ile hedeflerine yüksek afinite (pikomolar-düşük nanomolar aralığında) ve spesiflik ile bağlanabilirler. Bu özellikleri nedeni ile aptamerler “kimyasal antikorlar” olarak da adlandırılarak antikorlara rakip olarak gösterilmektedir (Yang et al., 2021; Zhou et al., 2016).

Aptamerler, antikorların zayıflıklarının üstesinden gelme potansiyeline sahiptirler. Kimyasal sentez yoluyla düşük maliyetli üretimi, termal kararlılıklarının yüksek olması ve uygun sıcaklık koşulları altında yeniden uygun konformasyona katlanabilmeleri, immünojenik olmamaları, aptamerlerin terapötik ajan, ilaç taşınım, hedefleme ve salınım ajanı olarak kullanımlarına olanak sağlamaktadır (Chen et al., 2023; Ni et al., 2020). Ayrıca, küçük boyutları sayesinde de aptamerler doku bariyerlerini kolaylıkla geçebilme ve hedef hücrelerin içine alınabilme açısından çok büyük öneme sahiptir (Wang et al., 2022; Ni et al., 2020; Musumeci et al., 2017). Ek olarak, aptamerler, monoklonal antikorlara benzer şekilde, bir hedef proteinin normal işlevine müdahale edebilmektedir. Bütün bu özelliklere rağmen, aptamerlerin iki ana zayıf noktası vardır: (i) nükleaz tarafından parçalanmaya duyarlılık ve (ii) glomerüler filtrasyon yoluyla vücuttan hızla atılmaları nedeni ile *in vivo* ömürleri oldukça kısadır. Bunlar, aptamerlerin terapötik kullanımını engelleyen önemli sorunlardır. Ancak, aptamerlerin en önemli özelliği bu oligonükleotid dizilerinin kolayca modifiye edilerek aptamer konjugatlarının oluşturulabilmesi ve klinik kullanımı mümkün terapötik ajanlara dönüştürülebilme potansiyelleridir (Kim et al., 2021; Agnello et al., 2021).

Pegaptanib (Macugen; Pfizer/Eyeteck), ABD FDA tarafından 2004 yılında klinik kullanım için onaylanan tek aptamerdir. Yaşa bağlı kas dejenerasyonunun

tedavisini amaçlayan bu ilacın aptamer temelli olması ilgiyi arttırmıştır (Ng et al., 2006). Ek olarak, klinik faz çalışmaları devam eden çok sayıda aptamer de bulunmaktadır (Zboralski et al., 2017; Schwoebel et al., 2013; Halawa et al., 2021). Artan bu ilgi sayesinde, aptamerlerin, teşhis ve tedavi amacı ile ve biyosensör probu (Zhao et al., 2023; Zheng et al., 2022; Guo et al., 2020; Yang et al., 2018) olarak kullanımlarına ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunun yanında, ilaç salınım sistemlerinin geliştirilmesi ve biyo-görüntüleme (Cruz Da Silva et al., 2022; Li et al., 2018a; Lijuan et al., 2017) gibi çalışmalarda biyomateryal olarak kullanımları ile ilgili başarılı örnekler bulunmaktadır. Aptamerlerin özellikle potansiyel terapötik uygulamaları büyük dikkat çekmektedir (Zou et al., 2019; Bruno, 2022; Liu et al., 2022).

2.7 Aptamerler: Hedef Olarak Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri, hücre fonksiyonunun ve kaderinin belirlenmesinde çok önemli roller oynarlar. Transkripsiyon faktörlerinin hedef gene bağlanması yoluyla ilgili genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde etkili rol oynaması, bu faktörleri kritik bir hedef haline getirmektedir. Bir transkripsiyon faktörü için, transkripsiyon faktörünün rollerini deşifre etmek veya hedef promotorları üzerindeki protein-protein etkileşimlerini bozmak için spesifik aptamerlerin kullanılması dikkat çekici bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Xiang et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, SELEX yöntemi kullanılarak hedef olarak seçilen FOXM1'nin DNA bağlama domaini'ne DNA aptameri (FOXM1 Apt) geliştirilmiştir. Transkripsiyon faktörü olan FOXM1, DNA bağlama domaini aracılığıyla promotordaki konsensus sekansına bağlanarak proliferasyonla ilişkili genleri aktive etmektedir. FOXM1 Apt'nin FOXM1 proteinlerine bağlanması, elektroforetik mobilite shift assay (EMSA) ve floresan polarizasyon analizleri ile doğrulanmıştır. FOXM1 DNA bağlama domaini için FOXM1 Apt'nin K_d 'si 64,8 nM olarak belirlenirken, FOXM1 Apt'nin FOXM1 tam uzunluktaki proteine K_d 'si 172.1 nM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre, FOXM1 Apt'nin FOXM1 tam uzunluktaki proteine de yüksek bir afinite ile spesifik olarak bağlanabileceği gösterilmiştir. Daha sonrasında da geliştirilen FOXM1 Apt transfeksiyon ajanı olan lipofectamine 2000 ile birlikte HEK293T hücrelere transfekte edilerek inhibisyon düzeyi kontrol edilmiştir. Bu çalışmanın

sonucu, elde edilen FOXM1 Apt'nin, FOXM1 tespiti için bir prob ve aynı zamanda kanser hücrelerinde FOXM1 transkripsiyonel fonksiyonlarının bir inhibitörü olarak kullanılabileceğini ve ilerleyen aşamalarda kanser teşhisi ve tedavisi için potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Farklı bir çalışmada da yalnızca plasentalı memelilerde bulunan double homeobox protein 4 (DUX4) transkripsiyon faktörüne karşı SELEX yöntemi kullanılarak DNA aptameri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, floresan rezonans enerji transferi ve floresan polarizasyon teknikleri ile karakterize edilen aptamerin DUX4'e yüksek afinite (K_d 'si yaklaşık 20nM) gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, dizi-yapı ilişkisinin önemi, DUX4'e karşı nanomolar bir afiniteye sahip olan optimize edilmiş bir DNA aptamer varyantı ile gösterilmiştir. Bu sayede, spesifik yapısal elementlerin (bulge loop, hairpin gibi) transkripsiyon faktörü bağlayıcı oligonükleotidlere eklenmesinin spesifikliği ve afiniteyi artırabileceği gösterilmiştir (Klingler et al., 2020).

Daha öncesinde de belirtildiği gibi, transkripsiyon faktörleri arasındaki protein-protein etkileşimleri de transkripsiyonun başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Choi et al. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada β -katenin bağlayıcı RNA aptamerinin, transkripsiyon kompleksindeki protein-protein etkileşimi ve hedef genin ekspresyon düzeyine olan etkisi incelenmiştir. β -katenine karşı geliştirilen pU6- β -cat-Apt'in, β -katenin ve NF- κ B p50 arasındaki protein-protein etkileşimini engellediği GST-pull-down yöntemi ile incelendikten sonra, 293T ve HepG2 hücre hatlarında CRP ekspresyonunu azaltabildiği de gösterilmiştir. Özellikle, β -katenin bağlayıcı pU6-b-cat-Apt, *in vitro* yüksek afinitesi (K_d 'si 10 nM) ve kolon kanseri hücre hatlarında β -katenin aracılı transkripsiyon ve tümörigenezin inhibe edebilme özelliği sayesinde β -katenin ve T-hücre faktör ailesi proteinleri arasındaki etkileşimi bozmada umut verici bir araç olarak öne sürülmüştür.

Başka bir çalışmada, insan transkripsiyon faktörü NF- κ B'ye spesifik olarak bağlanan bir RNA aptameri geliştirilmiştir. Yüksek afiniteli RNA aptamerinin transkripsiyon faktörüne DNA ile rekabetçi bir yaklaşımla bağlandığı gösterilmiştir. NF- κ B'nin p50 homodimer formuna karşı seçilmiş olan bu aptamer,

NF- κ B DNA'sına benzer bir afinite (K_d 'si yaklaşık 1nM) ile bağlanmıştır (Cassiday and Maher, 2001; Lebruska and Maher, 1999).

Literatürde, transkripsiyon faktörlerine karşı tanımlanmış birçok inhibitör olmasına rağmen, bu inhibitörlerin bilinmeyen etkileri ve/veya istenmeyen aktiviteleri söz konusudur. İnhibitör olarak kullanılan doğal ve sentetik küçük moleküller, hedef dışı etkilere sahip spesifik olmayan inhibitörler olduklarından dolayı, beklenmeyen etkilere neden olabilmektedirler (Fouzder et al., 2021; Yin, 2019; Bushweller, 2019). Aksine aptamerler, hedeflerini yüksek spesifik ile tanıyan yapılar olarak işlev görmektedir.

Diğer taraftan, transkripsiyon faktörlerine karşı tanımlanmış peptid inhibitörleri de mevcuttur (Brennan et al., 2022; Simov et al., 2021). Hedeflerine yüksek afinite gösteren inhibitör peptidler geliştirilmesine rağmen, proteolitik kararsızlıkları ve hızlı bir şekilde metabolize edilmeleri bunların dokularda birikimlerini engelleyerek etkinliklerini düşürmektedir (Henninot et al., 2018). Aptamerler ise proteazlara karşı dirençli yapılarının yanısıra uygun kimyasal modifikasyonlar ile en etkin şekilde uygulanma potansiyeline sahiptir (Kratschmer and Levy, 2017; Peng and Damha, 2007).

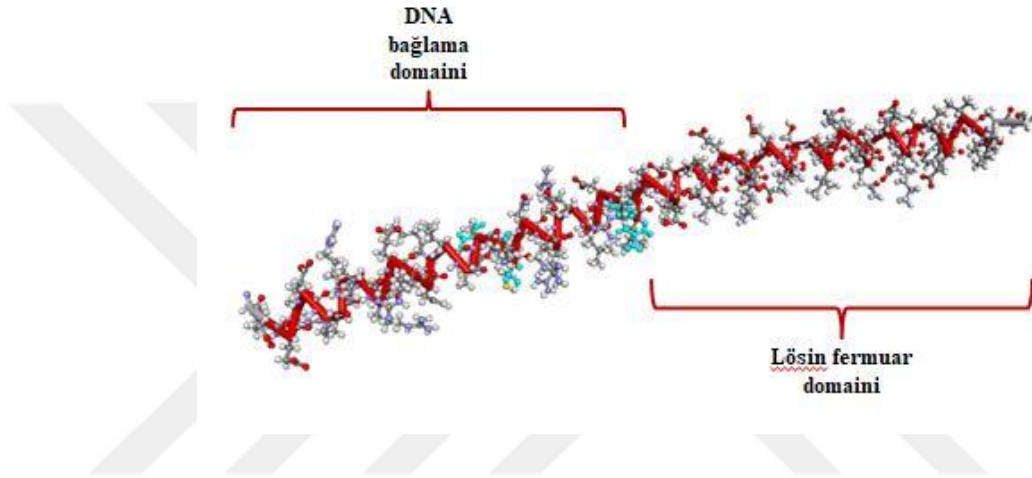
Small interfering RNA (siRNA), small hairpin RNA (shRNA) ve mikro RNA (miRNA)'lar da gen regülasyonunda önemli rollere sahip kodlamayan RNA'lardır ve transkripsiyon faktörlerin inhibisyonu için kullanılmaktadırlar (Chiarella et al., 2021; Li et al., 2018b; Ahmad et al., 2017; Lam et al., 2015). Ancak, hedef dışı etki göstermeleri, *in vivo* stabiliteilerinin düşük olması ve hücreye girişte yaşanan sınırlamalar en büyük eksiklikleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Catuogno et al., 2012; Lam et al., 2015). Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlandıktan sonra hücre içine giriş yapabilmeleri, aptamerleri siRNA, shRNA, miRNA ve geleneksel küçük moleküllü ilaçlara kıyasla daha avantajlı hale getirmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Proteinleri Kodlayan Genlerin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

3.1.1 DNA fragmentlerinin standart PCR ile amplifikasyonu

Proteinlerin bZIP domainlerini içerecek şekilde, FosB (153-219. amino asitler), JunD (266-332. amino asitler) ve c-Fos (139-193. amino asitler) proteinlerini kodlayan gen fragmentleri GENEWIZ (NJ, ABD) firmasından kodon optimize şekilde temin edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1 FosB (153-219. amino asitler), JunD (266-332. amino asitler) ve c-Fos (139-193. amino asitler) bZIP domaini. (PDB kodu: 5VPE).

İlgili gen fragmentlerinin PCR ile amplifikasyonu için ileri ve geri primerlerin 5' ucu *Bam*HI, 3' ucu ise *Xho*I restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini içerek şekilde ücretsiz Unipro UGENE programı kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerler,

FosB gen fragmenti için;

5' primer: 5'-CGCGGATCCATGGAAGAAGAAGAAAACGC-3'

3' primer: 5'-CCGCTCGAGTTTATGGGCAACCAGAACGAACCTC-3'

c-Fos gen fragmenti için;

5' primer: 5'-CGCGGATCCATGGAAGAAGAAGAAAACGCCGC-3'

3' primer: 5'-CCGCTCGAGGCGATGCGCCGCCAGAATAAATT -3'

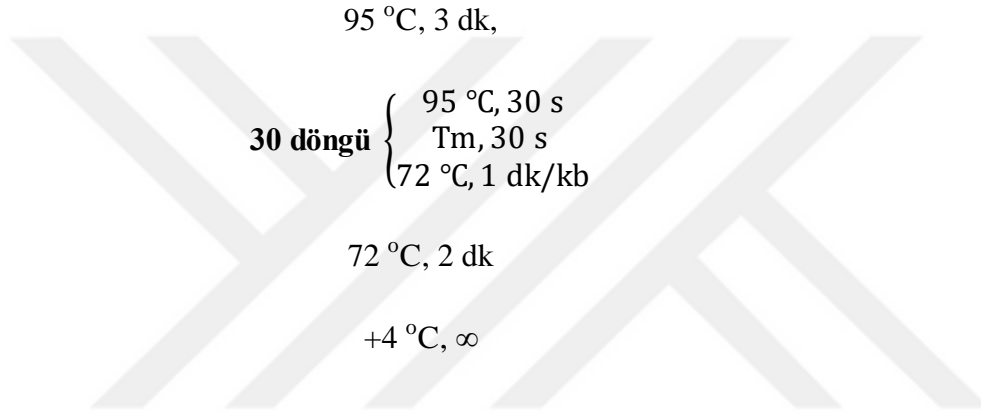
JunD gen fragmenti için:

5' primer: 5'-CGCGGATCCATGCAAGAACGCATCAAAGCC-3'

3' primer: 5'-CCGCTCGAGAACGTGGCTCAGCACTTTCTGTT-3'

Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firmasından temin edildi.

Bu gen fragmentlerinin amplifikasyonu için kalıp DNA 4 ng/μL, Color Opti Taq DNA Polimeraz (1 U/μL) 1,25 U, her bir dNTP 0,2 mM ve primer ise 1 μM olacak şekilde MgCl₂ içeren 10XB polimeraz reaksiyon tamponu kullanılarak reaksiyon hazırlandı ve standart PCR protokolü uygulandı:



3.1.2 DNA fragmentlerin restriksiyon endonükleazları ile kesimi

DNA fragmentlerinin kesimi spesifik palindromik dizileri tanıyan *BamHI*-HF ve *XhoI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs.) ile gerçekleştirildi. 30 μLlik reaksiyon hacminde, en fazla 500 ng DNA örneği ve 1 μg pET-21a(+) vektörü olacak şekilde restriksiyon enzimleri ile 37 °C'de 2-3 saat ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı. Tampon olarak üretici firma tarafından tavsiye edilen CutSmart (New England Biolabs.) tamponu kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilen DNA örnekleri için Macherey Nagel PCR Clean Up kiti kullanılarak jel ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3.1.3 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel (% 1-3 w/v) (PRONA), TAE tamponunda hazırlandı. Görüntüleme için amaca uygun olarak SafeView™ Classic (Abm) veya SYBR® Green I boyaları kullanıldı. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 1X TAE tamponunda 120 V da yaklaşık 15-20 dk yürütüldü.

Tris-Asetik-asit-EDTA (TAE) tamponu

40 mM Tris, 20 mM asetik asit ve 1 mM EDTA olacak şekilde saf suda hazırlandı.

3.1.4 Ligasyon

Ligasyon, restriksiyon kesim sonrasında pET-21a(+) vektörün ve DNA fragmentlerinin 1:3 ve 1:5 mol oranlarında bir araya getirilmesi ile gerçekleştirildi. Hazırlanan ligasyon karışımı 1U T4-DNA-Ligaz (ThermoScientific) varlığında gece boyu 4-8 °C'de inkübasyona bırakıldı. Son olarak, reaksiyonun sonlandırılması için ligasyon karışımı 60 °C'de 15 dk bekletildi.

3.1.5 Kimyasal kompetent *E.coli* hücrelerin hazırlanması

Klonlama ve protein ekspresyon suşu olarak sırasıyla *E. coli* DH5a (New England Biolabs) ve *E. coli* BL21(DE3) Rosetta 2 (Novagen) hücreleri kullanıldı. Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanmasında ilk olarak, *E. coli* hücreleri gece kültürü için LB ortamında gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, hücreler antibiyotik içermeyen 100 mL'lik taze LB ortamına inokule edildi. *E. coli* hücreleri 37 °C'de OD₆₀₀ 0,5 'e ulaşana kadar inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücreler 50 mL'lik steril falkon tüplerine alınarak buzda 15 dk bekletildikten sonra 10 dk 4 °C'de 3600 rpm'de santrifüjlendi. Hücre pelleti 30 mL Tfb1 tamponu ile süspansedildi ve 15 dk daha buzda bekletildi. Aynı koşullarda santrifüj tekrarlandıktan sonra, hücre pelleti 5 mL Tfb2 tamponu ile süspansedildi. Süspansedilen hücreler, 1,5 mL'lik ependorf tüplerine her biri 100-200 µL olacak şekilde porsiyonlandı ve daha sonra da kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

Luria-Bertani-(LB):

% 0,5 Maya ekstraktı, % 1 NaCl, % 1 Tripton olacak şekilde saf suda hazırlandı.

Tfb1 tamponu

100 mM KCl (veya RbCl), 50 mM MnCl₂, 30 mM potasyum asetat, 2 mM CaCl₂, %15 gliserol, pH 5,8 olacak şekilde saf suda hazırlandı.

Tfb2 tamponu

10 mM KCl (veya RbCl), 75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, %15 gliserol, pH 6,8 olacak şekilde saf suda hazırlandı.

Tfb1 ve Tfb2 tamponları, steril filtereden geçirildikten sonra kullanılabildiği kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.6 Transformasyon

Transformasyon için önceden hazırlanmış olan kompetent hücrelerin üzerine 10 µL ligasyon karışımı (örnek plazmid DNA ise 1 µL (100-200 ng)) ilave edildi. Ardından, hücreler buzda 30 dk, 42 °C'de 45 s inkübe edildikten sonra yine buzda 15 dk inkübe edildi. Ardından, 800-900 µL LB eklendi ve hücreler 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Son olarak, hücre süspansiyonu seçici agar ortamlarına yayılarak gece boyu 37 °C'de inkübe edildi.

LB-Agar

LB-Medium (% 0,5 Maya ekstrakt, % 1 NaCl, % 1 Tripton) ve % 1,5 Agar olacak şekilde saf suda hazırlandı.

3.1.7 Koloni PCR

Transformasyon sonrası, hücrelerin hedef DNA fragmentini içeren vektörü taşıyıp taşımadığını belirlemek için pET-21a(+) vektörüne spesifik evrensel T7 Promotor ve T7 Terminatör primerleri kullanılarak koloni PCR gerçekleştirildi:

T7_Promotor primer

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GC-3'

T7_Terminatör primer

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firmasından temin edildi.

LB agar ortamındaki tek düşen koloniler steril kürdan yardımıyla önce PCR tüpüne sonra da yeni bir LB agar ortamına aktarıldı. Koloni PCR için her bir tüpe 10 µL olacak şekilde standart PCR karışımı hazırlandı.

Koloni PCR koşulları:

95 °C, 5-7 dk,

30 döngü $\left\{ \begin{array}{l} 95 \text{ }^\circ\text{C}, 45 \text{ s} \\ 55 \text{ }^\circ\text{C}, 45 \text{ s} \\ 72 \text{ }^\circ\text{C}, 1 \text{ dk/kb} \end{array} \right.$

72 °C, 10 dk

+4 °C, ∞

PCR sonrası örnekler agaroz jele yüklendi ve ilgili geni içeren vektörleri taşıyan koloniler bu şekilde belirlendi.

3.1.8 Sanger sekans analizi

Vektörlere klonlanan genlerin dizi analizleri Eurofins Genomics (Almanya) firması tarafından yapıldı. Örnekler firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Unipro UGENE yazılımı kullanılarak sekans sonuçları analizlendi.

3.2 Proteinlerin Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması

3.2.1 Test ekspresyonu

pET-21a(+) ekspresyon vektörüne klonlanan FosB (153-219. amino asitler), JunD (266-332. amino asitler) ve c-Fos (139-193. amino asitler) proteinleri kodlayan gen fragmentleri *E. coli* BL21(DE3) Rosetta 2 hücrelerine transforme edildikten sonra proteinlerin rekombinant üretimi ve saflaştırılması işlemlerini optimize etmek için öncelikle küçük ölçekte (test) ekspresyonları gerçekleştirildi. Hücreler, gece kültürü için gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Hem LB hem de otoindüksiyon büyüme ortamı olmak üzere iki farklı üretim ortamında test ekspresyonu gerçekleştirildi. Hücreler, öncelikle OD₆₀₀ 0,4-0,5 değerine ulaşıncaya kadar 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Hedeflenen OD₆₀₀ değerine

ulaşılınca hücreler 0,5 mM izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) ile indüklendikten sonra 20 °C'de gece boyu inkübe edildi. Otoindüksiyon büyüme ortamı için OD₆₀₀ (0,3-0,4 değerine) ulaşılmca sıcaklık 20 °C'ye düşürülerek gece boyu inkübasyon gerçekleştirildi. Proteinlerin rekombinant üretim sonrası saflığını ve ekspresyon düzeyini kontrol etmek için Co-NTA magnetik agaroz boncuklar (Jena BioScience, Germany. Kat. No: AC-602-5) kullanılarak küçük ölçekli saflaştırma işlemi yapıldı. Proteinlerin saflığı %16 Tricine-SDS-PAGE jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.2.2 Trisin-SDS-PAGE

Schägger (2006) tarafından yayınlanan çalışmaya uygun şekilde % 16 Trisin-SDS-PAGE hazırlandı (Tablo 3.1). Örnekler, örnek yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dk bekletildi. Jel, 5 μ L örnek yüklendikten sonra 30 mA, 80 V yaklaşık 50 dk yürütüldü.

Tablo 3. 1 %16 Trisin-SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan kimyasalların oranları (2 jel hazırlamak için uygundur).

	Üst jel (% 4)	Alt jel (% 16)
AB karışımı	1 mL	10 mL
Alt veya üst jel tamponu	3 mL	10 mL
Üre	-	10,8 g
APS (% 10)	90 μ L	100 μ L
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	9 μ L	10 μ L
H₂O	12 mL	30 mL

Trisin-SDS-PAGE tamponları ve çözeltileri:

Örnek yükleme tamponu

%12 SDS (w/v), %6 merkaptoetanol (v/v), %30 gliserol (w/v), %0,05 Coomassie blue G-250, 150 mM Tris (pH 7,0)

10X Anot tamponu

2 M Tris (pH 8,9)

10X Katot tamponu

1 M Tris, 1 M Trisin, %1 SDS (w/v) (pH 8,25)

3X Alt jel tamponu

3 M Tris, %0,3 SDS (w/v) (pH 8,9)

Üst jel tamponu

1 M Tris (pH 6,8)

Akrilamid/Bis-akrilamid (AB) karışımı

46,5 g akrilamid, 3 g bis-akrilamid son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile hazırlandı.

Amonyum persülfat (APS) stok çözeltisi

%10 APS (w/v) saf suda hazırlandı.

Coomassie boyama çözeltisi

%0,2 Coomassie Brilliant Blue G250, %10 asetik asit, %50 etanol olacak şekilde hazırlanan çözelti filtreden geçirildi.

3.2.3 Büyük ölçekli üretim

Büyük ölçekli üretim için her biri 100 mL olacak şekilde 5 adet erlende otoindüksiyon büyüme ortamı hazırlandı (Lane and Seelig, 2016). Her bir 100 mL'lik ortam için, son konsantrasyonu 50 µg/mL olacak şekilde ampicilin eklendi ve 200 µL gece kültürü inoküle edildi. Hücreler, 37 °C'de OD₆₀₀ 0,3-0,4 değerine ulaşıncaya kadar inkübasyona bırakıldı. Ardından, sıcaklık 20 °C'ye düşürülerek inkübasyona gece boyu devam edildi. İnkübasyon sonrasında, hücreler santrifüjlenerek (4 °C, 4000 rpm, 30 dk) üretim ortamından ayrıldı. Pellet, homojenizasyon tamponu (20 mM Tris; 2 mM TCEP; 500 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8,0) ile resüspanse edildi ve buz üstünde ultrasonik homojenizatör yardımı ile hücreler homojenize edildi (5s on, 10 s off, %50 amplitude, 15 dk). Homojenat, eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra santrifüjlendi (4°C, 15000 rpm,

30 dk). Süpernatantlar ayrı bir falkon tüpünde toplandıktan sonra 0,45 µm enjektör filtresinden geçirildikten sonra kolona yüklendi.

Otoindüksiyon büyüme ortamı

%2 Tripton, %0,5 Maya ekstrakt, 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, %0,5 NaCl, %8 laktoz, %60 gliserol, %10 glukoz,

3.2.4 Metal şelat afinite kromatografisi

HisTrapTM HP crude kolon (GEHEALTHCARE) kullanılarak ÄKTAprime plus sisteminde proteinlerin saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Kolon, homojenizasyon tamponu ile dengelendikten sonra süpernatant kolona örnek yükleme hızı 1 mL/dk olacak şekilde yüklendi. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması ve tekrardan sistemin dengelenmesi için kolon aynı tampon ile yıkandı. Elüsyon tamponu (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol; 2 mM TCEP; pH 8,0) ile gradient elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen fraksiyonlar %16 Tricine-SDS-PAGE'e uygulandı.

3.3 SELEX ile Hedef Spesifik DNA Aptamerlerinin Geliştirilmesi

3.3.1 Rekombinant proteinlerin Co-NTA manyetik agaroz boncuklara non-kovalent immobilizasyonu

Ticari olarak alınan rekombinant tam uzunluktaki c-Fos proteini (Abcam, katalog no: ab84143) ve rekombinant olarak üretilen c-Fos ve FosB proteinleri Co-NTA manyetik boncuklara ayrı ayrı immobilize edildi. 6xHis-etiketli proteinlerin immobilizasyonu amacı ile 6xHis ve Ni²⁺, Co²⁺ gibi geçiş metalleri arasındaki afiniteden yararlandı. Hedef proteinlerin immobilizasyonu için üretici tarafından önerilen protokol uygulandı. Proteinler, Co-NTA manyetik boncuklar ile 45 dk çalkalamalı olarak 25 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında protein immobilize edilmiş manyetik boncuklar mıknatis yardımıyla 3 kez tampon ile yıkandı. İlk aşamada uzaklaştırılan üst fazda Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı (Bradford, 1976). Başlangıçta ortama eklenen toplam protein miktarı dikkate alınarak, manyetik boncuğa immobilize edilmiş protein miktarı belirlendi. Rekombinant protein immobilize manyetik boncuklar, uygun tamponunda süspansiyon edilerek +4 °C'de saklandı.

3.3.2 *In vitro* spesifik DNA aptamerlerinin seçimi

6xHis-etiketli proteinlere karşı DNA aptamerlerin geliştirilmesi amacı ile, manyetik boncuk temelli SELEX yöntemi kullanıldı. Hedefin manyetik boncuklara non-kovalent immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Bağlanma tamponu olarak, satın alınan rekombinant tam uzunluktaki c-Fos için 20 mM Tris, %10 gliserol, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, %0,05 Tween 20, pH 7,9; c-Fos ve FosB için ise 20 mM Tris, 120 mM NaCl, 2 mM TCEP, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, %0,05 Tween 20, pH 7,6 tamponları kullanıldı. Bağlanma tamponunda hazırlanan ssDNA kütüphanesi 95 °C'de 10 dk, 4 °C'de 10 dk ve ardından inkübasyon sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Aptamer katlama işleminin ardından, ssDNA kütüphanesi ve protein-immobilize manyetik boncuğun inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon adımının ardından, bağlanmayan ssDNA dizileri tampon ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Proteine bağlı olan ssDNA dizilerin elüsyonu için, manyetik boncuklar 80 °C'de 10 dk inkübe edildi. Elüe edilen ssDNA dizileri Tablo 3.2' de verilen PCR koşullarında çoğaltıldı. Bir sonraki SELEX turunda kullanılmak üzere PCR sonucunda elde edilen dsDNA, lambda ekzonükleaz ile muamele edildi. Boş manyetik boncuk yüzeyine non-spesifik olarak bağlanan ssDNA dizilerinin eliminasyonunu amacı ile negatif-SELEX gerçekleştirildi. Boş manyetik boncuğa bağlanmayan ssDNA havuzu ile SELEX'e devam edildi. En yüksek afiniteli aptamerlerin seçilebilmesi amacı ile, SELEX turları süresince aptamer ve hedef protein arasındaki etkileşim koşulları kademeli olarak zorlaştırıldı. Benzer SELEX çalışmaları referans alınarak, counter-SELEX, inkübasyon süresinin kısaltılması, tampon ile yıkama sayısının artırılması, kullanılan hedef protein:ssDNA havuzu molar oranının düşürülmesi, salmon sperm DNA kullanılması gibi değişiklikler yapıldı (Cao et al., 2014; Valenzano et al., 2016; Klingler et al., 2020; Shatila et al., 2020). Her tur sonunda elde edilen ssDNA konsantrasyonu, 260 nm'de absorban ölçümü alınarak (BioTek Epoch mikropłaka okuyucu, Take3 plate) belirlendi.

SELEX için başlangıç kütüphanesi olarak rasgele ssDNA kütüphanesi, Alpha Diagnostic firmasından (katalog no: DAL-N-40) temin edildi. 40 bazlık rastgele bölge içeren 83 nükleotidlik 10¹⁴-10¹⁵ farklı diziden oluşmaktadır.

Alpha DAL-N-40 kütüphanesi:

5'-AGGAATTCAGATCTCCCTGCAG-(N)40-
CTCGAGGAGCTCAGGATCCCG -3'

İleri Primer (fw):

5'- AG GAATTC AGATCT CC CTGCAG -3'

Geri Primer (rv):

5'- (PHO) CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG -3'

Eurofins Genomics (Almanya) firmasından temin edildi.

Tablo 3.2 PCR reaktif içeriği.

Bileşen	Miktar (µL)	Son Derişim
10X PCR Tamponu	110	1X
dNTP karışımı (10 mM her biri)	22	0,1 mM
İleri primer (100 µM)	11	0,1 µM
Geri primer (100 µM)	11	0,1 µM
VitaTaq DNA Polimeraz (5 U/µL)	4,4	1 U
DTT	22	2 mM
Kalıp DNA	220	
dH ₂ O	699,6	
TOPLAM (µL)	1100	

PCR koşulları:

95 °C, 3 dk,

Tekrar döngü $\left\{ \begin{array}{l} 95 \text{ }^{\circ}\text{C}, 30 \text{ s} \\ 64 \text{ }^{\circ}\text{C}, 30 \text{ s} \\ 72 \text{ }^{\circ}\text{C}, 30 \text{ s} \end{array} \right.$

72 °C, 2 dk

+4 °C, ∞

3.3.3 Lambda ekzonükleaz ile ssDNA eldesi

Bir sonraki SELEX turunda kullanmak üzere PCR ile amplifiye edilen dsDNA'nın ssDNA formuna dönüştürülmesi için 5' fosforillenmiş dizilere

seçimlilik gösteren Lambda ekzonükleaz (New England Biolabs.) kullanıldı (Frith et al., 2018; Avcı-Adalı et al., 2009). İlk olarak, 1 µg dsDNA için 10 U lambda ekzonükleaz olacak şekilde hazırlanan reaksiyon 37 °C’de yaklaşık 90 dk süre ile 300 rpm’de inkübe edildi. Kesimin tamamlanıp tamamlanmadığını belirlemek için belirli aralıklarla örnek alınarak %3 ’lük agaroz jelde kontrol edildi. Son olarak da reaksiyon, 80 °C’de 10 dk inkübe edilerek sonlandırıldı ve Macherey Nagel PCR Clean Up kiti ile ssDNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.3.4 Yeni-nesil sekanslama (NGS)

Farklı SELEX turlarından elde edilen ssDNA havuzları için NGS ve biyoinformatik analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi (Komarova et al., 2020; Ul-Haq et al., 2019; Schütze et al., 2011). Her bir ssDNA havuzunu çoğaltmak için farklı primerler kullanıldı. Koyu işaretlenmiş diziler, her bir primer setindeki barkod dizilerini belirtmektedir. Dört farklı SELEX turundan elde edilen her bir örnek için farklı primer dizileri kullanıldı:

R1_Fw 5'-**ATCACG** AGG AAT TCA GAT CTC CCT GCA G-3'

R1_Rv 5'-**CGTGAT** CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG-3'

R2_Fw 5'-**CGATGT** AGG AAT TCA GAT CTC CCT GCA G-3'

R2_Rv 5'-**ACATCG** CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG-3'

R3_Fw 5'-**TTAGGC** AGG AAT TCA GAT CTC CCT GCA G-3'

R3_Rv 5'-**GCCTAA** CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG-3'

R4_Fw 5'-**TGACCA** AGG AAT TCA GAT CTC CCT GCA G-3'

R4_Rv 5'-**TGGTCA** CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG-3'

R5_Fw 5'-**ACAGTG** AGG AAT TCA GAT CTC CCT GCA G-3'

R5_Rv 5'-**CACTGT** CGGG ATC CTG AGC TCC TCG AG-3'

NGS ile elde edilen sonuçlardan yararlanılarak yüksek afiniteli aptamerlerin belirlenmesi için, zenginleşme katsayısı (Zk) hesaplandı.

$$Z_k = \frac{\text{Sekansın okunma sayısı}}{\text{Toplamda okunan sekans sayısı}}$$

Aptamer adayları, zenginleşme katsayılarına göre sıralandı ve en yüksek zenginleşme katsayısına sahip aptamer adayları belirlendi. NGS sonrası en yüksek zenginleşme katsayısını dikkate alan çalışmalar referans alınarak farklı sayılarda aptamer adayları belirlendi. (Al-Ogaili et al., 2020; Eaton et al., 2015; Thiel et al., 2012;).

3.3.5 Aptamer dizilerinin analizi

NGS sonrası aptamerler arasındaki zenginleşmenin ve korunmuş motiflerin incelenmesi için MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) internet sunucusu kullanıldı. Final turunda elde edilen en popüler dizilerin çoklu dizi analizi, varsayılan parametreler kullanılarak Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) internet sunucusu ile gerçekleştirildi. Aptamer dizilerinin ikincil yapı analizleri, serbest enerji minimizasyon algoritması vasıtasıyla sıcaklık (°C) ve Na⁺ ve Mg²⁺ derişimleri (mM) dikkate alınarak Mfold (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) internet sunucusu kullanılarak gerçekleştirildi (Zuker, 2003). G açısından zengin oligomerler, kararlı G-quadrupleks (G4) yapıları katlanma yeteneğine sahiptirler (Moreira et al., 2022). Bu yapı sayesinde, G4 yapısını oluşturan G bakımından zengin aptamerler, termodinamik ve kimyasal olarak kararlılık, çok sayıda serum nükleazına karşı dirençlilik gibi çok sayıda avantaja sahiptirler (Li et al., 2021c; Roxo et al., 2019; Opazo et al., 2015). Aptamer dizilerinde G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeli olan dizilerin belirlenmesi için QGRS Mapper (<https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>) web sunucusu kullanıldı (Kikin et al., 2006).

3.4 Aptamerin Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi

Aptamerlerin disosiasyon sabitlerinin (K_d) belirlenmesi amacı ile ITC ve EMSA yöntemleri kullanıldı. Kullanılacak olan aptamerler, Eurofins Genomics (Almanya) firmasından temin edildi.

3.4.1 İzotermal titrasyon kalorimetresi (ITC)

Seçilen aday aptamerlerin hedef proteine bağlanma afiniteleri (K_d değerleri) ITC ölçümleri ile belirlendi. ITC, biyomolekülerin etkileşimlerinin karakterizasyonu için standart olarak kullanılan bir metottur (Pagano et al., 2009). Aptamer adaylarının hedefe spesifikliğini belirlemek için ITC ölçümleri sonucu elde edilen termodinamik parametrelerden yararlandı. Aday aptamerlerin hedef proteine bağlandığının doğrulanması için gerekli ölçümler, EGE-MATAL merkez laboratuvarında bulunan Malvern MicroCal PEAQ-ITC (Malvern, United Kingdom) cihazı ile gerçekleştirildi. ITC, moleküllerin etkileşimi ile ısıya açığa çıkması veya absorbe edilmesi sonucunda etkileşime ilişkin termodinamik parametrelerin (bağlanma ilgisi (K_d), reaksiyon stoikiyatrisi (N), entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS)) doğru bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır (Sakamoto et al., 2018). Bu bilgiler doğrultusunda, tampon ortamındaki aptamer adayı, protein ile titre edildi. Titrasyon eğrileri, cihazın yazılımı kullanılarak analizlendi ve K_d değerleri belirlendi.

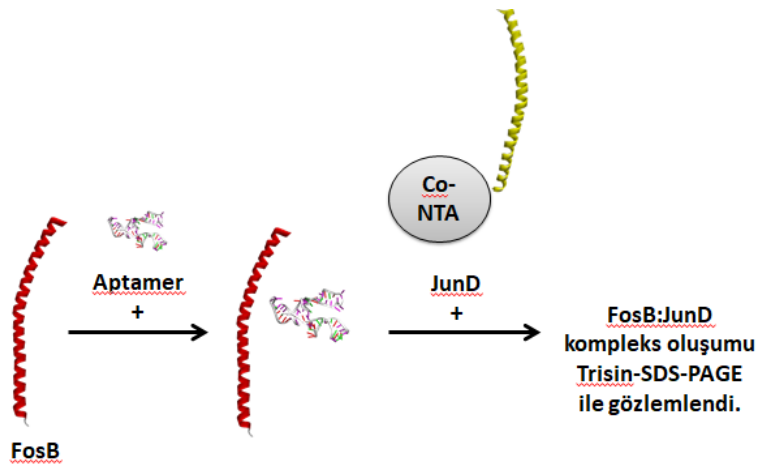
3.4.2 Elektroforetik mobilite shift assay (EMSA)

Elektroforetik mobilite shift assay (EMSA), protein-nükleik asit etkileşimlerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (Perea and Greenbaum, 2020; Hellman and Fried, 2007). EMSA, aptamer-protein kompleksinin hızlı bir şekilde direkt olarak gözlenebilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, aptamer-protein etkileşiminin gözlenebilmesi için EMSA yöntemi kullanıldı. EMSA, Seo et al. (2019) tarafından yayınlanmış çalışma dikkate alınarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, 125 nM aptamer ile farklı konsantrasyonlarda (0; 0,5; 0,6; 0,7; 0,9; 1,25; 2; 2,5; 3 ve 6 μ M) hazırlanmış hedef protein, toplam reaksiyon hacmi 20 μ L olacak şekilde, bağlanma tamponunda 37 °C'de yaklaşık 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örnekler %5 'lik poliakrilamid jele yüklenerek 60 V'da yürütüldü. İşlem sonlandırıldıktan sonra jel ile SYBR Gold yaklaşık 30 dk inkübe edildi ve jel transiluminatörde görüntülendi.

3.5 Aptamerin İnhibisyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.5.1 6xHis-etiketli protein pull-down assay

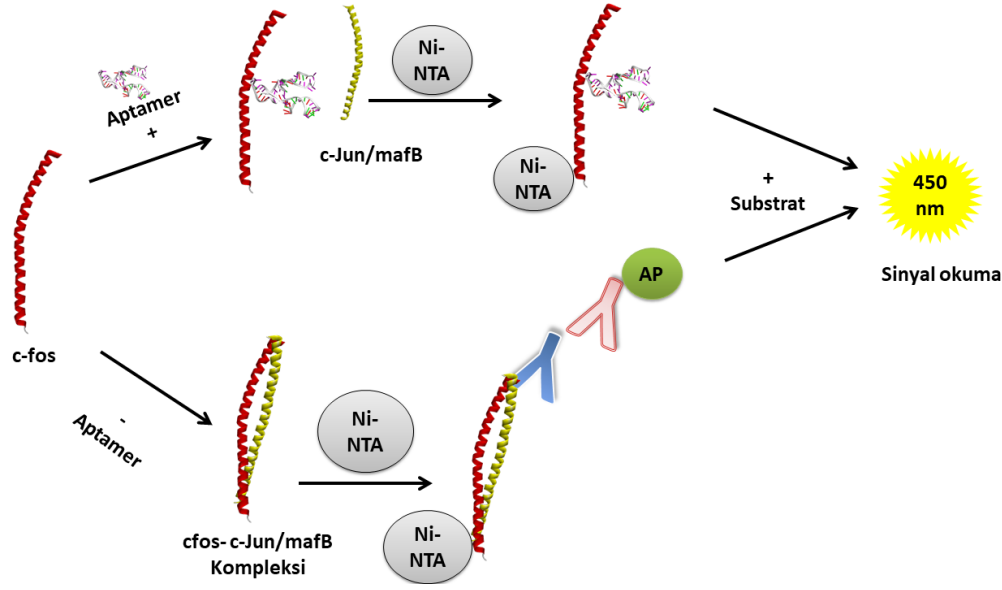
Pull-down assay, protein etkileşimlerinin çalışılmasında kullanılan *in vitro* bir tekniktir. Şekil 3.2’de şematize edildiği gibi bu yöntem, oluşan protein kompleksinin manyetik alan oluşturularak ortamdan ayrılması ve sonrasında da SDS-PAGE’de görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır (Dawei et al., 2016; Busschots et al., 2005). İlk olarak, seçilen aday aptamerin farklı konsantrasyonları (0; 0,25; 0,5; 1; 5 μM) ile FosB (0,02 mg/mL) son reaksiyon hacmi 200 μL olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Ardından, Co-NTA magnetik agaroz boncuklara immobilize edilen 6xHis-etiketli JunD (0,02 mg/mL) reaksiyon ortamına eklenerek inkübasyona devam edildi. 6xHis-etiketli JunD sayesinde Co^{+2} kaplı manyetik boncuklar tarafından bağlanan FosB:JunD kompleksi için %16 Trisin-SDS-PAGE gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak, benzer adımlar kullanılarak yalnızca 6xHis-etiketli JunD ve yalnızca FosB içeren örnekler de hazırlandı. Trisin-SDS-PAGE sonucunda, protein kompleksinin yüklendiği kuyucuklardaki protein bantları ayrı ayrı yüklenen serbest JunD ve serbest FosB protein bantları ile karşılaştırıldı. Son olarak da jel görüntüsü ImageJ programı ile analizlendi ve FosB’e ait bandın yoğunluğundaki değişim belirlendi. IC_{50} değeri ise AAT Bioquest internet sunucu aracılığıyla hesaplandı (Kaska and Seçme, 2023; Ziganshina et al., 2023).



Şekil 3. 2 FosB:JunD kompleks oluşumunun inhibisyonunun doğrulanması amacı ile gerçekleştirilen pull-down assay şematik gösterimi.

3.5.2 Ni-NTA manyetik agaroz boncuk temelli kolorimetrik analiz

Şekil 3.3'te şematize edildiği gibi seçilen aday aptamerin, c-Fos:c-Jun ve c-Fos:MafB protein etkileşimleri üzerine olan inhibisyon düzeyinin belirlenmesi amacı ile mikrolaka okuyucu kullanılarak kolorimetrik analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.4) (Hu et al., 2022; Dawei et al., 2016). 6xHis-etiketli tam uzunluktaki c-Fos (Abcam, katalog no: ab84143), GST-etiketli c-Jun (Novus biologicals, katalog no: H00003725-P01) ve GST-etiketli MafB (Abcam, katalog no: ab132192) ilgili firmalardan temin edildi. İlk olarak, uygun konsantrasyonlara seyreltilmiş aptamerin (50 ve 100 nM) katlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından, c-Fos (0,25-0,5 mg/mL) eklenerek aptamer ile 400 rpm 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, son reaksiyon hacmi 100 µL olacak şekilde MafB veya c-Jun (0,25-0,5 mg/mL) eklenerek 45 dk daha inkübasyona devam edildi. Ardından, 5 µL HisPur™ Ni-NTA manyetik boncuk (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 88831) eklendi ve 1300 rpm'de 45 dk inkübasyona devam edildi. İnkübasyonun ardından, süpernatantın uzaklaştırılması için manyetik boncuk mıknatıs kullanılarak 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından, anti-GST antikor (1:4000) (Abcam, katalog no: ab111947) eklenerek 45 dk inkübe edildi. Manyetik boncuk tamponla yıkandıktan sonra anti-IgG alkalin fosfatase konjuge antikor (1:5000) (Abcam, katalog no: ab6722) eklendi ve aynı koşullarda 45 dk daha inkübasyona devam edildi. Son olarak, reaksiyona 100 µL alkalin fosfatase (ALP) substratı (pNPP) eklendi ve 30 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 450 nm'de absorban ölçümü yapıldı. Benzer adımlar rekombinant olarak üretilen c-Fos:MafB kompleksi için de gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3 c-fos ile c-Jun/MafB kompleks oluşumunun inhibisyonuna ilişkin kolorimetrik analizin şematik gösterimini.

3.6 Aptamerlerin Hücre ile Etkileşiminin İncelenmesi

Hücre kültürü çalışmaları için, RPMI 1640 (Biowest, L0501), FBS (Cytiva), DMEM, L-Glu, P/S ve PBS (Capricorn), Lipofectamine™ 2000 ve DAPI (Thermo-Fisher), jetPRIME (Polyplus), Asetik asit (Tekkim), SRB (Biomedicals), Trikolasetik asit (TCA) (AFG scientific), Tris baz (Wisent), (Thermo), Tripsin (Gibco) firmalardan temin edildi.

3.6.1 Hücre Kültürü ve Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada U-87 MG insan glioblastoma hücre hattı kullanıldı. U-87 MG hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 ortamında ve %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde büyütüldü. Hücreler ~%80 doluluk oranlarında tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılarak alt kültürlere pasajlandı.

Aptamerler, hücre kültürü denemelerinde kullanılmadan önce son konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde katlama tamponu (20 mM Tris; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; pH 7,6) içinde seyreltildi. Sırasıyla 20 dk 95 °C, 5 dk buz ve 5 dk 37 °C'de inkübe edilerek aptamerin katlanması sağlandı.

3.6.2 Hücre İçi Aptamer Alımı

U-87 MG hücreleri kuyu başına 100.000 hücre/2 mL olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi. Hücreler, adezyonun sağlanması için 24 saat normal koşullarda büyütüldü. Fluorescein amidite (FAM) işaretli FosBApt_1, jetprime transfeksiyon ajanı ile ve tek başına hücrelere verildi ve 24 saat sonra epifloresans mikroskopi ile görüntüledi. Görüntü alınmasından önce hücre büyüme ortamı uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı ve hücre içine girmeyen aptamerlerin uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama sonunda, hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla DAPI boyası eklenerek 5 dk inkübe edildi.

3.6.3 SRB Canlılık Testi

U-87 MG hücreleri, kuyu başına 10.000 hücre/100 μ L olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin adezyonu için normal büyüme koşullarında 24 saat beklendikten sonra aptamer uygulaması gerçekleştirildi. Aptamerlerin hücre içine girişinin sağlanması için transfeksiyon ajanı kullanıldı. Kuyu başına son konsantrasyonlar 0,4 μ L transfeksiyon ajanı ve 200, 400 ya da 600 ng aptamer içerecek şekilde deney tasarlandı. İlk olarak bir tüpte 25 μ L FBS içermeyen DMEM ortamı içinde 2 μ L Lipofectamine 2000 içeren çözelti hazırlandı. Bir diğer tüpte 25 μ L FBS içermeyen DMEM ortamı içinde 1 μ g, 2 μ g ya da 3 μ g aptamer içeren çözelti hazırlandı. Aptamer içeren çözelti, transfeksiyon ajanı içeren çözüme eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyuya 10 μ L eklenerek deney grupları 5 tekrarlı olarak çalışıldı. İkinci bir deney setinde ise aptamer miktarları sabit kalacak şekilde transfeksiyon ajanı miktarı azaltıldı ve son konsantrasyonu her kuyuda 0,2 μ L olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Herhangi bir hedefi olmayan rastgele diziyeye sahip aptamer kontrol grubu olarak kullanıldı. Aptamerler ile 48 saat inkübasyonun ardından kuyulara 27,5 μ L soğuk TCA (%50 w/v) eklenerek hücreler fikse edildi. 4 $^{\circ}$ C'de 1 saat inkübasyonun ardından kuyular distile su ile 5 kere yıkanarak TCA uzaklaştırıldı. Kuyulara 50 μ L SRB (%0,4 w/v, %1'lik asetik asit içinde) eklenerek, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi. Bağlanmayan SRB boyası, %1'lik asetik asit ile 5 kere yıkanarak uzaklaştırıldı. Bu aşamada hücreler faz kontrast mikroskopi ile incelenerek gruplar fotoğraflandı. Proteinlere bağlanan boyanın çözünmesi için kuyulara 150 μ L tampon (pH 10,0; 10 mM Tris)

eklenerek, orbital çalkalayıcıda 10 dk karıştırma işlemi gerçekleştirildi. Mikroplaka okuyucuda (BMG LABTECH - LUMIstar Omega) 564 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. 690 nm dalga boyunda ölçümler düzeltme için referans olarak kullanıldı. Hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer deney gruplarından elde edilen absorbans değerleri bu gruba oranlanarak rölatif hücre canlılığı hesaplandı. Veri görselleştirme için Prism (GraphPad, ver. 9) kullanıldı.



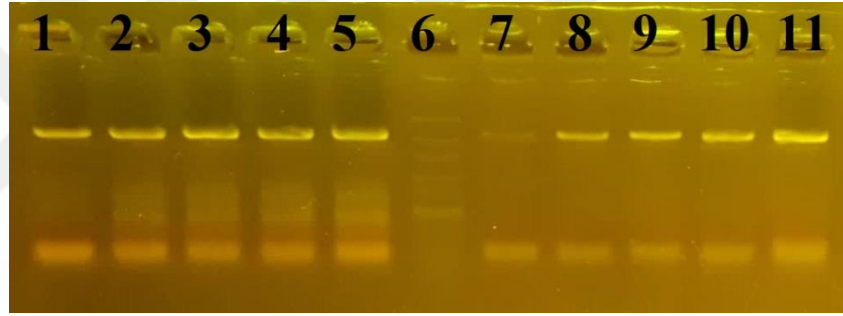
4. BULGULAR

4.1 Proteinleri Kodlayan Genlerin pET-21a(+) Vektörüne Klonlanması

4.1.1 FosB ve JunD proteinleri kodlayan genlerin pet21a(+) vektörüne klonlanması

FosB transkripsiyon faktörünün (153-219. amino asitler) ve JunD proteinini (266-332. amino asitler) kodlayan gen fragmentleri GENEWIZ (NJ, ABD) firmasından kodon optimize şekilde temin edildi.

Bu gen fragmentlerinin PCR ile çoğaltılması için, uygun restriksiyon tanıma bölgelerini içeren primerlerin optimum bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacı ile gradient PCR (58-60-62,5-65-68 °C) gerçekleştirildi. PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1).



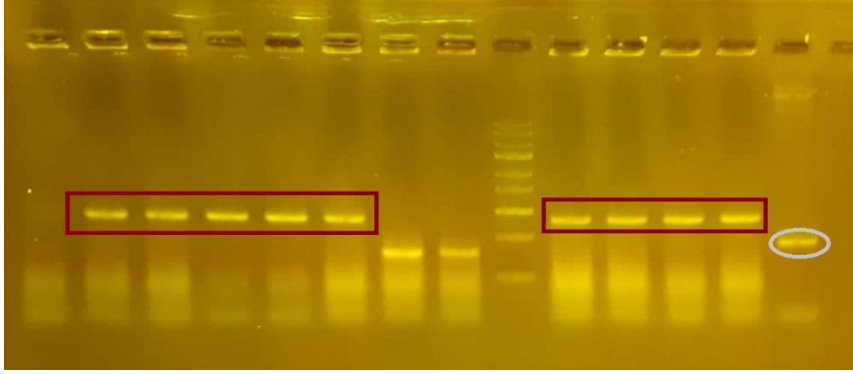
Şekil 4. 1 JunD ve FosB proteinlerini kodlayan gen fragmentlerinin gradient PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. (1-5. kuyucuklar JunD gen fragmenti, 6. DNA Marker (300-200-100-75-50-35-25-20-15-10 bp); 7-11. kuyucuklar FosB gen fragmenti (örnekler 58→68 °C olacak şekilde kuyucuklara yüklendi).

PCR gerçekleştirildikten sonra gen fragmentlerin pET-21a(+) vektörüne klonlanması için restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen pET-21a(+) %1 lik, diğer fragmentler ise %3'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.2). Sonrasında, DNA fragmentleri NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Almanya) ile jelden ekstrakte edildi ve ligasyon gerçekleştirildi.

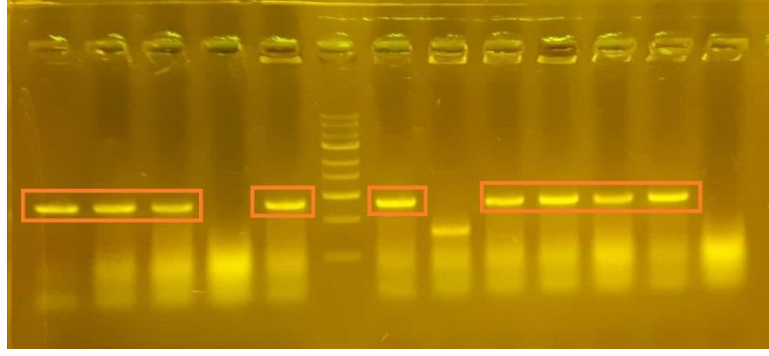


Şekil 4. 2 Restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş pET-21a(+) vektörü. (pET-21a(+) vektör için 5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 ve 100 bp DNA marker kullanıldı), JunD ve FosB DNA fragmentleri (Fragmentler için 300-200-100-75-50-35-25-20-15-10 bp DNA marker kullanıldı).

Ligasyonu karışımı kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi ve ardından ilgili geni taşıyan kolonilerin belirlenmesi için koloni PCR gerçekleştirildi. Koloni PCR için pET-21a(+) vektörüne uygun T7 promoter ve T7 terminator primerleri kullanıldı. PCR ürünleri kontrol edilmek üzere %1'lik agaroz jele yüklendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4. 3 Rastgele seçilen koloniler için uygulanan koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/*fosB* içerdiği belirlenen koloniler. (Yuvarlak içine alınan kuyucuğa kontrol olarak kullanılan boş pET-21a(+) vektörü yüklenmiştir) (Fragmentler için 300-200-100-75-50-35-25-20-15-10 bp DNA marker kullanıldı).

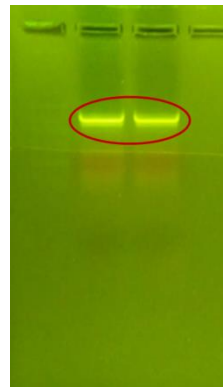


Şekil 4. 4 Koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/*junD* içerdiği belirlenen koloniler. (Fragmentler için 300-200-100-75-50-35-25-20-15-10 bp DNA marker kullanıldı).

JunD ve FosB transkripsiyon faktörünü kodlayan gen fragmentlerini taşıyan pET-21a(+) ekspresyon vektörünün *E. coli* BL21(DE3) Rosetta 2 hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.

4.1.2 c-Fos proteini kodlayan genlerin pET-21a(+) vektörüne klonlanması

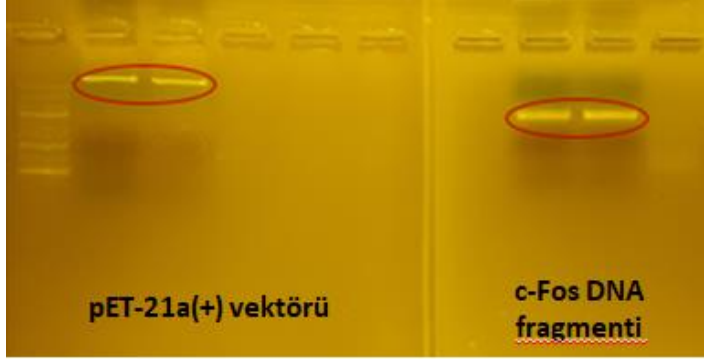
c-Fos transkripsiyon faktörünü (135-201. amino asitler) kodlayan gen fragmentleri GENEWIZ (NJ, ABD) firmasından kodon optimize şekilde temin edildi. Restriksiyon tanıma bölgelerini içeren 5' ve 3' primerleri kullanılarak, primer bağlanma sıcaklığı 65-68 °C'de PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5 c-Fos proteinini kodlayan gen fragmentlerinin gradient PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. (DNA Marker: 300-200-100-75-50-35-25-20-15-10 bp)

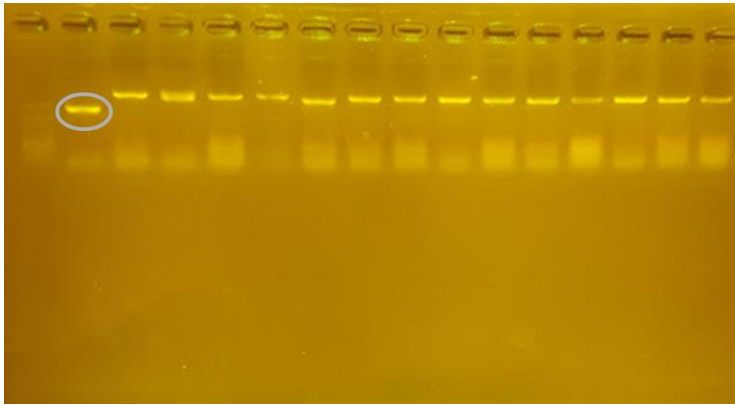
PCR için uygun sıcaklıklar belirlendikten sonra gen fragmentlerinin pET-21a(+) vektörüne klonlanması için restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi

gerçekleştirildi. Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen pET-21a(+) %1'lik, diğer fragmentler ise %3'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6 pET-21a(+) vektörü ve c-Fos DNA fragmentlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasındaki agaroz jel görüntüsü. (pET-21a(+) vektörünün görüntülenmesinde 5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 ve 100 bp DNA marker kullanıldı).

Agaroz jelden izolasyonu gerçekleştirilen pET-21a(+) vektörü ve c-Fos DNA fragmentleri için hazırlanan ligasyon karışımının kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi. Ardından seçilen kolonilerin c-Fos DNA fragmentlerini taşıyıp taşımadığının kontrol edilmesi için koloni PCR gerçekleştirildi. Koloni PCR için pET-21a(+) vektörüne uygun T7 promoter ve terminatör primerleri kullanıldı. PCR ürünleri kontrol edilmek üzere %3'lük agaroz jele yüklendi (Şekil 4.7).

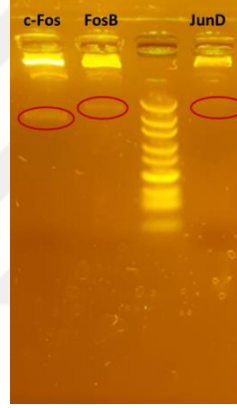


Şekil 4. 7 Koloni PCR sonucunda pET-21a(+)/c-fos içerdiği belirlenen koloniler. (Yuvarlak içine alınan kuyucuğa boş pET-21a(+) vektörü yüklenmiştir.)

c-Fos transkripsiyon faktörünü kodlayan gen fragmentini taşıyan pET-21a(+) ekspresyon vektörünün *E. coli* BL21(DE3) Rosetta 2 hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.

4.1.3 pET-21a(+) ekspresyon vektörüne klonlanan genlerin dizi analizleri

İlgili proteinleri kodlayan genlerin pET-21a(+) vektörüne klonlanması tamamlandıktan sonra seçilen kolonilerden plazmid izole edildi. İzole edilen plazmidler, dizi analizleri için hazırlanmadan önce, *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim ürünleri kontrol edilmek üzere agaroz jele yüklendi (Şekil 4.8). Vektörlerin ilgili genleri taşıdığı kontrol edildikten sonra Sanger yöntemi (Eurofins Genomics, Almanya) ile sekanslandı.



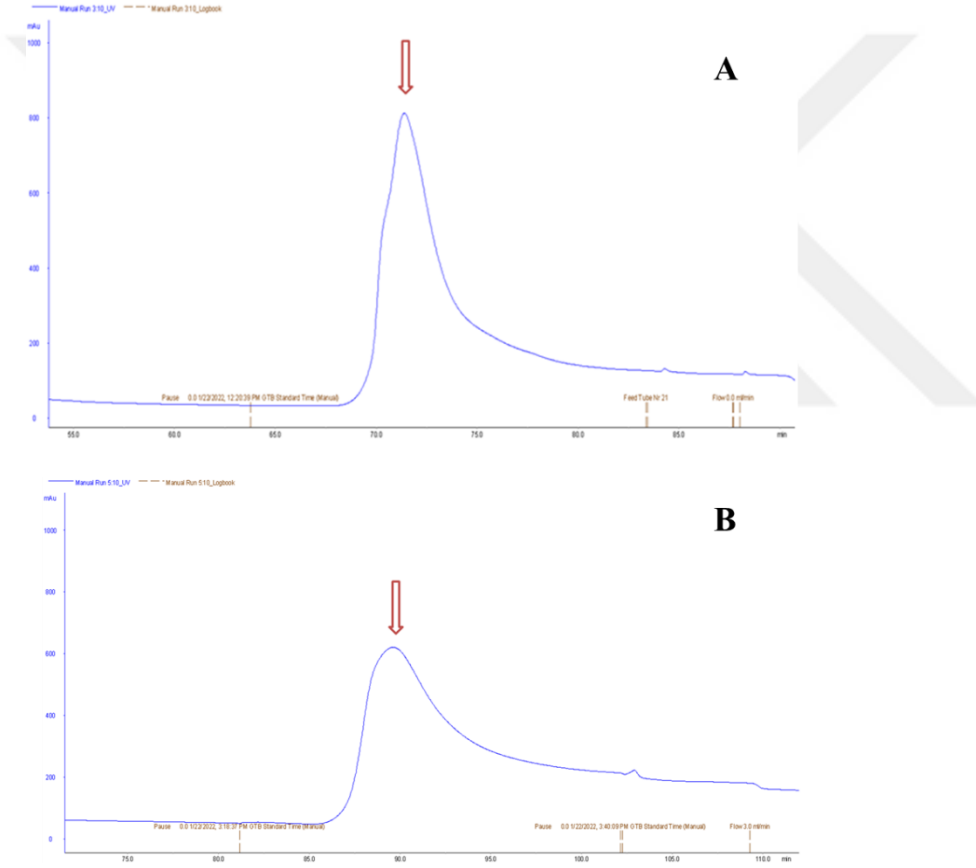
Şekil 4. 8 c-Fos, FosB ve JunD proteinlerini kodlayan genleri içeren pET-21a(+) vektörünün *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü.

4.2 Proteinlerin Büyük Ölçekli Üretimi ve Saflaştırılması

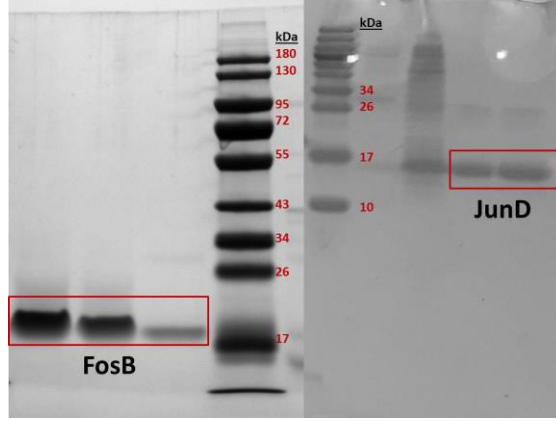
4.2.1 c-Fos, FosB ve JunD proteinlerinin büyük ölçekli üretimi ve saflaştırılması

Büyük ölçekli üretim otoindüksiyon büyüme ortamında gerçekleştirildi. Her bir 100 mL'lik ortama, ampisilin ve gece kültürü eklendi ve 37 °C'de inkübe edildi. OD₆₀₀ 0,3-0,4 değerine ulaşılmasının ardından sıcaklık 20 °C'ye düşürülerek 20 saat daha inkübasyona devam edildi. Üretim sonrasında, ultrasonik homojenizatör yardımı ile hücreler homojenize edildi ve santrifüjlendi. Süpernatant, saflaştırma işlemi için kolona yüklenmeye hazır hale getirildi.

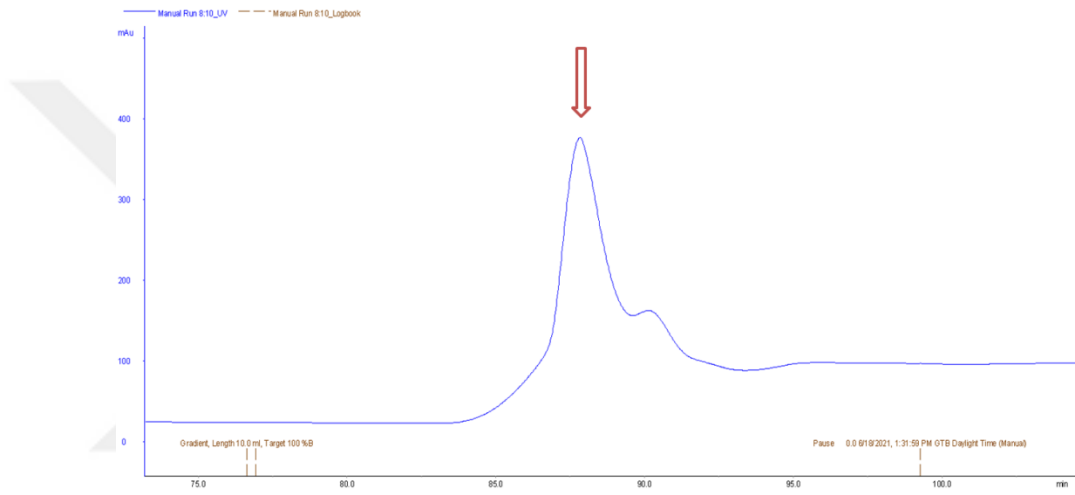
Safılaştırma, 5 mLlik HisTrap™ HP crude kolon kullanılarak ÄKTAprime plus sisteminde gerçekleştirildi. Kolona bağlanan proteinlerin elüsyonu, elüsyon tamponu kullanılarak gradient elüsyon ile gerçekleştirildi ve fraksiyonlar toplandı. Şekil 4.9’da FosB (A) ve JunD (B), Şekil 4.11’de c-Fos için immobilize metal Şelat afinite kromatografisi (IMAC) ile safılaştırma sonrası elde edilen kromatogramlar gösterilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar %16 Trisin-SDS-PAGE’e uygulandı. Şekil 4.10 ve Şekil 4.12’de gösterildiği gibi Trisin-SDS-PAGE analizi ile FosB, JunD ve c-Fos proteinlerinin yüksek saflıkta (>%90) elde edildiği doğrulandı. 500 mL lik ortamdan toplamda 18,3 mg FosB, 400 mL lik ortamdan 14,54 mg c-Fos ve 300 mL lik ortamdan ise 0,58 mg JunD elde edildi.



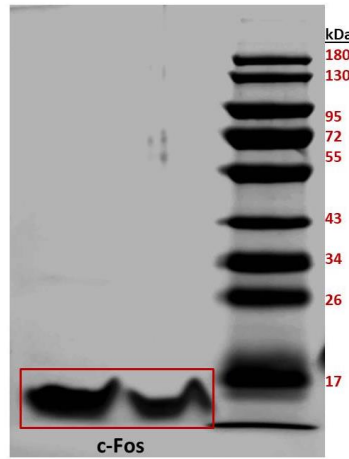
Şekil 4. 9 FosB (A) ve JunD (B) IMAC ile safılaştırılmasına ilişkin kromatogram.



Şekil 4. 10 FosB ve JunD proteinlerinin Tris-in-SDS-PAGE görüntüsü.



Şekil 4. 11 c-Fos IMAC ile saflaştırılmasına ilişkin kromatogram.



Şekil 4. 12 c-Fos proteininin Tris-in-SDS-PAGE görüntüsü.

4.3 *In vitro* Seçim

4.3.1 FosB proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve *in vitro* seçimi

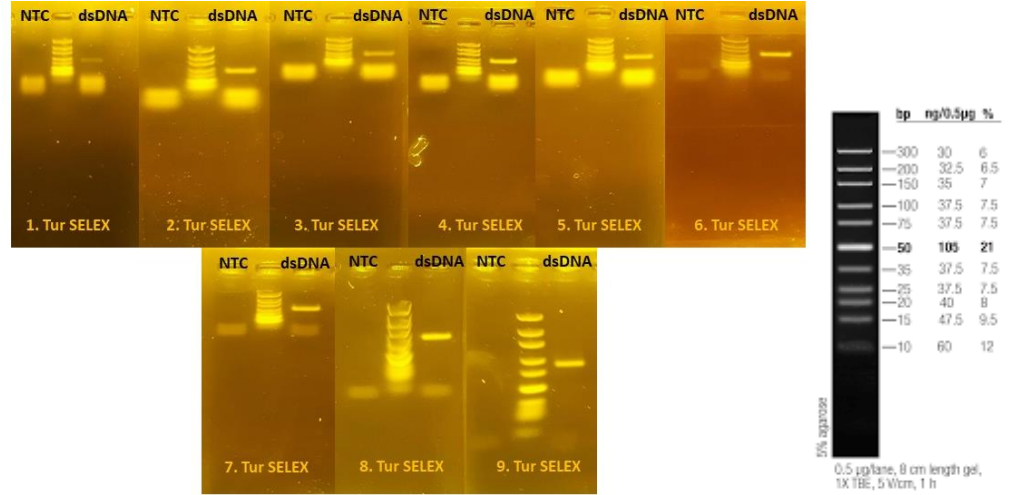
FosB proteinini Co-NTA manyetik boncuklara immobilize edildi. 180 µg FosB, 20 µL Co-NTA manyetik boncuklar ile 60 dk 25 °C'de 900 rpm'de çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için manyetik ayırıcı kullanıldı. Boncuklar bağlama tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra son hacim 1 mL olacak şekilde +4 °C'de tamponda saklandı. Manyetik boncuklara bağlanan protein derişiminin belirlenmesi için, bağlanmayan protein miktarı Bradford reaktifi ile ölçüldü. Ayrıca, boncuğa bağlı proteinler %16 lık Trisin-SDS-PAGE'e yüklendi.

En yüksek afiniteli aptamerlerin seçilebilmesi için SELEX turları süresince aptamer ve FosB arasındaki etkileşim koşulları kademeli olarak zorlaştırıldı (Tablo 4.1). İlk SELEX turunda, ssDNA kütüphanesi (300 pmol) 200 µL bağlanma tamponunda (20 mM Tris; 120 mM NaCl; 2 mM TCEP; 5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; % 0,05 Tween 20; pH 7,6) sırasıyla 95 °C, buz ve 37 °C'de 5'er dk inkübe edildi. Ardından, ssDNA kütüphanesi ve 40 µL boş manyetik boncuk 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon adımının ardından, bağlanmayan ssDNA dizileri uzaklaştırılarak FosB immobilize manyetik boncuk ile 37 °C'de inkübe edildi ve yıkama adımları gerçekleştirildi. Daha sonra, FosB'ye bağlanan ssDNA'ların elüsyonu için, manyetik boncuklar 80 °C'de 10 dk inkübe edildi. Manyetik ayırıcı ile manyetik boncuklar uzaklaştırıldı ve elüe edilen ssDNA dizileri PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünü %3'lük agaroz jele yüklendi ve DNA bandı gözlenene kadar ilave turlar eklendi (Şekil 4.13).

Tablo 4. 1 FosB proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.

SELEX turu	Başlangıçtaki protein miktarı (pmol) / İnkübasyon süresi (dk)	Negatif selex boncuk miktarı (µL)/ İnkübasyon süresi (dk)	Yıkama sayısı x süreleri (dk)
1	200 / 30	40 / 30	2x1
2	100 / 30	40 / 30	2x2
3	50 / 30	40 / 30	2x5
4	16 / 20	40 / 30	3x3
5	8 / 20	50 / 30	3x3
6	8 / 15	50 / 30	3x3
7	4 / 15	50 / 30	2x3 1x5
8	4 / 15	50 / 30	2x3 1x5
9	4 / 15	50 / 30	2x3 1x5

Her turda elde edilen ssDNA havuzu 37 °C’de 30 dk boş-Co-NTA boncuk ile inkübe edilerek negatif SELEX gerçekleştirildi.



Şekil 4. 13 FosB proteinine ilişkin her bir SELEX turu sonucunda PCR ile elde edilen dsDNA’nın agaroz jel görüntüleri.

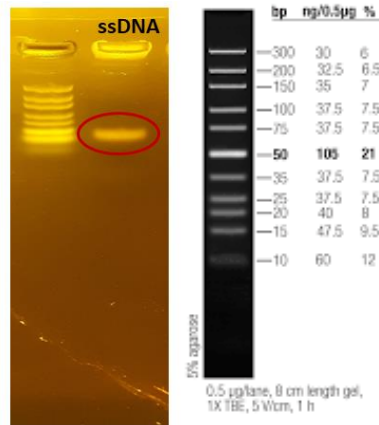
FosB immobilize manyetik boncuklara non-spesifik bağlanmanın önüne geçebilmek için 2. SELEX turundan başlayarak 0,1-0,5-0,8 mg/mL salmon sperm

DNA ve 3. SELEX turunda 0,1 mg/mL bovine serum albümin (BSA) ve 8. SELEX turunda da 10 mg/mL insan serum albümin (HSA) kullanıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4. 2 FosB proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.

SELEX turu	PCR turu	dsDNA (ng)	ssDNA (ng)	Salmon Sperm DNA (mg/mL)	
1	10	564,78	193,59		
2	12	1085	341,7	0,1	
3	10	1234	230,16	0,1	BSA-0,1 mg/mL
4	12	2098	526,86	0,1	
5	13	2779	482,37	0,5-ön inkübasyon	
6	13	1117	354,87	0,5-ön inkübasyon	
7	13	1365	364,05	0,8-ön inkübasyon	
8	13	1565	354,69	0,8-ön inkübasyon	HSA-10 mg/mL
9	12	1809		0,8-ön inkübasyon	

PCR amplifikasyonu sonrası elde edilen dsDNA, lambda ekzonükleaz ile 37 °C'de yaklaşık 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında kesimin takip edilebilmesi için belirli aralıklarla alınan örnek %3'lük agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14 FosB proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA agaroz jel görüntüsü.

Lamda ekzonükleazın kesim işleminin tamamlanmasından sonra inaktivasyonu için 80 °C'de 15 dk inkübasyon gerçekleştirildi ve ardından bir sonraki turda kullanılmak üzere ssDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Her bir turdan elde edilen ssDNA havuzu bir sonraki SELEX turunda kullanıldı ve benzer bağlanma, elüsyon ve amplifikasyon adımları tekrarlandı.

4.3.2 c-Fos proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve *in vitro* seçimi

Rekombinant olarak üretilen 25 µg c-Fos, 50 µL Co-NTA boncuk ile 25 °C'de 1000 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkama yapıldıktan sonra son hacim 500 µL olacak şekilde SELEX tamponunda (20 mM Tris; 120 mM NaCl; 1 mM DTT; 5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; %0,05 Tween 20; pH:7,6) ssDNA kütüphanesi ile inkübe edildi. 37 °C'de gerçekleştirilen SELEX çalışmalarında başlangıç olarak 200 pmol ssDNA kütüphanesi, 120 pmol c-Fos ile inkübe edildi. Her bir turda, ssDNA ile hedef bağlı manyetik boncuklar farklı koşullarda inkübe edildi. c-Fos'a bağlanan ssDNA dizilerinin amplifikasyonu PCR ile gerçekleştirildi ve elde edilen dsDNA dizileri lambda ekzonükleaz ile muamele edilerek ssDNA dizileri elde edildi. ssDNA dizileri bir sonraki SELEX turunda kullanılmak üzere katlandı. Bu şekilde toplamda 5 SELEX turu gerçekleştirildi. 2., 3., 4. turlarda negatif-SELEX uygulandı. Son turda ise FosB kullanılarak counter SELEX uygulandı. Ek olarak, non-spesifik bağlanmanın önüne geçebilmek için 2., 3., 4. turlarda 0,5 mg/mL salmon sperm DNA da kullanıldı. Böylece yüksek afiniteli aptamerlerin seçilebilmesi için SELEX turları süresince aptamer-protein arasındaki etkileşim koşulları kademeli olarak zorlaştırıldı (Tablo 4.3).

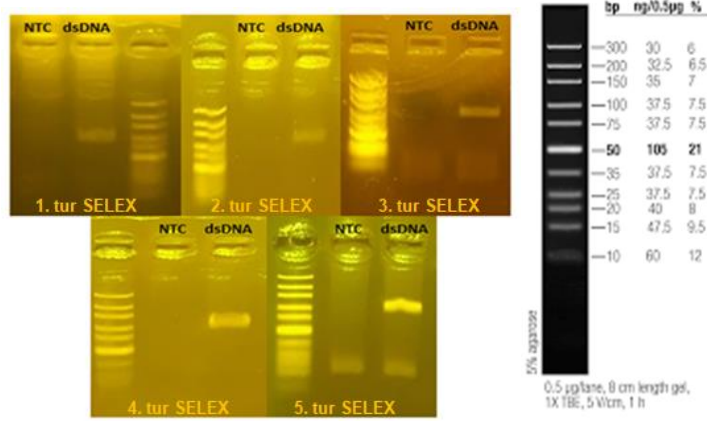
Tablo 4. 3 c-Fos proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.

SELEX turu	Başlangıçtaki protein miktarı (pmol) / İnkübasyon süresi (dk)	Negatif -SELEX boncuk miktarı (µl)/ İnkübasyon süresi(dk)	Yıkama sayısı x süreleri
1	120 / 30	- / 30	3x30 s
2	60 / 30	40 / 30	2x30 s 1x5 dk
3	26,6 / 30	40 / 30	2x30 s 1x5 dk
4	10 / 30	40 / 30	1x30 s 2x5 dk
5	3,3 / 30	0,5 / 30 (FosB-CoNTA)	3x5 dk

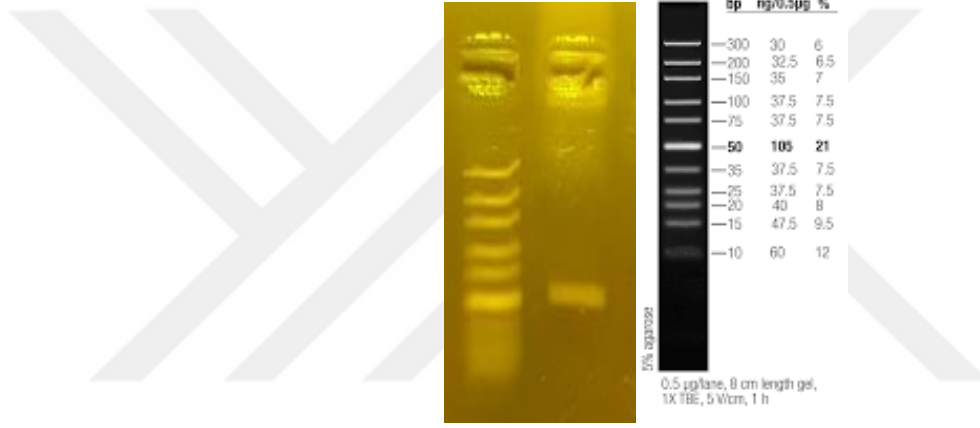
Tablo 4. 4 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.

SELEX turu	PCR turu	dsDNA (ng)	ssDNA (ng)	Salmon Sperm DNA (mg/mL)
1	17	1242	1179	-
2	18	752,64	368,375	0.5-ön inkübasyon
3	17	1060	907,83	0.5-ön inkübasyon
4	17	2465	367,115	0.5-ön inkübasyon
5	18	1303	-	-

Her SELEX turu sonrası PCR ile elde edilen agaroz jel görüntüleri (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) ile ssDNA ve dsDNA miktarları değerlendirildi (Tablo 4.4).



Şekil 4. 15 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonucunda PCR ile elde edilen dsDNA'nın agaroz-jel görüntüleri.



Şekil 4. 16 c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA'nın agaroz-jel görüntüsü.

4.3.3 Tam uzunluktaki c-Fos proteininin manyetik boncuklara immobilizasyonu ve *in vitro* seçimi

Co-NTA manyetik agaroz boncuklara tam uzunluktaki c-Fos (Abcam, Cambridge. Kat. No: ab84143) proteini 20 µL Co-NTA boncuğa 5µg protein immobilize edildi. Manyetik boncuk temelli SELEX yöntemi, ssDNA kütüphanesinin (DAL-N-40) c-Fos-immobilize manyetik boncuklar ile inkübasyonu, bağlanmayan ssDNA'ların yıkama yoluyla uzaklaştırılması, bağlanan ssDNA'ların elüsyonu ve PCR amplifikasyon işlem basamaklarının tekrarlanması ile gerçekleştirildi (Tablo 4.5). SELEX tur sayısı arttıkça protein miktarı ve inkübasyon süresi azaltılırken, yıkama basamakları zorlaştırıldı. 25 °C'de gerçekleştirilen SELEX çalışmalarında başlangıç olarak 150 pmol Alpha ssDNA kütüphanesi, 50 pmol hedef protein ile SELEX tamponunda (20 mM Tris;

0,1 mM EDTA; %10 gliserol; 1 mM DTT; 150 mM KCl; 5 mM MgCl₂; %0,05 Tween 20; pH:7,9) inkübe edildi. Her bir turda, ssDNA ile hedef bağılı manyetik boncuklar farklı koşullarda inkübe edildi. Tam uzunluktaki c-Fos'a bağlanan ssDNA dizilerinin amplifikasyonu PCR ile gerçekleştirildi ve elde edilen dsDNA dizileri lambda ekzontükleaz ile muamele edilerek ssDNA dizileri elde edildi. ssDNA dizileri bir sonraki SELEX turunda kullanılmak üzere katlandı. Bu şekilde toplamda 13 SELEX turu gerçekleştirildi. 5., 6., 8., 9. ve 13. turlarda negatif-SELEX uygulandı. Böylece yüksek afiniteli aptamerlerin seçilebilmesi için SELEX turları süresince aptamer-protein arasındaki etkileşim koşulları kademeli olarak zorlaştırıldı.

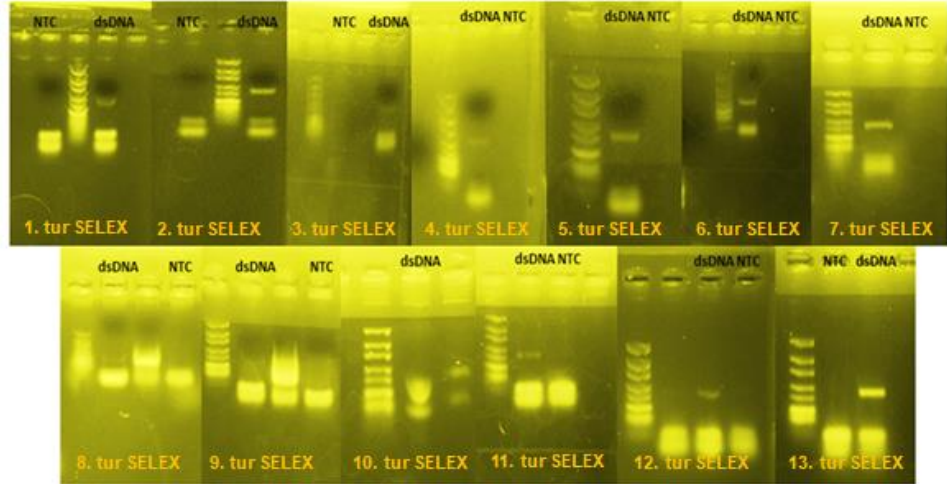
Tablo 4. 5 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX boyunca kullanılan manyetik boncuklar, inkübasyon süreleri ve yıkama koşulları.

SELEX turu	Başlangıçtaki protein miktarı (pmol) / İnkübasyon süresi (dk)	Negatif-SELEX boncuk miktarı (µL)/ İnkübasyon süresi (dk)	Yıkama sayısı x süreleri		
1	50	60	2x30 s		
2	25	45	2x30 s		
3	25	30	1x30 s 1x90 s		
4	12,5	30	1x30 s 1x90 s		
5	12,5	30	10	45	2x60 s
6	12,5	20	10	45	1x60 s 1x5 dk
7	6,25	20	1x60 s 1x5 dk		
8	6,25	20	10	45	2x60 s 1x5 dk
9	6,25	15	10	45	2x60 s 1x5 dk
10	6,25	15	3x60 s 1x5 dk		
11	6,25	15	3x60 s 1x5 dk		
12	6,25	15	3x60 s 1x5 dk		
13	6,25	15	10	45	3x60 s 1x5 dk

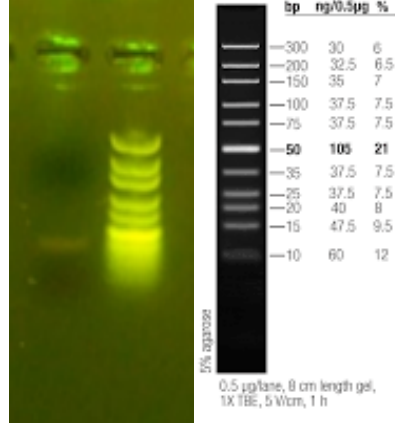
Her SELEX turu sonrası PCR ile elde edilen agaroz jel görüntüleri (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18) ile ssDNA ve dsDNA miktarları değerlendirildi (Tablo 4.6).

Tablo 4. 6 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turlarında elde edilen dsDNA ve ssDNA miktarlarındaki değişimler.

SELEX turu	PCR turu	dsDNA (ng)	ssDNA (ng)
1	16	507	87,87
2	16	905,46	102,39
3	15	4392	529,29
4	16	827,10	570,87
5	17	1663,74	474,48
6	15	3762	901,23
7	18	763,17	371,46
8	19	671,52	148,38
9	20	560,22	81,99
10	20	1037,61	93,42
11	16	744,93	241,95
12	17	1431,09	238,86
13	16	2913,66	



Şekil 4. 17 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında PCR ile elde edilen dsDNA'nın agarozjel görüntüleri.



Şekil 4. 18 Tam uzunluktaki c-Fos proteinine ilişkin SELEX turu sonrasında lambda ekzonükleaz ile muamale sonucunda elde edilen ssDNA'nın agaroz jel görüntüsü.

4.4 Zenginleşen Aptamer Dizilerinin Belirlenmesi ve Dizi Analizi

4.4.1 FosB'ye spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi

SELEX sonucunda elde edilen ssDNA havuzundaki dizilerin belirlenmesi amacı ile hizmet alımı yoluyla yeni-nesil sekans (NGS) analizi gerçekleştirildi. SELEX sonrasında, 2.(R2) (Fw-Rv2), 5.(R5) (Fw-Rv3), 7.(7) (Fw-Rv4) ve 9.(9) SELEX turu (Fw-Rv5) olacak şekilde dört adet tur seçildi. NGS verilerinin elde edilmesinin ardından, MEME Suite web sunucusu (<http://meme-suite.org/tools/meme>) kullanılarak R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinden rastgele bölgedeki konsensus motifleri analiz edildi (Bailey et al., 2015). MEME Suite web sunucusu, elde edilen p değerlerine ve konsensus motif zenginleştirme sonuçlarına dayanmaktadır. Meme suit programından elde edilen sonuçlara göre önemli ölçüde korunmuş bir motif belirlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4. 19 FosB için gerçekleştirilen SELEX sonrası R9 aptamer kütüphanesinde en sık tekrar eden 50 aptamerin motif analiz sonucu.

R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi analizi, varsayılan parametreler kullanılarak Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ile gerçekleştirildi (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

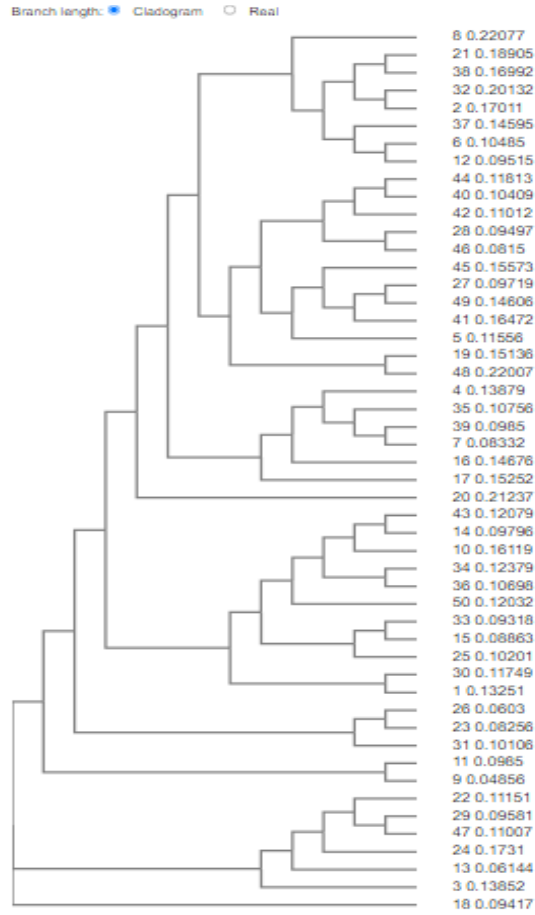
```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

8  -----AAAACACAGCCCAACCACCCACCAACCGTCAACCACAA----- 39
21 -----AAACACCACCACCCACCCACCAACACCCAGACAAGCA-- 40
38 -----ACCAACCACCCACCCACCAACCAACCCCAACCAAAAGC- 40
32 -----CCGCCACACACCCACCCACCAACACCCCAAAACCAAAA-- 38
2  -----ATTCAACCCCACTCCACACCAACCCACACACCCACCAAC-- 40
37 -----ACCCACCCGCGCACCAACCAACACCCGCCCCAAAACCG- 40
6  -----ACAGAACCCACCCACACCCGCAACCAACCCACCCCTAA----- 39
12 -----GCCCGCACCCACCAACCAACCCACCCACCCAAACTG 37
43 -----GTGCTTGCAGGTGTGGGGTGGGGTGGTTGGGGTTGGA- 40
33 -----TTTGGTTGTTGGGGTGTGGTGGGGTGGTGGTGG----- 38
15 -----GATGTGGTGTGGTGGGGGGTGGTGGTGGGGT----- 38
25 -----GTT--GATGTGGTGTGGTGGGGTGGAGGGGGGGT----- 39
14 -----GGTGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGTGGTGGTCTTT--CTAG 40
50 -----TTGCTGTGTTGGTGTGGGGTGGGGTGGGGGGGG----- 39
34 -----GTCATTGCGTGTGGGGTGGGGTGGAGGGGGGGTGT----- 39
36 -----GTGCTTTGGTGTGGGGTGGGGTGGGGGGTGGGGGGT----- 39
4  -----TGGTGGTGGGGGCG-GTGGCGTTG-GGTGGGGGTTTT--GTC- 40
35 -----GTGTGCGGTTGGGGTG-GTGTGCGG-GGGGGG-TTTTC- 39
39 -----TGSTGTTAGCGGTTGGGGTG-GTGGCGGG-GTGGGG-TT----- 39
7  -----TGGCTGGTGGGGTG-GTGGTGG-GTGGGG-TACTG----- 36
16 -----GTTGATGTGGTGGGGTG-GTGGTGG-GTGGGG-T----- 37
17 -----GGTCCGGTGGGGGGTG-GGGGTGTGGGGAGGCGGCTTGT----- 40
20 -----TGGTGGTGAGGT-GGGGGCTGGTGGTGGTGGTGGT--AT-- 39
22 -----TGCTCGTGTGTGGTGGTG-GTGGGGGGTGGGGTGG----- 40
29 -----GCGGTGTGTGGTGGTG-GTGGGCTGGGTGGGGTGGT----- 39
10 -----GCTCGTTTTGGTGGTGGGGT-AGCTTTGGGTGGGGTGG----- 39
30 -----TGST--TTTGGTGTGTGGG-GGGGGGGGGC-G-GCGGTTGG----- 40
1  -----TTGGTCCGCGTTGTGGGT-GGGGGTGGGGGG-TTGGTTG----- 39
47 -----GTAGCT--CGG--TGGTGGTG-GTGGGATGGGTGGGTGGTGG----- 40
24 -----TGTGTTTTGGGTGTGGTGGTG-GGCGGTGGGGTGGGG----- 39
26 -----TTGTCGGGTGTGTGGGG-GGGGT--GGTGGTGGGTGG----- 38
11 -----GTGCTCTTTGGGCGTTGTGGGT-GGGGGTGG-TGGTGGT----- 40
9  -----TTCGGGTGTGTGGGT-GGGGGTGGTGGGTGGTCTCA----- 39
31 -----TGGGGTGTGGCGTT-GGGGG-TGGTGTGGAGGGTTTT--GT-- 39
13 -----CTTGGGTGTGGTGGT-GGGGG-TGGGTGGGGGGTTC----- 37
3  -----CGTACTGGGTGTGGAGTT-GGGGG-AGGGTGGGGGGTG----- 39
18 -----TGTGTTTTGGGTGTGGTGGTG-GGAGG-TGGTGGTGGGCG----- 38
23 -----TTTGTGTTGGGTGTGGAG-GGGGG-TGGTGGTGGGT----- 40
44 -----CACGTTATGTTGGGTGGGTC-----TTGCTGGGGTGGGGAGG----- 40
28 -----CGTGTGTTTTGGGGTGGGGT-----GCTATTGGGTGGGGAGG----- 38
46 TTGGGGCGTGTGTTTTGGGGTGGGGT-----GCGGGCGGGGGTGG----- 40
45 -----TAGTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG----- 39
27 -----GGTTTTGGGCGGGGCTCTT--GTGTTGGTGGTGGGGCGGT----- 39
19 -----TGGTGGTGGGGTGTGCTGCTGGTGGTGGTGGGGGGGG----- 40
48 ---TGTGTTTTGGGGTGGGGTGGTGGTAAATGGGGTGG----- 40
40 -----TGTGTTTTGGGTGGGGTGGTTTTTTTGGGGAGGGGGGG----- 40
5  -----TGCTCGTGTGGGTGGGGTG--GTGCTGGGGAGGGGGAGG----- 40
49 -----GTGGTGGTGGGCGGGTTAT--ACGTGGGGTGGGGAGG----- 39
41 -----TGGTTGCTTTGGGGGGGGTTTT--ATCCTGGGGTGGGGTGG----- 40
42 -----GTGTTTTGGGTGGGGTGG--TTCTGGGTGGGGTGGT----- 39

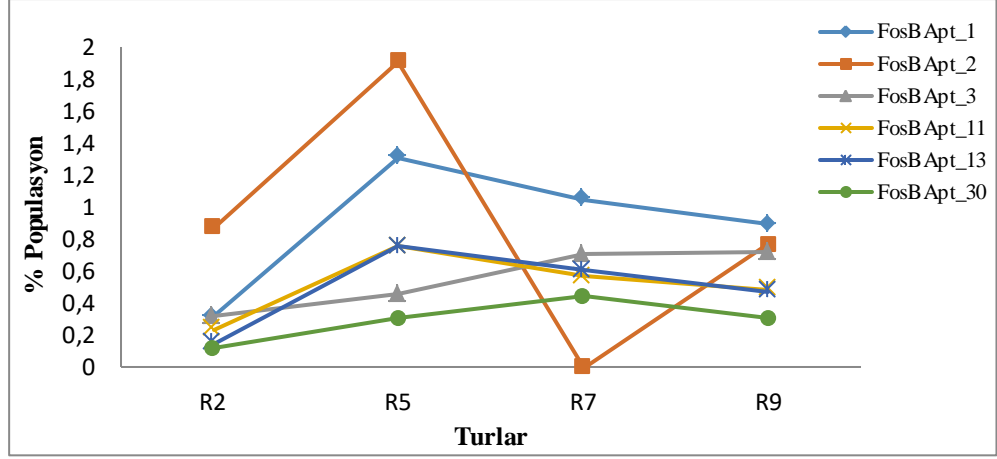
```

Şekil 4. 20 R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi eşleşirmesi.



Şekil 4. 21 R9 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç.

Bu analizlerin ardından, en iyi zenginleşen sekansların yüzde popülasyonu her tur için Şekil 4.22'de, zenginleşme yüzdeleri ise Tablo 4.7'de gösterildiği gibi hesaplandı.



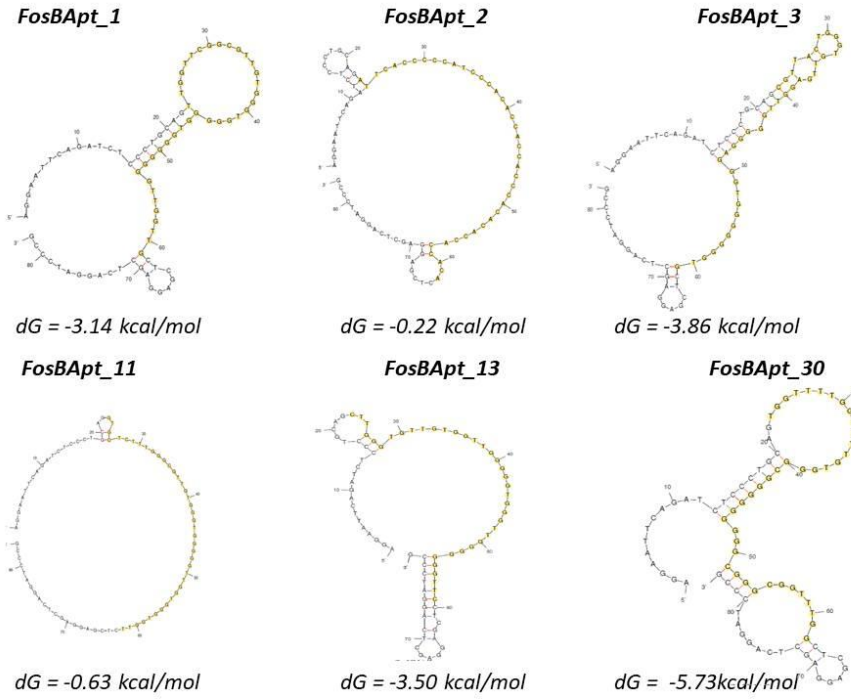
Şekil 4. 22 FosB'ye spesifik seçilen 6 aptamerin R2, R5, R7 ve R9 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.

Tablo 4. 7 NGS sonucunda elde edilen ve FosB'ye spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi. Aptamerlerin zenginleştirilmesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: $(\text{aptamer dizisi okuma sayısı} / \text{toplam okuma sayısı}) \times 100 / (\text{R2'deki aptamer dizisinin \%si})$.

Aptamer	Sekans	Zenginleşme oranı		
		R9/R2	R7/R2	R5/R2
FosBApt_1	5'-AGGAATTCAGATCTCCCTGCAG-(N40)-CTCGAGGAGCTCAGGATCCCG-3' TTGGTTCGGCGTTGTGGGTGGGGTGGGG GGGTTGGTTG	2,79	3,28	4,09
FosBApt_2	ATTCACCCCCATCCCACACCACCACCAC ACACCACCACA	0,88	0,00	2,19
FosBApt_3	CGTTACTGGGTGTTGAGGTTGGGGGAGGG TGGGGGGGTG	2,25	2,20	1,42
FosBApt_11	GTGCTCTTTGGGCGTTGTGGGTGGGGGTT GGTGGGTGGTT	2,09	2,43	3,25
FosBApt_13	CTTGGGTGTTGTGGTTGGGGTGGGTTGG GGGGGTTC	3,24	4,16	5,19
FosBApt_30	TGGTTTTGGTGTGTGGGCGGGGGGGGC GGGCGGTTTGG	2,64	3,81	2,60

Analiz edilen veriler doğrultusunda, aptamer havuzunda SELEX turları boyunca altı adet dizinin zenginleştiği gösterildi. Bu altı aptamer sekansı için, her bir seçim turundaki yüzde popülasyona karşı grafik oluşturulduğunda, FosBApt_1, özellikle 5. SELEX turundan sonra en çok okunan sekans iken ardından FosBApt_3 gelmektedir. Aptamerlerin oluşturdukları sekonder yapıların, hedeflerine bağlanmalarında büyük rol oynadıkları bilinmektedir. Şekil 4.23' de

gösterilen aday aptamerlerin sekonder yapılarının tahmini için serbest enerji minimizasyon modeline dayalı Mfold internet sunucusu kullanıldı (Zuker, 2003; Oliveira et al., 2022). "DNA Katlama Formu" kullanılarak her bir aptamerin sıcaklık (37 °C) ve tamponun iyonik koşulları (120 mM Na⁺ ve 5 mM Mg⁺² konsantrasyonları) deneysel seçim koşullarına göre ayarlanırken, geri kalan parametreler varsayılan değerlerle kullanıldı. Böylece, zenginleştiği belirlenen aptamer adayları arasından en kararlı sekonder yapıya (Gibbs serbest enerjisi en düşük) sahip adaylar belirlendi ve sonrasında yapılan değerlendirmeler sonucunda FosBApt_1 ve FosBApt_3 dizilerinin bağlanma afinitesi için daha ayrıntılı karakterizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4. 23 FosB için zenginleşen altı adet aptamerin sekonder yapıları. (Randomize bölge sarı renk ile işaretlenmiştir.)

Guanin açısından zengin nükleik asitlerin oldukça kararlı G-quadrupleks yapılar oluşturduğu bilinmektedir. Zenginleştiği belirlenen bu altı aptamer dizisinin G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyelinin belirlenmesi için QGRS Mapper internet sunucusu kullanıldı (Tablo 4.8).

Tablo 4. 8 FosB için zenginleşen altı aptamerin arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler (G-quadrupleks yapısına katılma potansiyeli olan bölgeler sarı ile işaretlenmiştir).

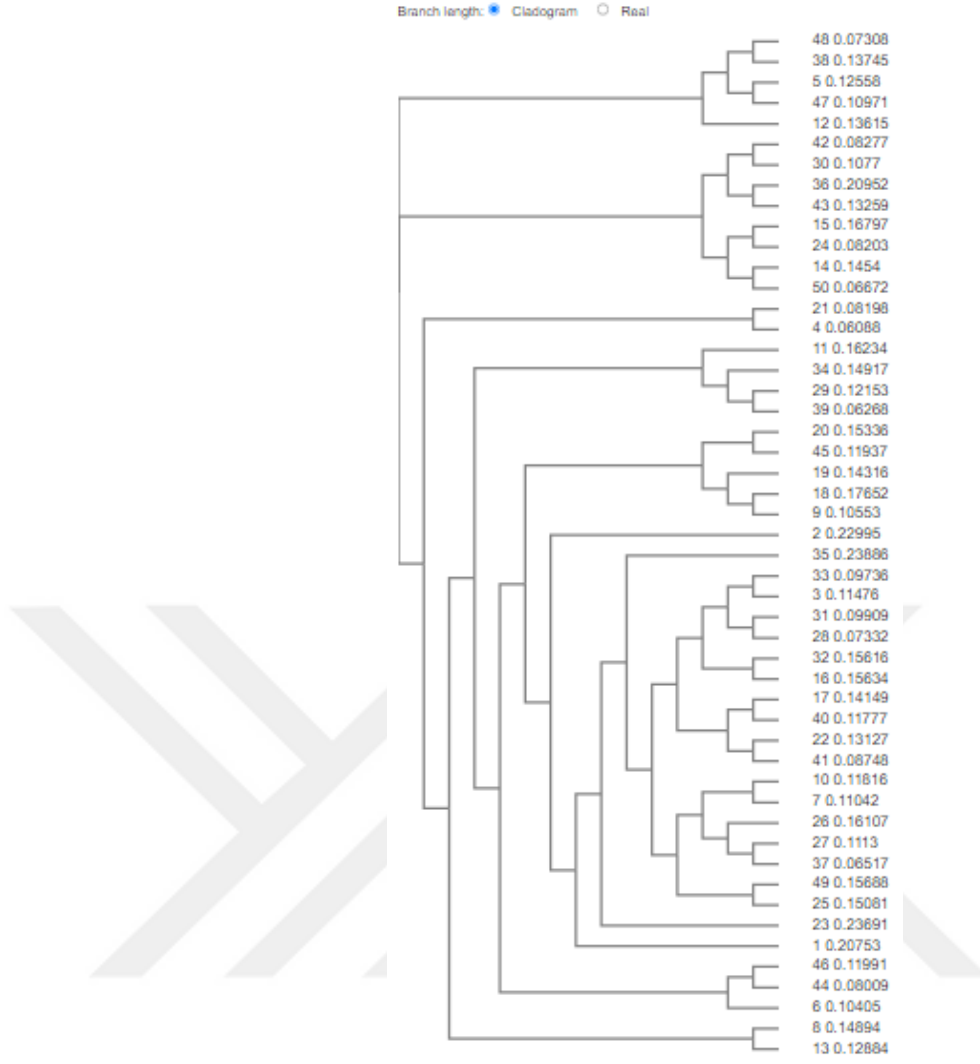
Aptamer	Sekans
FosBApt_1	TTGGTTCGGC GTTGT GGGTG GGGGTGGGGG GGTTGGTTG
FosBApt_3	CGTTACTGGG TGTGAGGTT GG GGGA GGGT GGGGGGG TG
FosBApt_11	GTGCTCTTT G GGC GTGTGG GTGGGGGTTG GTGGGTTGGTT
FosBApt_13	CTTGGGTGTT GTGGTTG GGG GTGGGTGGG GGGG TTC
FosBApt_30	TGGTTTTGGT GTTGT GGGCG GGGGGGGGCG GGCG TTTGG

4.4.2 c-Fos'ye spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi

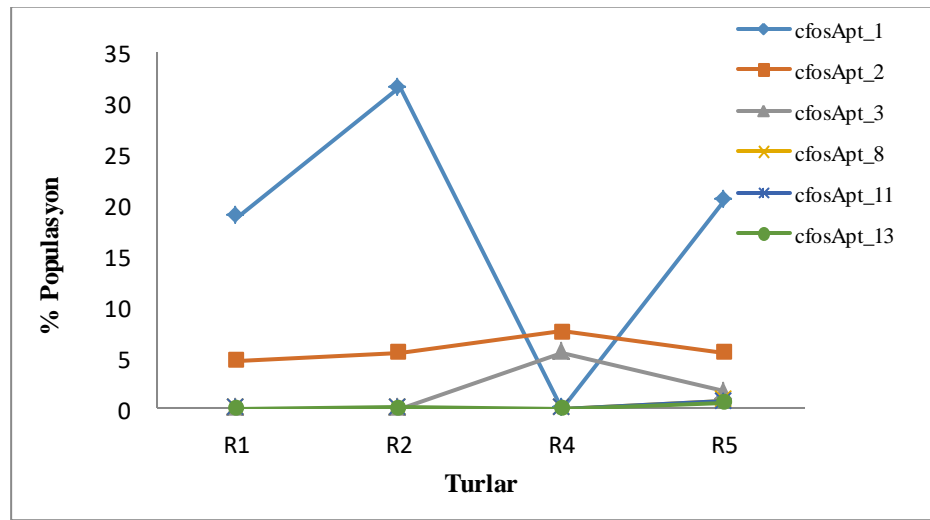
c-Fos için gerçekleştirilen SELEX sonrasında, 1. (R1) (Fw-Rv 2), 2.(R2) (Fw-Rv 3), 5.(R5) (Fw-Rv 4) ile final SELEX turu olan 5. (R5) (Fw-Rv 5) SELEX turu seçildi ve NGS analizine gönderildi. NGS verilerinin elde edilmesinin ardından, MEME Suite web sunucusu kullanılarak R5 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinden rastgele bölgedeki konsensus motifleri analiz edildi. MEME Suite web sunucusu, elde edilen p değerlerine ve konsensus motif zenginleştirme sonuçlarına dayanmaktadır. Meme suit programından elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.24'de gösterildiği gibi önemli ölçüde korunmuş iki motif belirlendi.



Şekil 4. 24 c-Fos için gerçekleştirilen SELEX sonrası R5 aptamer kütüphanesinde en sık tekrar eden 50 aptamerin motif analiz sonucu.



Şekil 4. 26 R5 kütüphanesinin en popüler 50 aptameri için filogenetik ağaç.



Şekil 4. 27 c-Fos için zenginleşen altı aptamerin R1, R2, R4 ve R5 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.

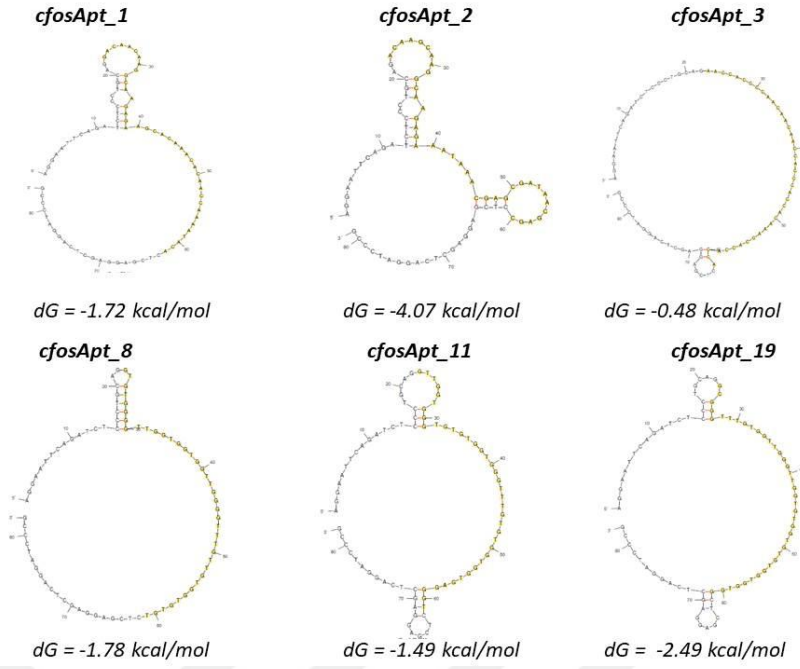
En yüksek düzeyde zenginleşen sekansların yüzde populasyonu her tur için Şekil 4.27'de, gösterildiği gibi hesaplandı.

Tablo 4. 9 NGS sonucunda elde edilen ve c-Fos'a spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi.

Aptamer	Sekans
	5'-AGGAATTCAGATCTCCCTGCAG-(N40)- CTCGAGGAGCTCAGGATCCCG-3'
cfosApt_1	GACAACAAGGCAAGAGAAGCACAAACACAACCAAAAATACA
cfosApt_2	ACAAGCAAGGCAAGAGAAATAAACGAGCGATAACGAGC
cfosApt_3	AACCACCCCAACAACAACCACCCACCACAAACCACCACCA
cfosApt_8	GTGTGGGGTTGGTGGTGGTGGGGTTTGTGTGGTGTGT
cfosApt_11	GTTGGTGGGTGTGTGGTGGGTTTGTGTGGTGGTGAGGGT
cfosApt_19	GCGGGTTTGTGGTGGGTTGGTGTGGTGTGTGGTGGTGG

Tablo 4.9'da analiz edilen veriler doğrultusunda, aptamer havuzunda SELEX turları boyunca altı adet dizinin zenginleştiği gösterildi. Bu altı aptamer sekansı için, her bir seçim turundaki yüzde populasyona karşı grafik oluşturulduğunda, özellikle cfosApt_1 ve cfosApt_2 olarak adlandırılan aptamerlerin her turda diğer aptamer adaylarına göre daha umut verici şekilde varlığı belirlendi.

Şekil 4.28'de gösterilen aday aptamerlerin sekonder yapılarının tahmini için serbest enerji minimizasyon modeline dayalı Mfold programı kullanıldı. Her bir aptamerin sıcaklık (37 °C) ve tamponun iyonik koşulları (120 mM Na⁺ ve 5 mM Mg⁺² konsantrasyonları) deneysel seçim koşullarına göre ayarlanırken, geri kalan parametreler varsayılan değerlerle kullanıldı. Böylece, zenginleştiği belirlenen aptamer adayları arasından en kararlı sekonder yapıya sahip adaylar belirlendi ve dizilerin bağlanma afinitesi için daha ayrıntılı karakterizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4. 28 c-Fos için aday altı aptamerin sekonder yapıları. (Randomize bölge sarı renk ile işaretlenmiştir.)

Zenginleştiği belirlenen aptamer dizilerinin olası G-quadrupleks yapıları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4. 10 c-Fos için zenginleşen altı aptamer arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler. (G-quadrupleks yapısına katılma potansiyeli olan bölgeler sarı ile işaretlenmiştir).

Aptamer	Sekans
<i>cfosApt_8</i>	GTGT GGGGTT GGTGGTGGTT GGGG TTTGTT GTGGTGTGT
<i>cfosApt_11</i>	GTTGGTG GGT GTGTGGT GGG TTTGTGT GGT GGTGAGG GT
<i>cfosApt_13</i>	GCGGGTTTGT GGTTGGGTTG GTGTGG TGTG TGGTGGTGG

4.4.3 Tam uzunluktaki c-Fos'a spesifik aptamerlerin zenginleşme ve dizi analizi

Tam uzunluktaki c-Fos için de gerçekleştirilen SELEX sonrasında, 1.(R1) (Fw-Rv 2), 8.(R8) (Fw-Rv 3), 10.(R10) (Fw-Rv 4) ve 13.(R13) (Fw-Rv 5) SELEX turuları seçildi ve NGS analizine gönderildi. NGS verilerinin elde edilmesinin ardından, MEME Suite web sunucusu kullanılarak final kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinden rastgele bölgedeki konsensus

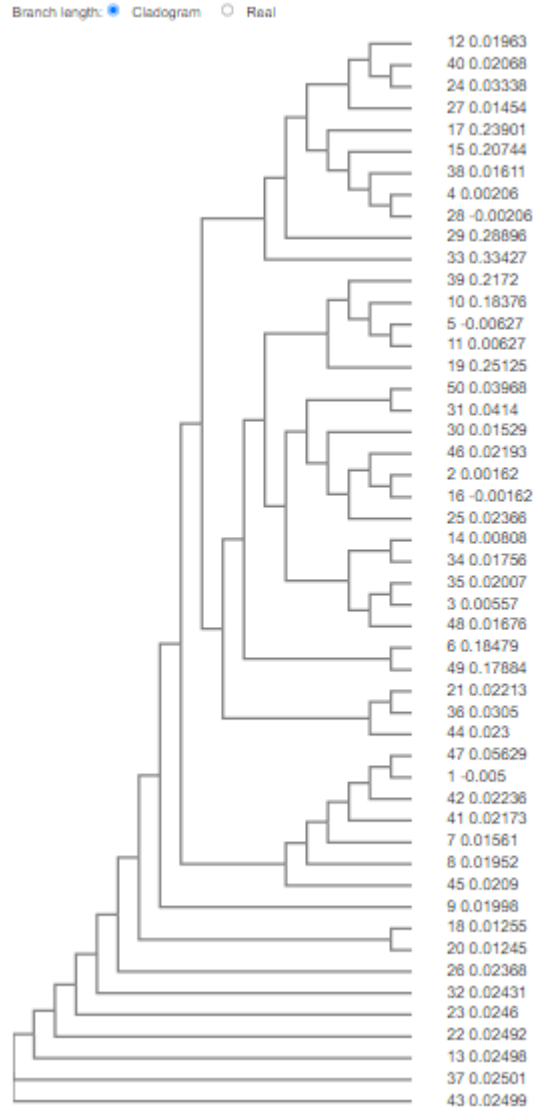
CLUSTAL D(1.2.4) multiple sequence alignment

```

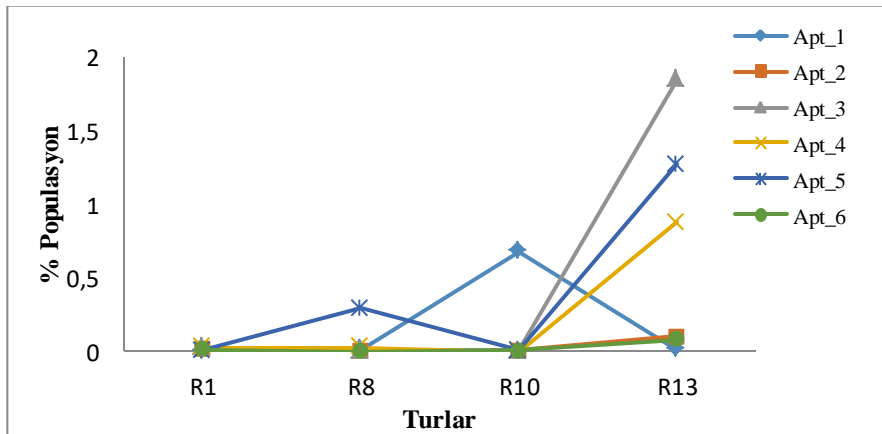
12  -----GCAGCAAGGCAAGAGAAATAAAC-----GAGCGATAACGAG-----C----- 38
27  -----ACAAGTAAGGCAAGAGAAATAAAC-----GAGCGATAACGAG-----C----- 38
40  -----ACAAGCAAGGCAAGAGAAATAAAC-----GAGCGATAACGAG-----C----- 38
24  -----ACAAGCAAGGCAAGAGAAATAAAC-----GAGCGATAACGAG-----C----- 37
29  ---CGACCAACCCACACATAAAATCACC-----AATAAAACCATG----- 39
17  --ATAACGAAGTGCGAACATGAAATAGAT-----AAAACAGGTGCA----- 40
15  ATACAACATAAAACAGAACTAAAT-----AACA--AGCAA----- 40
38  ATACAAGCAGGATAGAAACAGAAATATAT-----AA----TGCCAA----- 38
4  ATACAAGCAGSACAGAAACAGAAATATAT-----AA----TGCCAA----- 38
28  ATACAAGCAGSACAGAAACAGAAATATAT-----AA----TGCCA----- 37
33  -----TCATCCATAACCTCCCGCCCTCCCGCAAAGGATA----- 36
37  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGGCA----- 40
23  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
9  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAGCTTTTATAGAAGACA----- 40
13  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
18  --CCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
20  --ACAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
22  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACG----- 40
26  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
32  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
43  --TCAG--CTTTAATTTATAAAGAGGAACTTTTATAGAAGACA----- 40
47  -----TGCTTCT-ATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 39
45  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
42  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTCTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
41  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
8  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
1  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
7  -----TGCTTCTATAAAGTCCCTCTTTTATAAATTAAGCTG-----A----- 40
39  -----GGTGGGGGGGAGGGTTGTGAGGTGTCTGTGTTA----- 36
10  -----GTGGGAGGGTGGGGGGGTGAGATCTGACATTTGCTGC----- 39
5  GTGCATCGCTGTGGGGGGCGGGGGGGGAAGTGTGCGC----- 39
11  GTGCATCGCTGTGGGGGGCGGGGGGG--GAAGTGTGCGC----- 38
21  -----TTGGCATATATAATTCTGTCTCTGCTGCTGTGTAC----- 38
36  -----TTGGCATATATAATTCTGTCTCTGCTGCTGTGTAT----- 38
44  -----TTGGCATATATAATTCTGTCTCTGCTGCTGTGTAT----- 38
50  -----GTCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTGT 37
31  -----GCCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTGT 37
30  -----GCTCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTAT 38
46  -----GCTCGTATCACTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTGT 38
25  -----GCTCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTACCTTGTGT 38
2  -----GCTCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTGT 38
16  -----CTCGTATCGCTC-----GTTATTCTCTTGCCTTGCTTGT 37
19  -----TGTCTGTGTATGTTAATTTGTTTTCAGTTCCTGTGTGTC 40
14  -----TGTATTGGTGTGTTTGTGCTTCTTGCCTTGTGTGTC 39
34  -----TGTTTTGGTGTGTTTGTGCTTCTTGCCTTGTGTGTC 39
35  -----TTATTTGGTGTGTTTGTGCTTCTTGCCTTGTGTGTC 39
3  -----TGTATTTGGTGTGTTTGTGCTTCTTGCCTTGTGTGTC 40
48  -----TGTATTTGGTGTGTTTGTGCTTCTTGCCTTATTTGTC 40
6  -----TTACGAGGTATGTTGTTGTTGTTGGGGTGGTGGT----- 39
49  -----TGCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT----- 33

```

Şekil 4. 30 R13 kütüphanesinin en popüler 50 aptamerinin çoklu dizi eşleştirmesi.



Şekil 4. 31 R13 kütüphanesinin en popüler 50 aptameri için filogenetik ağaç.



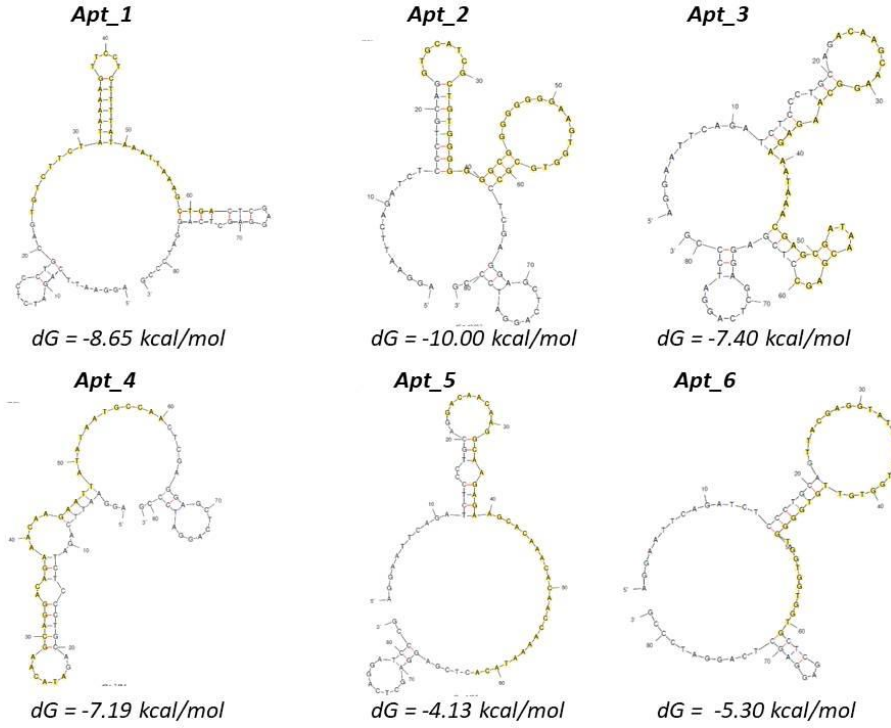
Şekil 4. 32 Tam uzunluktaki c-Fos için seçilen altı aptamerin R1, R8, R10 ve R13 SELEX turlarına ait popülasyondaki yüzdesine ilişkin grafik.

Analiz edilen veriler doğrultusunda, aptamer havuzunda SELEX turları boyunca altı adet dizinin zenginleştiği gösterildi (Tablo 4.11). Bu altı aptamer dizisi için, her bir seçim turundaki yüzde populasyona karşı grafik oluşturulduğunda, Apt_1'in, özellikle son SELEX turundan sonra en çok okunan sekans olduğu ve bunu Apt_5'in izlediği belirlendi (Şekil 4.32).

Tablo 4. 11 NGS sonucunda elde edilen ve tam uzunluktaki c-Fos'a spesifik zenginleşmiş altı adet aptamerin dizisi.

Aptamer	Sekans 5'-AGGAATTCAGATCTCCCTGCAG-(N40)- CTCGAGGAGCTCAGGATCCCG-3'	Zenginleşme oranı		
		R13/R1	R10/R1	R8/R1
Apt_1	TGTCTTCTATAAAAAGTTCCTCTTTTATAAATT AAAGCTGA	1,652	98,416	1,950
Apt_2	GTGCATCGCTGTGGGGGGGCGGGGGGGGAA GTGGTGC GC	5,002	0,213	1E-06
Apt_3	ACAAGCAAGGCAAGAGAAATAAACGAGCGA TAACGAGC	72,875	0,106	0,061
Apt_4	ATACAAGCAGGACAGAAACAAGAATTATAT AATGCCAA	39,566	1E-06	1,185
Apt_5	GACAACAAGGCAAGAGAAGCACAAACACAA CCAAAATACA	423,78	1,111	97,20
Apt_6	TTACGAGGTATGTTGTGGTGTGTGGGGTGG TGGTGGTG	7,628	0,702	1E-06

Aptamerlerin oluşturdukları sekonder yapıların, hedeflerine bağlanmalarında büyük rol oynadıkları bilinmektedir. Şekil 4.33'de gösterilen aday aptamerlerin sekonder yapılarının tahmini için serbest enerji minimizasyon modeline dayalı Mfold programı kullanıldı. Her bir aptamerin sıcaklık (25 °C) ve tamponun iyonik koşulları (5mM Mg⁺² konsantrasyonu) deneysel seçim koşullarına göre ayarlanırken, geri kalan parametreler varsayılan değerlerle gerçekleştirildi. Böylece, zenginleştiği belirlenen aptamer adayları arasından en kararlı sekonder yapıya sahip adaylar belirlendi (Şekil 4.33).



Şekil 4. 33 Tam uzunluktaki c-Fos için aday altı aptamerin sekonder yapıları.(Randomize bölge sarı renk ile işaretlenmiştir.)

Zenginleştiği belirlenen aptamer dizilerinden olası G-quadrupleks yapılarına sahip aptamer dizileri Tablo 4.12’da verilmiştir.

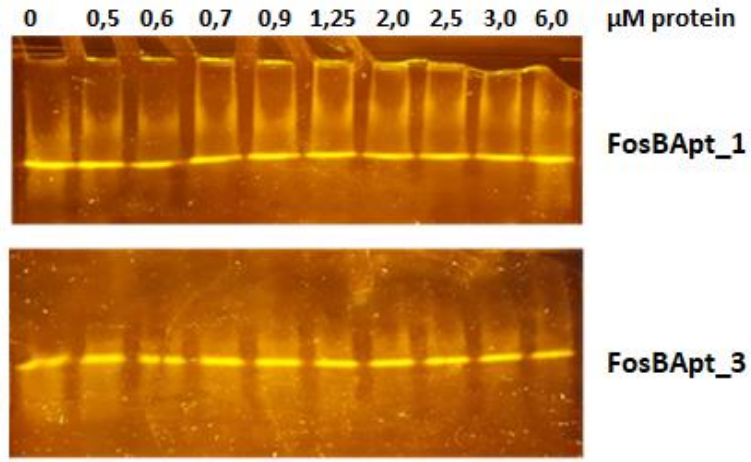
Tablo 4. 12 Tam uzunluktaki c-Fos için zenginleşen altı aptamer arasında G-quadrupleks yapılarını oluşturma potansiyeline sahip olan diziler. (G-quadrupleks yapısına katılma potansiyeli olan bölgeler sarı ile işaretlenmiştir).

Aptamer	Sekans
Apt_2	GTGCATCGCT GTGGGGGGC GGGGGGGGAA GTGGTGCCG
Apt_6	TTACGAGGTA TGTGTGGTG TTGTGGGGTG GTGGTGGTG

4.5 Aptamerlerin Bağlanma Afinitelerinin Belirlenmesi

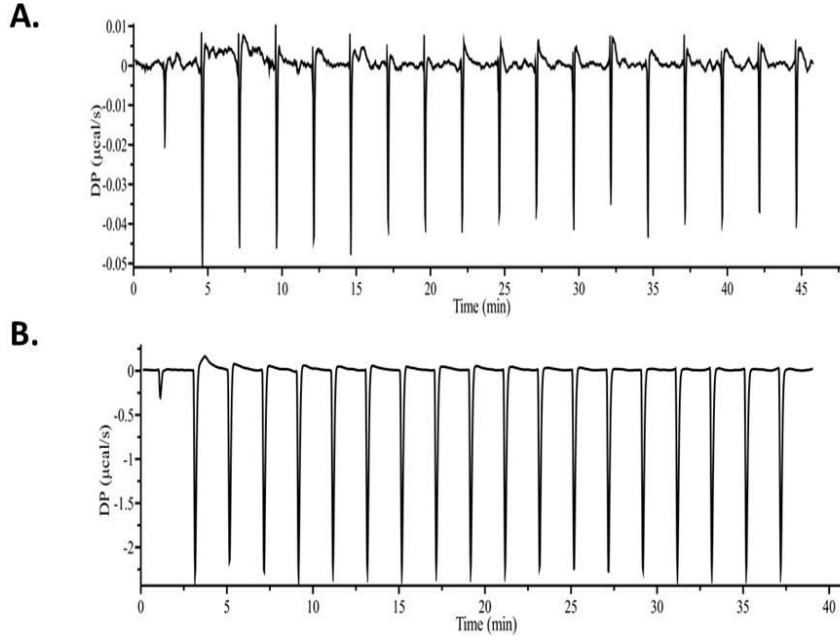
4.5.1 FosB için belirlenen aptamerlerin bağlanma afinitelerinin belirlenmesi

SELEX sonrası aday olarak belirlenen FosBApt_1 ve FosBApt_3 aptamer dizilerinin FosB ile olan etkileşimini incelemek için ITC ve EMSA yöntemleri kullanıldı. EMSA ilk olarak FosB’nin FosBApt_1 ve FosBApt_3 aptamerleri ile olan etkileşimlerinin incelenmesinde kullanıldı (Şekil 4.34).



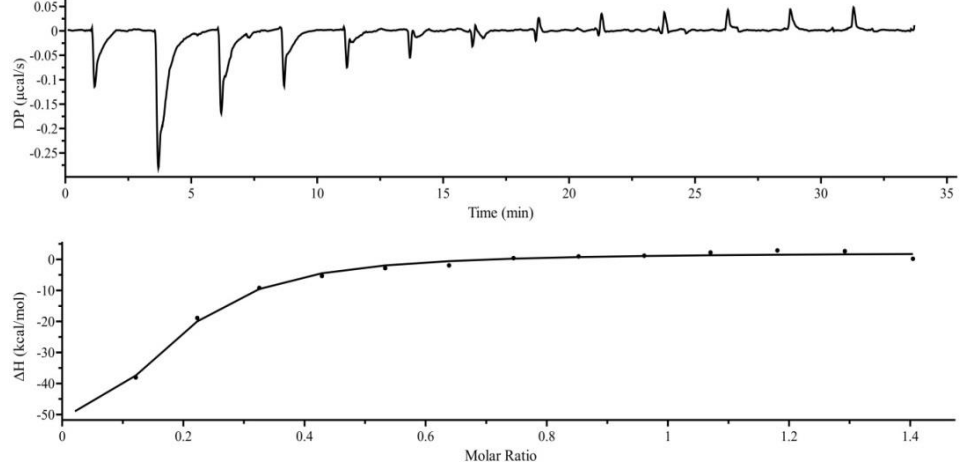
Şekil 4. 34 Farklı konsantrasyonlarda FosB'nin etiketsiz FosBApt_1 veya FosBApt_3 (125nM) aptamerleri ile inkünasyonu sonrasında elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü.

EMSA ile aptamerlerin hedef ile etkileşimi gösterildikten sonra ITC ölçümlerine geçildi. ITC, protein-aptamer etkileşimleri gibi çeşitli biyomoleküler etkileşimlerde termodinamik parametrelerin kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Sakamoto, et al., 2018). Bu çalışmada, aday aptamerlerin bağlanma afinitesini karakterize etmek için ITC ölçümleri gerçekleştirildi. Öncelikle, ITC ile tampon ve aptamerin (80 μ M) kör titrasyon ölçümleri gerçekleştirildi. Şekil 4.35'de gösterildiği gibi tampon ve aptamerin kör titrasyon ölçümlerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi.

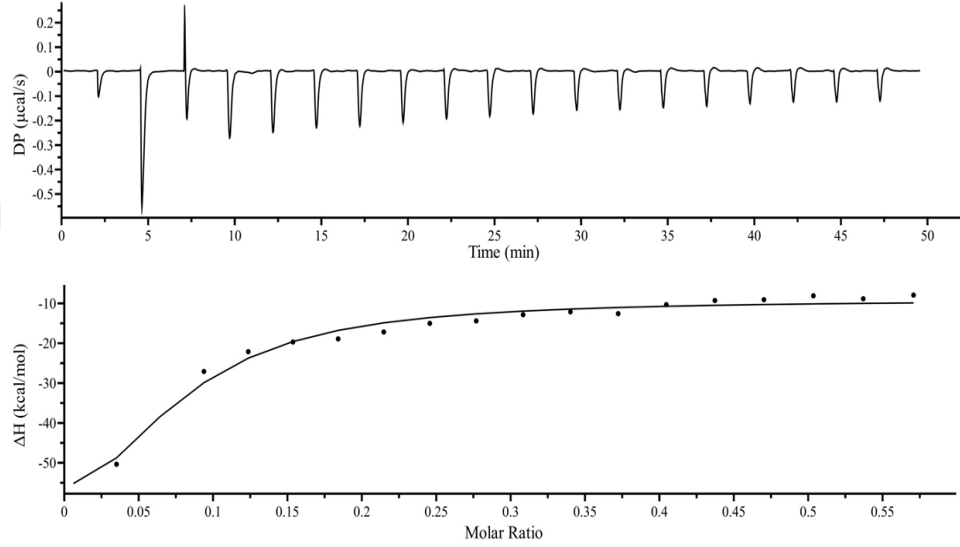


Şekil 4. 35 Tampon (A) ve aptamerin (B) kör ITC ölçümleri.

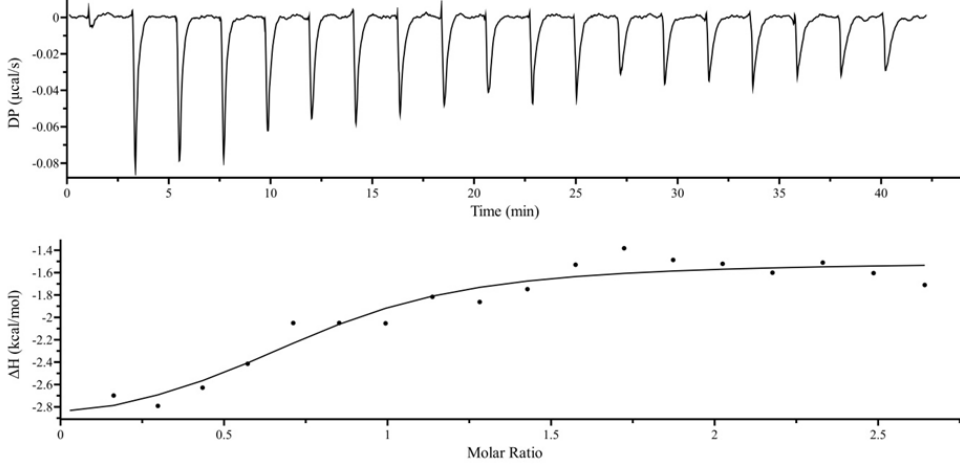
ITC karakterizasyonu sonucunda, yüksek afinite ile FosB proteinine bağlanabilen iki aday aptamer (FosBApt_1 ve FosBApt_13) belirlendi. Ölçümler 25 °C'de ve 37 °C'de gerçekleştirildi ve iki sıcaklıkta da benzer K_d değerleri elde edildi. FosBApt_1 için 25 °C ve 37 °C'de gerçekleştirilen ölçümlerde K_d sırasıyla 727 nM ve 1,15 μM (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37) olarak belirlenirken, FosBApt_3 için 2,04 μM ve 1,86 μM (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39) olarak hesaplandı.



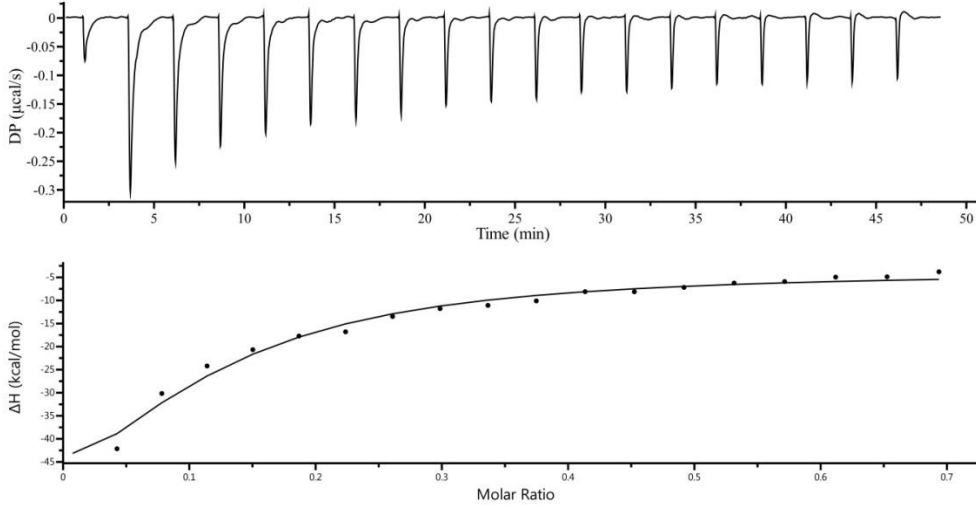
Şekil 4. 36 FosBApt_1'in FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. (üst) Ham ITC verileri (üst) ve FosBApt_1: FosB molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 10 μM FosB, 100 μM FosBApt_1 ile titre edildi ve K_d 727 nM olarak hesaplandı.



Şekil 4. 37 FosBApt_1'in FosB ile etkileşimine ilişkin 37 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve FosBApt_1: FosB molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 25 μM FosB, 72 μM FosBApt_1 ile titre edildi ve K_d 1,15 μM olarak hesaplandı.

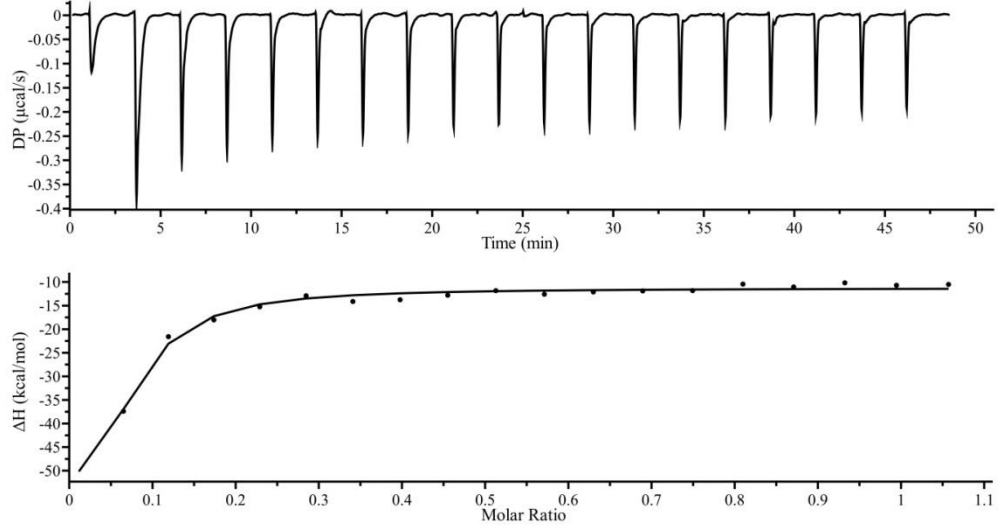


Şekil 4. 38 FosBApt_3'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 37 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve FosBApt_3: FosB molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 20 µM FosB, 15 µM FosBApt_3 ile titre edildi ve K_d 1,86 µM olarak hesaplandı.



Şekil 4. 39 FosBApt_3'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve FosBApt_3: FosB molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 20 µM FosB, 70 µM FosBApt_3 ile titre edildi ve K_d 2,04 µM olarak hesaplandı.

FosBApt_13 için 25 °C'de yapılan ölçümlerde ise K_d 634 nM olarak belirlendi (Şekil 4.40).

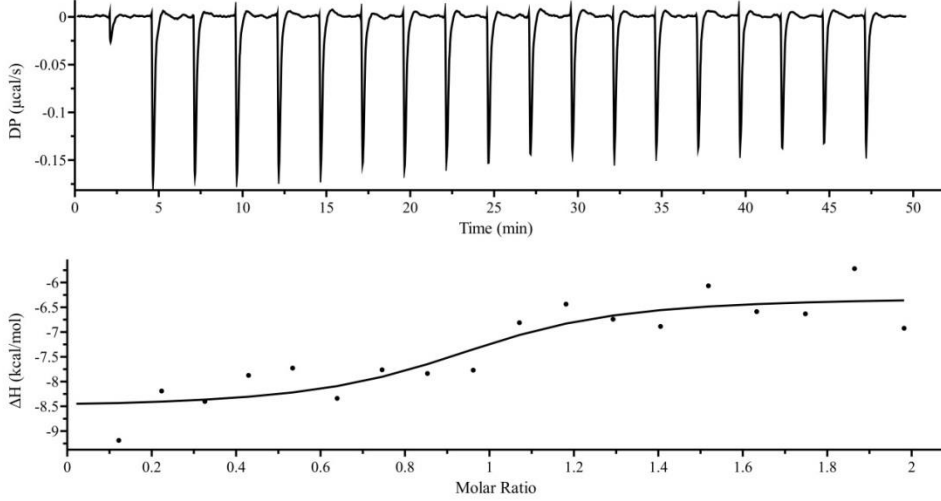


Şekil 4. 40 FosBApt_13'ün FosB ile etkileşimine ilişkin 25 °C'de gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve FosBApt_13: FosB molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt) Ölçümlerde 15 µM FosB, 80 µM FosBApt_13 ile titre edildi ve K_d 634 nM olarak hesaplandı.

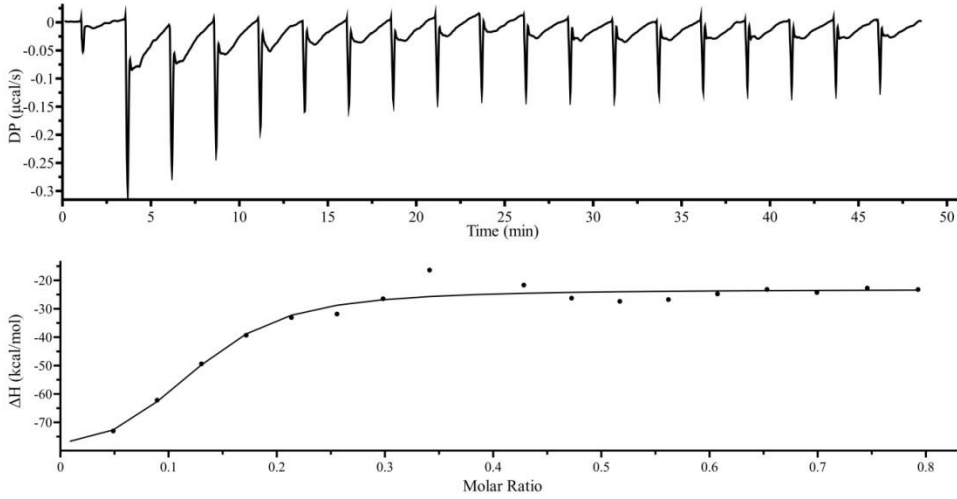
4.5.2 c-Fos için belirlenen aptamerlerin bağlanma afinitelerinin belirlenmesi

SELEX turları sonucunda dizi analizi yoluyla aptamerlerin nükleotid dizileri belirlendi. Bu analizler sonucunda en yüksek düzeyde zenginleşen aday aptamerler seçilerek ITC ölçümleri gerçekleştirildi. Kontrol ölçümleri tamamlandıktan sonra, aptamer ve c-Fos protein arasındaki etkileşime ilişkin ölçümler gerçekleştirildi. Referans ve numune hücresi arasındaki ölçülen ısı değişim farkına bağlı DP değerindeki farklanma ile aptamer ile hedef arasındaki etkileşim doğrulandı.

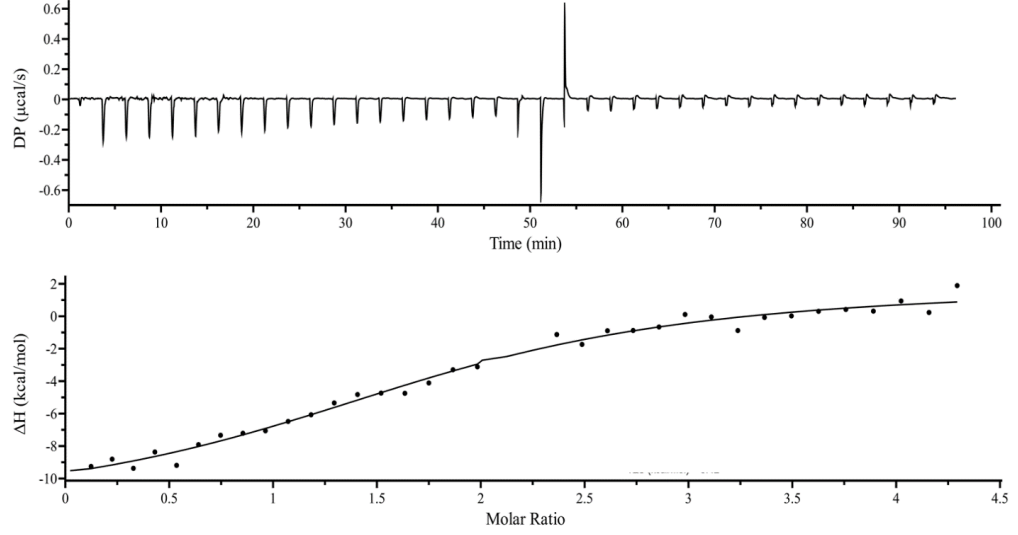
c-Fos ve tam uzunluktaki c-Fos proteinlerine karşı geliştirilen aptamer dizilerinin analizleri sonucunda her iki hedef için de en fazla zenginleştiği tespit edilen 2 aptamer dizisinin (cfosApt_2/Apt_3 ve cfosApt_1/Apt_5) %100 benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu aptamerler için ITC ölçümleri gerçekleştirildi. cfosApt_2/Apt_3'ün c-Fos için K_d değeri 390 nM (Şekil 4.41), cfosApt_1/Apt_5'in c-Fos için K_d değeri 302 nM (Şekil 4.42) olarak belirlendi. cfosApt_11 ve cfosApt_19 aptamerleri için belirlenen K_d değerleri ise sırasıyla 5,69 µM ve 5,69 µM olarak belirlendi (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44).



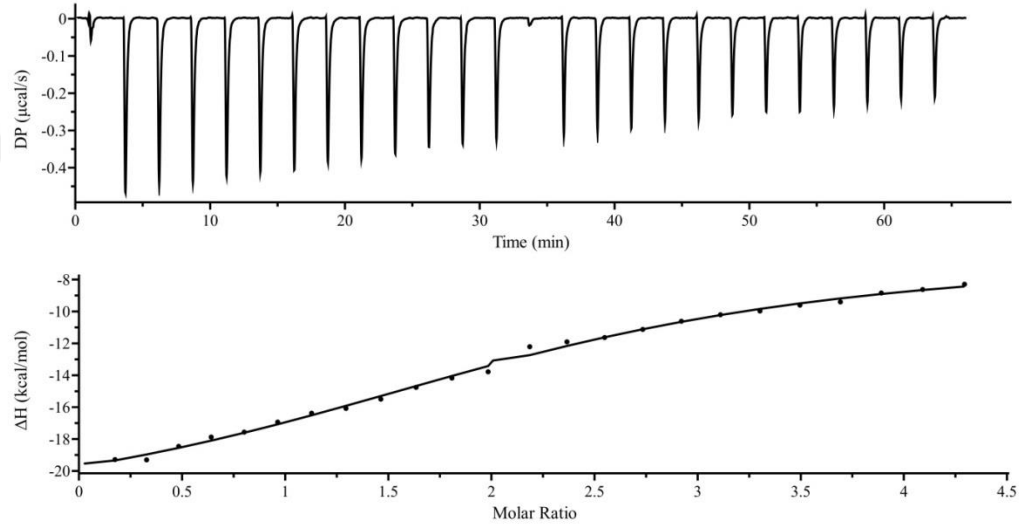
Şekil 4. 41 cFosApt_2/Apt_3'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve cFosApt_2/Apt_3:c-Fos molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 10 µM c-Fos, 100 µM cFosApt_2/Apt_3 ile titre edildi ve K_d 390 nM olarak hesaplandı.



Şekil 4. 42 cFosApt_1/Apt_5'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve cFosApt_1/Apt_5:c-Fos molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 15 µM c-Fos, 60 µM cFosApt_1/Apt_5 ile titre edildi ve K_d 302 nM olarak hesaplandı.

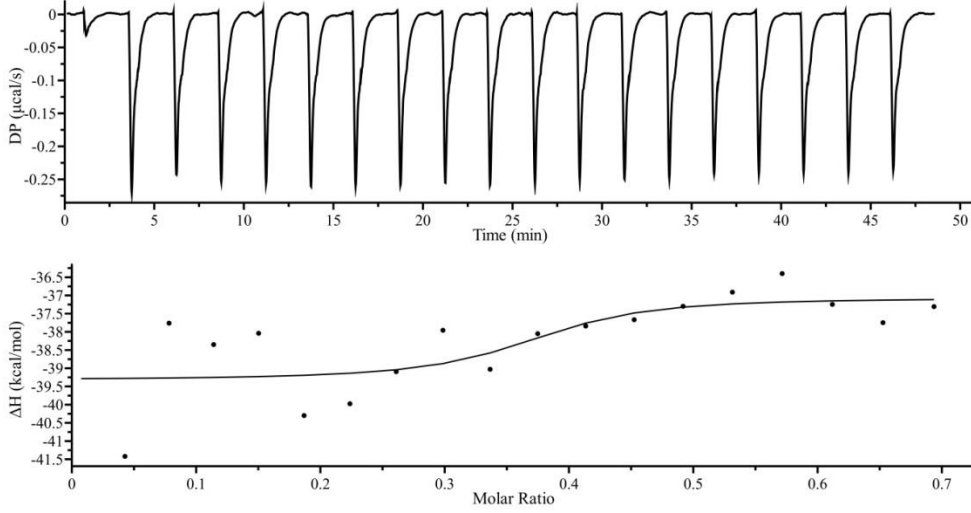


Şekil 4. 43 c-fosApt_11'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve c-fosApt_11: c-Fos molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 15 µM c-Fos, 150 µM c-fosApt_11 ile titre edildi ve K_d 5,69 µM olarak hesaplandı.



Şekil 4. 44 c-fosApt_19'un c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları. Ham ITC verileri (üst) ve c-fosApt_19: c-Fos molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 10 µM c-Fos, 100 µM c-fosApt_19 ile titre edildi ve K_d 5,69 µM olarak hesaplandı.

Tam uzunluktaki c-Fos için gerçekleştirilen SELEX sonrası dizi analizi sonucunda en yüksek düzeyde zenginleşen dizi olarak belirlenen Apt_1'in ise c-fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçümlerinde anlamlı bir sonuç elde edilemedi (Şekil 4.45).



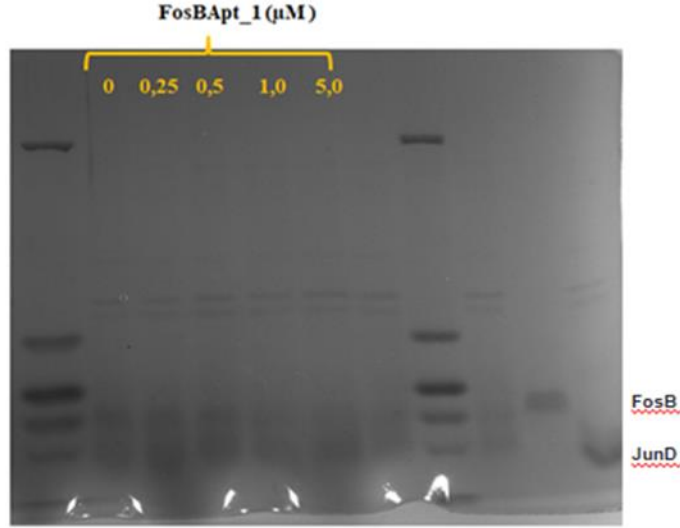
Şekil 4. 45 Apt_1'in c-Fos ile etkileşimine ilişkin gerçekleştirilen ITC ölçüm sonuçları.

Ham ITC verileri (üst) ve Apt_1:c-Fos molar oranına göre çizilen entalpi değişimi (alt). Ölçümlerde 20 μ M c-Fos, 70 μ M Apt_1 ile titre edildi.

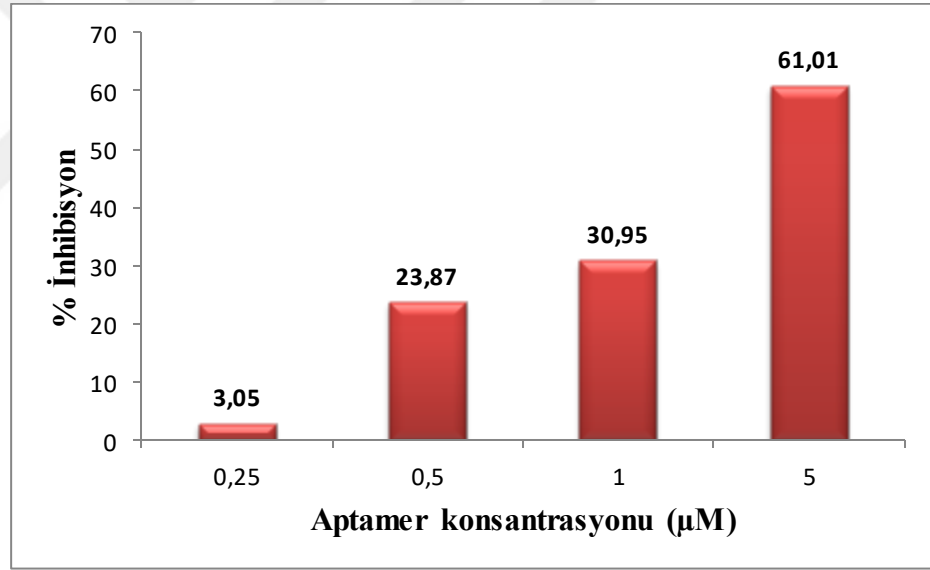
4.6 Aptamerlerin Protein-Protein Etkileşimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi

4.6.1 Aptamerin FosB:JunD etkileşimi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi

FosB için en iyi zenginleşme oranı ve afiniteyi gösteren FosBApt_1 aptamerinin, FosB:JunD etkileşimi üzerindeki inhibisyon etkisinin doğrulanması için pull-down assay gerçekleştirildi. FosB:JunD etkileşimi için hazırlanan tampon ortamına farklı konsantrasyonlarda aptamer (0; 0,25; 0,5; 1 ve 5 μ M) eklendi. Oluşan protein kompleksinin Trisin-SDS-PAGE'de görüntülenmesinin ardından (Şekil 4.46) jel görüntüsü ImageJ programı ile analizlendi ve FosB protein bandlarının yoğunluğundaki değişim belirlendi. Şekil 4.47'de de gösterildiği gibi 5 μ M FosBApt_1 varlığında FosB:JunD etkileşiminin yaklaşık % 60 oranında inhibe olduğu belirlendi.

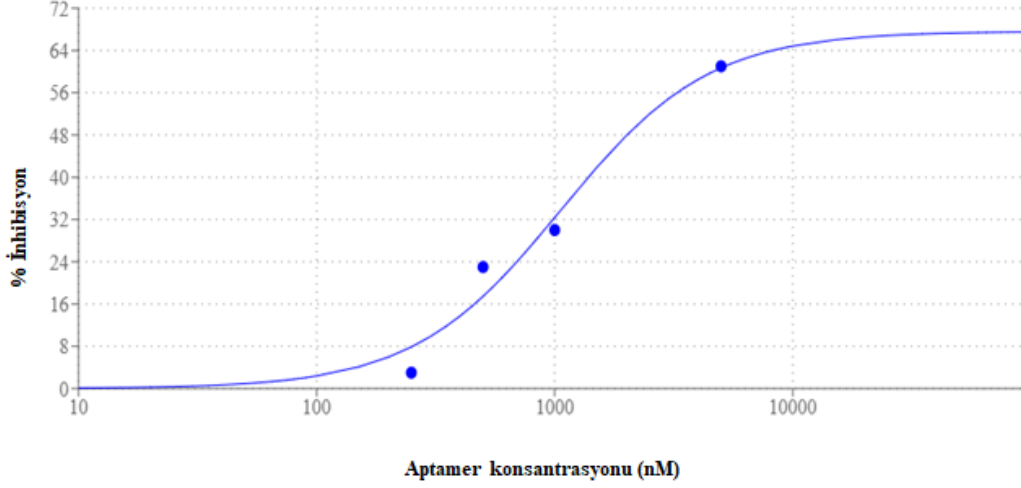


Şekil 4. 46 FosBApt_1 aptamerin farklı konsantrasyonları varlığında gerçekleştirilen pull-down assay sonrasında FosB:JunD kompleksine ilişkin Trisin-SDS-PAGE görüntüsü.



Şekil 4. 47 FosBApt_1 aptamerinin farklı konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği.

FosB:JunD etkileşimine ilişkin IC_{50} değerinin hesaplanması amacı ile AAT Bioquest internet sunucusu (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>), kullanıldı ve FosBApt_1 için yapılan analiz sonrası IC_{50} 1,062 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.48).

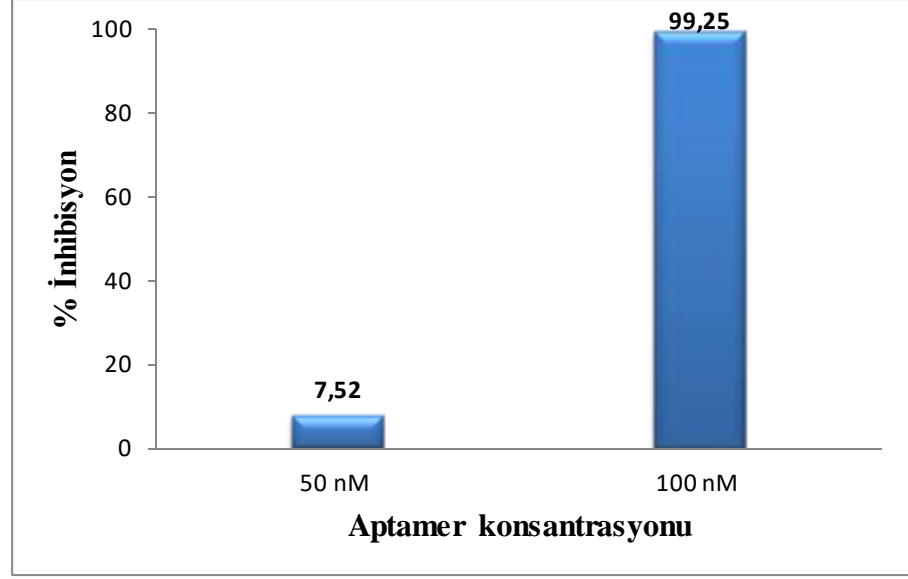


Şekil 4. 48 Aptamer konsantrasyonunun FosB:JunD etkileşimi üzerine etkisini gösteren yüzde inhibisyon grafiği.

4.6.2 Aptamerin c-Fos'un protein etkileşimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi

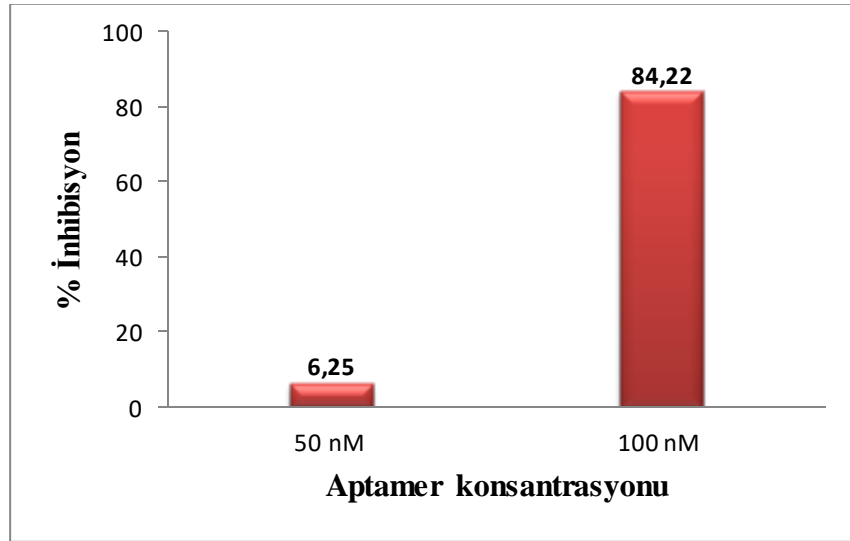
Hem tam uzunluktaki c-Fos hem de c-Fos için en yüksek düzeyde zenginleşme gösteren cfosApt_2/Apt_3 aptamerinin, protein-protein etkileşimini üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi amacı ile kolorimetrik analiz gerçekleştirildi. Protein kompleksin oluşumunun inhibisyonu, kolorimetrik sinyaldeki azalma yoluyla izlendi. Bu yöntem ile His-etiketli tam uzunluktaki c-Fos veya c-Fos'un GST-etiketli c-Jun ve MafB ile olan etkileşimleri farklı konsantrasyonlardaki aptamer varlığında ve yokluğunda 450 nm'de absorbans ölçümleri yoluyla belirlendi.

c-Fos:MafB olan etkileşimleri üzerine etkisinin incelenmesi için farklı aptamer konsantrasyonlarında (0; 50 ve 100 nM) kolorimetrik ölçümler gerçekleştirildi ve elde edilen % rölatif absorbansları hesaplandı. Aptamer yokluğundaki absorbans değeri %100 olarak kabul edilerek 50 ve 100 nM konsantrasyonundaki aptamer varlığının c-Fos:MafB etkileşimini sırasıyla %7,52 ve %99,25 oranında inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.49).

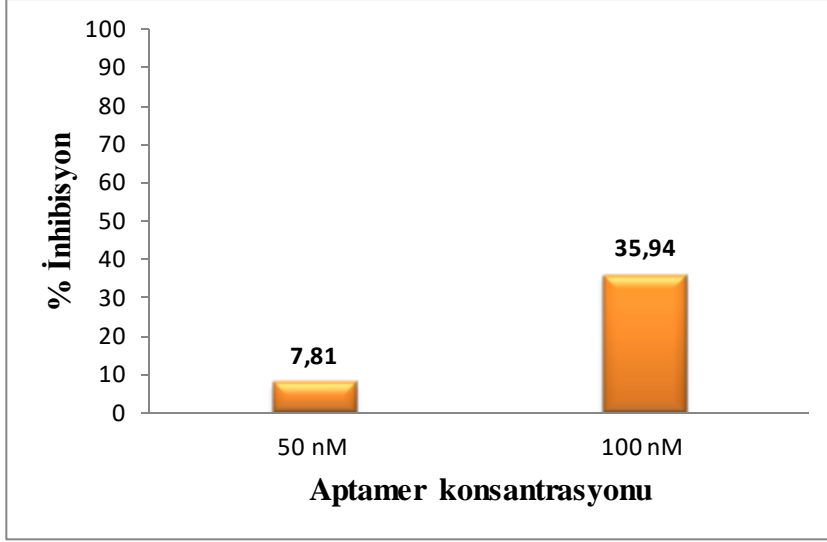


Şekil 4. 49 c-Fos:MafB protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.

Aptamerin tam uzunluktaki c-Fos ile c-Jun veya MafB ile etkileşimleri üzerine etkisinin incelenmesi için de benzer hesaplamalar yapıldı. Aptamer yokluğundaki absorbans değeri %100 olarak kabul edilerek 50 ve 100 nM konsantrasyonundaki aptamer varlığının tam uzunluktaki c-Fos:MafB etkileşimini sırasıyla %6,25 ve %84,22 oranında inhibe ederken (Şekil 4.50), tam uzunluktaki c-Fos:c-Jun etkileşimini ise sırasıyla %7,81 ve %35,94 oranında inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.51).



Şekil 4. 50 Tam uzunluktaki c-Fos:MafB protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.

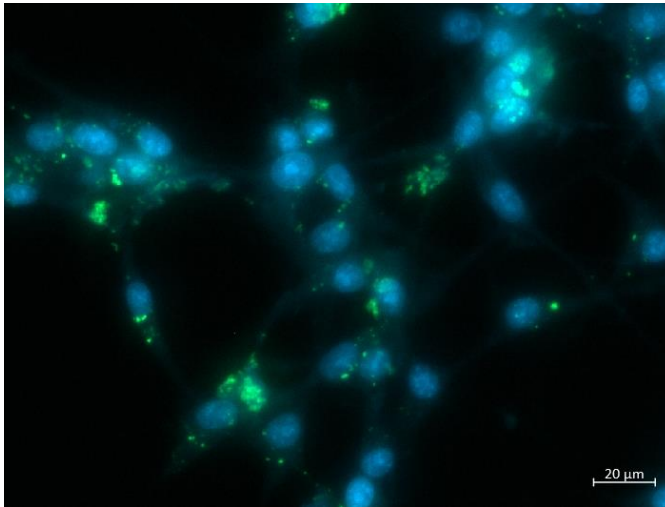


Şekil 4. 51 Tam uzunluktaki c-Fos:c-Jun protein etkileşimi üzerine aptamerin inhibisyon etkisini gösteren kolorimetrik ölçüm grafiği.

4.7 Aptamerlerin Hücre Canlılığına Etkisi ve Hücre İçine Alımı

4.7.1 Aptamer alımı

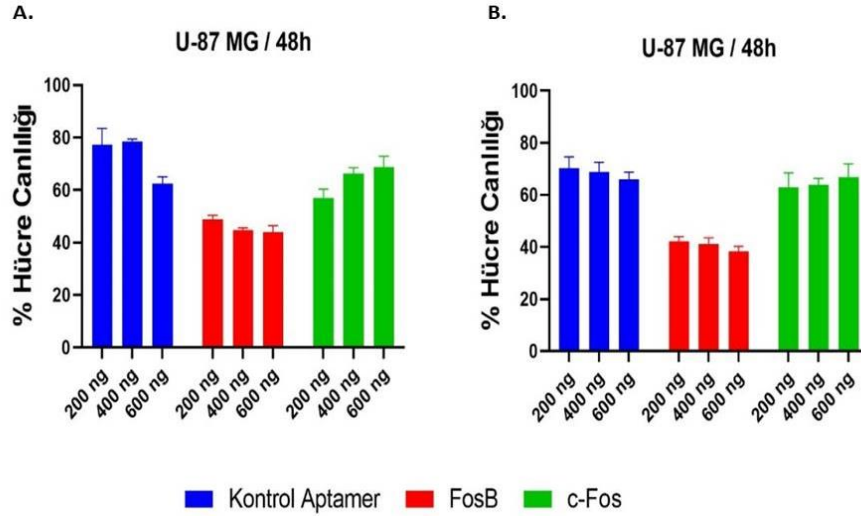
Transfeksiyon ajanı ile beraber uygulanan FAM işaretli aptamerin yeşil renkte yaptığı floresans yayılımı incelendiğinde, aptamerin hücre içine girdiği belirlendi. DNA'ya bağlanarak mavi renkte yayılım yapan DAPI boyası ile beraber incelendiğinde, aptamerin hem sitoplazmada hem de hücre çekirdeğinde olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.52). Transfeksiyon ajanı olmayan denemelerde aptamere bağlı bir ışımaya görülmedi.



Şekil 4. 52 DAPI ve FAM/ FosBApt_1 uygulanmış U-87 MG hücrelerine ait epifloresans görüntüsü.

4.7.2 Aptamerlerin Hücre Canlılığına Etkisi

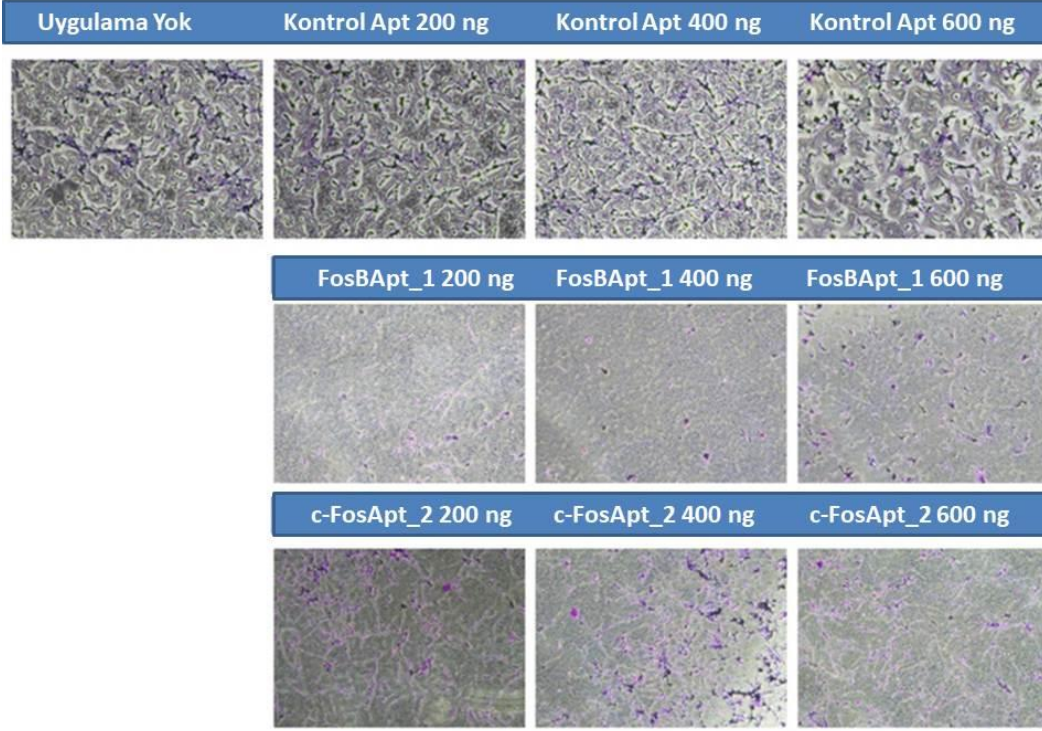
cfosApt_2/Apt_3 ve FosBApt_1 aptamerlerinin hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek amacıyla SRB canlılık metodu kullanıldı. Herhangi bir uygulamaya maruz kalmamış U-87 MG glioblastoma hücrelerinin deney sonundaki canlılığı 100 kabul edilerek yapılan hesaplamalarda, her iki aptamerin de hücre canlılığını düşürdüğü görüldü (Şekil 4.53). Bununla beraber, transfeksiyon ajanları belirli derişimlerde hücreler üzerinde toksik etkiler gösterebilmektedir. Canlılıkta azalmanın aptamerlerin hedeflerinden kaynaklandığını anlamak için herhangi bir hedefi olmayan rastgele diziyeye sahip aptamer kullanıldı (kontrol aptamer). Kontrol aptamer ile karşılaştırıldığında, cfosApt_2/Apt_3 aptamerinin etkisinin olmadığı fakat FosBApt_1 aptamerinin hücre canlılığında gerçekten azalmaya yol açtığı belirlendi. Bu durum, FosBApt_1 aptamerinin hedefine bağlanarak hücreye yanıtı yol açtığı şeklinde yorumlandı.



Şekil 4. 53 cfosApt_2/Apt_3(c-Fos) ve FosBApt_1 (FosB) aptamerlerin U-87 MG hücre canlılığına 48 saatlik etkisi. A. Her kuyuda 0,4 µL transfeksiyon ajanı içeren deney seti. B. Transfeksiyon ajanının 0,2 µL'ye indirildiği deney seti.

Transfeksiyon ajanının olası toksik etkisini gidermek amacıyla, aynı deney transfeksiyon ajanı azaltılarak tekrarlandı ve benzer sonuçlar bulundu (Şekil 4.53). Bununla beraber, SRB ile boyanan hücreler mikroskopta incelendiğinde, kontrol aptamerine bağlı önemli bir morfoloji değişikliği belirlenmedi (Şekil 4.54). FosBApt_1 aptamerinde hücre morfolojide değişim ve hücre

miktarındaki azalma mikroskop görüntülerinde de doğrulandı. Her ne kadar, cfosApt_2/Apt_3 için canlılık sonuçları kontrole göre farklanmamış olsa da mikroskopik incelemede uygulama olmayan ve kontrol aptamer gruplarına kıyasla morfolojik değişimler olduğu belirlendi.



Şekil 4. 54 SRB ile boyalı hücrelerin morfolojik incelenmesi.

5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kötüye kullanımı olan ilaçlar, bağımlılık durumunun meydana gelmesine yapısal ve işlevsel olarak yeniden şekillenmesine katkıda bulunan beynin ödül ve motivasyon merkezlerindeki gen ifadesini etkilemektedir (Bali and Kenny, 2022). Bu mekanizmada etkin rol oynayan Fos ailesinin oluşturduğu AP-1 kompleksi çeşitli hücrel yanıt için de oldukça önemli bir fonksiyona sahip olmakla beraber, oluşan Fos:Jun protein kombinasyonlarına göre farklı metabolik yollarda etkinlik göstermektedir. Bu durum, AP-1 kompleksini daha da önemli bir hedef haline getirmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, AP-1 kompleksinin oluşumunu ve/veya hedef DNA'ya bağlanmasının inhibisyonunu hedefleyen küçük molekül ve peptid temelli inhibitörler geliştirilmiştir. SP100030, AP-1 ve NF- κ B transkripsiyon için geliştirilen ve IC₅₀ değeri μ M düzeyinde olan ilk küçük molekül yapıli inhibitörlerinden biridir (Ye et al., 2014; Huang et al., 2001). Bir c-Fos/AP-1 inhibitörü olan T-5224, şu anda insan klinik deneylerinde kullanılan tek seçici AP-1 inhibitörüdür (Zhao et al., 2021). IC₅₀ değeri μ M düzeyinde olan T-5224, spesifik olarak c-Fos/c-Jun'un DNA bağlanma aktivitesini inhibe etmektedir. Romatoid artrit tedavisi (Uchihashi et al., 2011), intervertebral disk (IVD) dejenerasyonu (Makino et al., 2017), akut böbrek hasarı (Ishida et al., 2015) gibi hastalık modellerinde de çalışmalar gerçekleştirilmiştir. AP-1 önemli bir hedef olmasına rağmen, henüz klinik olarak onaylanmış bir inhibitör bulunmamaktadır. c-Fos:c-Jun etkileşiminin inhibisyonuna yönelik geliştirilmiş küçük peptid temelli inhibitörler de bulunmaktadır. Bu peptitlerin cFos'a bağlanma afiniteleri μ M düzeyindedir (Rao et al., 2013; Mason et al., 2007). Ancak, peptidlerin proteolitik kararsızlıkları ve hızlı bir şekilde metabolize edilmeleri bunların dokularda birikimlerini engelleyerek etkinliklerini düşürmektedir (Henninot et al., 2018). Ek olarak, direkt ya da indirekt olarak c-Fos ve FosB'u hedefleyen bu sayede gen regülasyonunu dizenleyen miRNA'lar ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (Liao et al., 2020; Bao et al., 2021).

Nükleik asit aptamerleri Fos proteinlerine karşı geliştirilmiş aday inhibitörler ile karşılaştırıldığında, uzun süreli depolama ömrü, çok düşük immünojenisite, proteaza dirençlilik, sıcaklığa karşı kararlılık, kolay sentezlenebilmeleri, kimyasal modifikasyon kolaylığı, hedefe yüksek spesifikle bağlanmaları gibi çeşitli avantajları bir arada bulundurmaları

nedeniyle dikkat çekici ilaç adayları olarak karşımıza çıkmaktadır. Fos ailesi proteinleri, hem kronik hem de akut yasadışı madde kullanımından sonra beynin nukleus akumbens ve dorsal striatum bölgelerinde hızla ve geçici olarak uyarılırlar. Fos proteinlerinin seviyesindeki bu hızlı artış özellikle c-fos proteinini maddeye verdiği yanıtın saptanmasında etkin hedef yapmaktadır. Literatürde, c-Jun:c-Jun homodimerine olan K_d değeri EMSA yöntemi kullanılarak 0.5 nM olarak belirlenen DNA aptamerin, hücre kültürü çalışmalarında c-Jun:c-Jun ve NFAT-bağımlı IL-2 raportör aktivitesini baskılayabildiği de gösterilmiştir. Aynı aptamerin, c-Jun:c-Jun homodimerini c-Fos:c-Jun heterodimerinden 100 kat daha iyi bağlanma afinitesi gösterdiği ve DNA'ya bağlanmasını inhibe edebildiği ortaya konmuştur (Walters et al., 2014). FosB'nin, hücre proliferasyonunu, apoptozu ve inflamasyon yanıtlarını düzenlediği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (Liao et al., 2020; Park et al, 2019; Cervantes-Madrid et al., 2017; Tang et al., 2016). Ancak literatürde c-Fos veya FosB'ye karşı geliştirilmiş nükleik asit aptameri bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında *in vitro* SELEX metodu kullanılarak, tam uzunluktaki c-Fos, c-Fos ve FosB proteinlerine karşı farklı DNA aptamerleri geliştirildi. Bu kapsamda esas olarak Fos:Jun etkileşiminin aptamer ile bloke edilmesi yoluyla hedef DNA bölgesine bağlanmasının engellenmesi amaçlandı.

İlk olarak, FosB'nin JunD proteini ile etkileşiminin inhibisyonu yoluyla AP-1 kompleksinin oluşumunun engellenmesi amaçlandı. FosB'nin bZIP domaini için yüksek afiniteye sahip ssDNA aptamerlerini geliştirmek için manyetik boncuk tabanlı SELEX teknolojisi kullanıldı. FosB (153-219. amino asitler) ve JunD (266-332. amino asitler) proteinlerinin rekombinant üretimleri *E. coli* hücrelerinde gerçekleştirildi. FosB ile immobilize edilmiş manyetik boncukların rastgele ssDNA kütüphanesi ile inkübe edilmesiyle SELEX başlatıldı. Dokuz tur SELEX'in ardından, zenginleştirilmiş DNA aptamerleri, yeni nesil dizileme ile tanımlandı. Elde edilen veriler kapsamında, final kütüphanesinden yola çıkarak konsensus motifleri MEME Suite web sunucusu, çoklu dizi analizleri ise Clustal Omega MEME Suite web sunucusu ile analiz edildi. Ardından, elde edilen dizilerin turlar arasındaki zenginleşme katsayısı hesaplandı ve zenginleşen aday aptamer arasından en kararlı sekonder yapıya sahip adaylar belirlendi. Bağlanma afinitesinin daha ayrıntılı karakterizasyonu için FosBApt_1, FosBApt_3 ve

FosBApt_13 dizileri seçildi. Aday aptamerlerin bağlanma afinitesini karakterize etmek için ITC ölçümleri gerçekleştirildi. FosB'ye K_d değerleri sırasıyla 727 nM ve 634 nM ile en iyi afinite gösteren sırasıyla FosBApt_1 ve FosBApt_13 aptamerleri belirlendi. Son olarak, FosBApt_1 ssDNA aptamerlerinin protein etkileşimi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlendi. Bu amaçla, FosB:JunD protein-protein etkileşimi için pull-down assay gerçekleştirildi ve FosBApt_1 için IC_{50} değeri 1,062 μ M olarak belirlendi.

İkinci olarak, hem tam uzunluktaki c-Fos'a hem de c-Fos'un protein etkileşiminde etkin olan bZIP domaini hedeflenerek iki farklı manyetik boncuk tabanlı SELEX gerçekleştirildi. Tam uzunluktaki c-Fos ticari olarak temin edilirken, c-Fos bZIP domaininin *E. coli* hücrelerinde rekombinant üretimi gerçekleştirildi. c-Fos ve tam uzunluktaki c-Fos proteinlerine karşı geliştirilen aptamer dizilerinin analizleri sonucunda her iki hedef için de en fazla zenginleştiği tespit edilen dizilerden 2 aptamer dizisinin (cfosApt_2/Apt_3 ve cfosApt_1/Apt_5) %100 benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu aptamerlerin ITC ölçümleri de c-Fos'a karşı gerçekleştirildi. cfosApt_2/Apt_3'ün c-Fos için K_d değeri 390 nM, cfosApt_1/Apt_5'in c-Fos için K_d değeri 302 nM olarak belirlendi. c-Fos'un MafB ve c-Jun ile olan protein etkileşimleri için kolorimetrik analiz gerçekleştirildi. 100 nM konsantrasyonundaki cfosApt_2/Apt_3 aptamer varlığında tam uzunluktaki c-Fos ile MafB etkileşimini %84,22 oranında, tam uzunluktaki c-Fos ile c-Jun etkileşiminin ise %35,94 oranında inhibe olduğu belirlendi. Ayrıca, c-Fos:MafB etkileşiminde için de %99,25 oranında inhibisyon belirlendi.

Son olarak, FAM işaretli aptamerin U-87 MG hücrelerine transfeksiyon ajanı ile girişi gösterildikten sonra cfosApt_2/Apt_3 ve FosBApt_1 aptamerlerinin hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek amacıyla SRB canlılık metodu kullanıldı. FosBApt_1 varlığında, hücre morfolojisinde ve hücre miktarında azalma yönünde değişim belirlendi. Ancak, cfosApt_2/Apt_3 için canlılık sonuçları kontrole göre farklılaşmamış olsa da hücrelerde morfolojik değişimler gözlemlendi.

Tedavi için kullanılan ilaçlar, şiddetli fiziksel bağımlılığı olan hastalarda tedavinin ilk aşamalarında hastaların yoksunluk belirtilerini hafifletmeye ve

tedavide kalmasına yardımcı olmaktadır. Son yıllarda kullanılan farmakoterapilerin çoğu, spesifik bağımlılığın bir sonucu olarak düzensiz olan nörotransmitterlerin/nöromodülatörlerin beyin reseptörlerini hedefler ve çoğu ilaç, tam agonist ilaçlar, kısmi agonistler ve antagonist ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Disülfirmam (Antabuse), 1951 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından alkol bağımlılığının tedavisi için onaylı ilk ilaçtır ve alkolün parçalanmasında asetaldehiti asetata dönüştüren enzim olan aldehit dehidrogenazı inhibe ederek etkinlik göstermektedir (Shirley et al., 2021; Douaihy et al., 2013). Benzer şekilde, sigarayı bırakmak için nikotin replasman tedavisi, bupropion ve vareniklin olmak üzere üç tedavi yaklaşımı kullanılmaktadır (Aubin et al., 2014). Ancak, bu tedavilerin, davranışsal terapi ile birlikte uygulanmasının gerekmesi ve hala beklenmeyen yan etkilerinin gözlemlenmesi de sınırlamaları arasındadır.

Sonuç olarak, c-Fos ve FosB proteinlerine yüksek afinite ile bağlanarak protein etkileşimini yüksek oranda inhibe edebilen DNA aptamerleri geliştirildi. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların madde bağımlılığının etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması, tedavisi ve tanısında kullanılmak üzere yeni stratejilerin geliştirilmesi açısından literatüre önemli bir ölçüde katkı sağlayacağı beklenmektedir. Ek olarak, ileri düzeydeki memeli hücre kültürü ve/veya hayvan modellerinde *in vitro* seçilmiş aday aptamerlerin daha ileri karakterizasyon çalışmaları, AP-1 komplekslerinin madde bağımlılığındaki benzersiz biyolojik rollerinin anlaşılmasına katkı yapabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Afrasiabi, S., Pourhajbagher, M., Raoofian, R., Tabarzad, M., Bahador, A.,** 2020, Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections, *Journal of Biomedical Science*, 27(1):6.
- Agnello, L., Camorani, S., Fedele, M., Cerchia, L.,** 2021, Aptamers and antibodies: rivals or allies in cancer targeted therapy?, *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, 2(1):107.
- Ahmad, H. M., Muiwo, P., Muthuswami, R., Bhattacharya, A.,** 2017, FosB regulates expression of miR-22 during PMA induced differentiation of K562 cells to megakaryocytes, *Biochimie*, 133:1-6.
- Alibhai, I. N., Green, T. A., Potashkin, J. A., Nestler, E. J.,** 2007, Regulation of fosB and Δ fosB mRNA expression: In vivo and in vitro studies, *Brain research*, 1143:22-33.
- Al-Ogaili, A. S., Liyanage, R., Lay, J. O., Jiang, T., Vuong, C. N., Agrawal, S., Kumar, T.K.S., Berghman, L.R., Hargis, B.M. and Kwon, Y. M.,** 2020, DNA aptamer-based Rolling circle amplification product as a novel immunological adjuvant, *Scientific reports*, 10(1):1-12.
- Amini, R., Zhang, Z., Li, J., Gu, J., Brennan, J. D., Li, Y.,** 2022, Aptamers for SARS-CoV-2: Isolation, Characterization, and Diagnostic and Therapeutic Developments, *Analysis & Sensing*, 2(5):e202200012.
- Anderson, E. M., Wissman, A. M., Chemplanikal, J., Buzin, N., Guzman, D., Larson, E. B., Neve, R. L., Nestler, E. J., Cowan, C. W. Self, D. W.** 2017, BDNF-TrkB controls cocaine-induced dendritic spines in rodent nucleus accumbens dissociated from increases in addictive behaviors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35):9469-9474.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Andersson, M., Westin, J. E., Cenci, M. A.**, 2003, Time course of striatal Δ FosB-like immunoreactivity and prodynorphin mRNA levels after discontinuation of chronic dopaminomimetic treatment, *European journal of neuroscience*, 17(3):661-666.
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E. J.**, 2001, Induction of nuclear factor- κ B in nucleus accumbens by chronic cocaine administration, *Journal of neurochemistry*, 79(1):221-224.
- Aubin, H. J., Luquiens, A., Berlin, I.**, 2014, Pharmacotherapy for smoking cessation: pharmacological principles and clinical practice, *British journal of clinical pharmacology*, 77(2):324-336.
- Avci-Adali, M., Paul, A., Wilhelm, N., Ziemer, G., Wendel, H. P.**, 2009, Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation, *Molecules*, 15(1):1-11.
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., Noble, W. S.**, 2015, The MEME süite, *Nucleic acids research*, 43:39-49.
- Bakhtiari, H., Palizban, A. A., Khanahmad, H., Mofid, M. R.**, 2021, Novel approach to overcome defects of cell-SELEX in developing aptamers against aspartate β -hydroxylase, *ACS omega*, 6(16):11005-11014.
- Bali, P., Kenny, P. J.**, 2022, Transcriptional mechanisms of drug addiction, *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(3):136-143.
- Bao, Y., Qiao, Y., Yu, H., Zhang, Z., Yang, H., Xin, X., Chen, Y., Guo, Y., Wu, N., Jia, D.**, 2021, miRNA-27a transcription activated by c-Fos regulates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting ATAD3a, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021:1-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barrot, M., Olivier, J. D., Perrotti, L. I., DiLeone, R. J., Berton, O., Eisch, A. J., Impey, S., Storm, D. R., Neve R. L., Yin, J. C., Zachariou, V., Nestler, E. J.**, 2002, CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17):11435-11440.
- Bejjani, F., Evanno, E., Zibara, K., Piechaczyk, M., Jariel-Encontre, I.**, 2019, The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1872(1):11-23.
- Berke, J. D., Hyman, S. E.**, 2000, Addiction, dopamine, and the review molecular mechanisms of memory, *Neuron*, 25(3):515-32.
- Bibb, J. A., Chen, J., Taylor, J. R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G. L., Yan, Z., Sagawa, Z. K., Ouimet, C. C., Nairn, A. C., Nestler, E. J., Greengard, P.**, 2001, Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5, *Nature*, 410(6826):376-380.
- Bodnar, R. J.**, 2019, Endogenous opioid modulation of food intake and body weight: Implications for opioid influences upon motivation and addiction, *Peptides*, 116:42-62.
- Bor, G., Man, E., Ugurlu, O., Ceylan, A. E., Balaban, S., Durmus, C., Gumus, Z. P., Evran, S., Timur, S.**, 2020, In vitro selection of aptamer for imidacloprid recognition as model analyte and construction of a water analysis platform, *Electroanalysis*, 32(9):1922-1929.
- Bradford, M. M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254.
- Brennan, A., Leech, J. T., Kad, N. M., Mason, J. M.**, 2020, Selective antagonism of cJun for cancer therapy, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39:1-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brennan, A., Leech, J. T., Kad, N. M., Mason, J. M.,** 2022, An approach to derive functional peptide inhibitors of transcription factor activity, *JACS Au*, 2(4):996-1006.
- Bruno, J. G.,** 2022, Applications in Which Aptamers Are Needed or Wanted in Diagnostics and Therapeutics, *Pharmaceuticals*, 15(6):693.
- Bushweller, J. H.,** 2019, Targeting transcription factors in cancer—from undruggable to reality, *Nature Reviews Cancer*, 19(11):611-624.
- Busschots, K., Vercammen, J., Emiliani, S., Benarous, R., Engelborghs, Y., Christ, F., Debysier, Z.,** 2005, The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding, *Journal of Biological Chemistry*, 280(18):17841-17847.
- Cahill, M. E., Walker, D. M., Gancarz, A. M., Wang, Z. J., Lardner, C. K., Bagot, R. C., Neve, R. L., Dietz, D. M., Nestler, E. J.,** 2018, The dendritic spine morphogenic effects of repeated cocaine use occur through the regulation of serum response factor signaling, *Molecular Psychiatry*, 23(6):1474-1486.
- Cao, H. Y., Yuan, A. H., Shi, X. S., Chen, W., Miao, Y.,** 2014, Evolution of a gastric carcinoma cell-specific DNA aptamer by live cell-SELEX, *Oncology Reports*, 32(5):2054-2060.
- Cassiday, L. A., Maher, L. J.,** 2001, In vivo recognition of an RNA aptamer by its transcription factor target, *Biochemistry*, 40(8), 2433-2438.
- Catuogno, S., Esposito, C. L., Quintavalle, C., Condorelli, G., De Franciscis, V., Cerchia, L.,** 2012, Nucleic acids in human glioma treatment: innovative approaches and recent results, *Journal of Signal Transduction*, 2012.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cervantes Madrid, D. L., Nagi, S., Astring Gustafsson, A.,** 2017, FosB transcription factor regulates COX 2 expression in colorectal cancer cells without affecting PGE2 expression, *Oncology Letters*, 13(3):1411-1416.
- Chen, L., Rashid, F., Shah, A., Awan, H. M., Wu, M., Liu, A., Wang, J., Zhu, T., Luo, Z., Shan, G.,** 2015, The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32):10002-10007.
- Chen, Z., Luo, H., Gubu, A., Yu, S., Zhang, H., Dai, H., Zhang, Y., Zhang, B., Ma, Y., Lu, A., Zhang, G.,** 2023, Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins via enhanced non-covalent bonding, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11.
- Chiarella, E., Aloisio, A., Scicchitano, S., Bond, H. M., Mesuraca, M.,** 2021, Regulatory role of microRNAs targeting the transcription co-factor ZNF521 in normal tissues and cancers, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16):8461.
- Choi, Y. S., Hur, J., Lee, H. K., Jeong, S.,** 2009, The RNA aptamer disrupts protein-protein interaction between β -catenin and nuclear factor- κ B p50 and regulates the expression of C-reactive protein, *FEBS Letters*, 583(9):1415-1421.
- Cruz Da Silva, E., Foppolo, S., Lhermitte, B., Ingremeau, M., Justiniano, H., Klein, L., Chenard, M. P., Vauchelles, R., Abdallah, B., Lehmann, M., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., Choulier, L.,** 2022, Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity, *Pharmaceutics*, 14(10):1980.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dawei, Z., Hongqiu, H., Mengmeng, L., Zhixia, M., Shunxing, G.,** 2016, A novel assay for screening inhibitors targeting HIV integrase LEDGF/p75 interaction based on Ni²⁺ coated magnetic agarose beads, *Scientific Reports*, 6(1):33477.
- Douaihy, A. B., Kelly, T. M., Sullivan, C.,** 2013, Medications for substance use disorders, *Social Work in Public Health*, 28(3-4):264-278.
- Eaton, R. M., Shallcross, J. A., Mael, L. E., Mears, K. S., Minkoff, L., Scoville, D. J., Whelan, R. J.,** 2015, Selection of DNA aptamers for ovarian cancer biomarker HE4 using CE-SELEX and high-throughput sequencing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(23):6965-6973.
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W.,** 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346(6287):818-822.
- Farrel Côrtes, M., Marli Bes, T., Ribeiro Deo, B., Barbosa dos Anjos, B., Jimenez Galisteo Jr, A., Cerdeira Sabino, E., Santos, C., Figueiredo Costa, S.,** 2022, Selection and identification of a DNA Aptamer for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* using an in-House Cell-SELEX methodology, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 669.
- Faubert, B. L., Kaminski, N. E.,** 2000, AP-1 activity is negatively regulated by cannabinoil through inhibition of its protein components, c-fos and c-jun, *Journal of Leukocyte Biology*, 67(2):259-266.
- Fouzder, C., Mukhuty, A., Mukherjee, S., Malick, C., Kundu, R.,** 2021, Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells, *Toxicology in Vitro*, 70:105038.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Frith, K. A., Fogel, R., Goldring, J. P., Krause, R. G., Khati, M., Hoppe, H., Cromhout, M. E., Jiwaji, M., Limson, J. L.,** 2018, Towards development of aptamers that specifically bind to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* through epitopic targeting, *Malaria Journal*, 17(1):1-16.
- Gajewski, P. A., Turecki, G., Robison, A. J.,** 2016, Differential expression of FosB proteins and potential target genes in select brain regions of addiction and depression patients, *PLoS One*, 11(8):e0160355.
- Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H., Weisstaub, N. V.,** 2018, Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on c-Fos, Egr1 and Arc, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12:79.
- Garces de los Fayos Alonso, I., Liang, H. C., Turner, S. D., Lager, S., Merkel, O., Kenner, L.,** 2018, The role of activator protein-1 (AP-1) family members in CD30-positive lymphomas, *Cancers*, 10(4):93.
- García-García, F., Priego-Fernández, S., López-Muciño, L. A., Acosta-Hernández, M. E., Peña-Escudero, C.,** 2021, Increased alcohol consumption in sleep-restricted rats is mediated by delta FosB induction, *Alcohol*, 93:63-70.
- Graham, D. L., Edwards, S., Bachtell, R. K., DiLeone, R. J., Rios, M., Self, D. W.,** 2007, Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse, *Nature Neuroscience*, 10(8):1029-1037.
- Grueter, B. A., Robison, A. J., Neve, R. L., Nestler, E. J., Malenka, R. C.,** 2013, Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 110(5):1923-1928.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, L., Li, Y., Gao, S., Ren, L.,** 2023, Detection of ochratoxin A using a “turn-on” fluorescence assay based on guanine quenching of the aptamer, *Analytical Sciences*, 39(1):51-57.
- Guo, X., Wen, F., Zheng, N., Saive, M., Fauconnier, M. L., Wang, J.,** 2020, Aptamer-based biosensor for detection of mycotoxins, *Frontiers in Chemistry*, 8:195.
- Gupta, S., Kulhara, P.,** 2007, Cellular and molecular mechanisms of drug dependence: An overview and update, *Indian Journal of Psychiatry*, 49(2):85.
- Halawa, O. A., Lin, J. B., Miller, J. W., Vavvas, D. G.,** 2021, A review of completed and ongoing complement inhibitor trials for geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration, *Journal of Clinical Medicine*, 10(12):2580.
- Hellman, L. M., Fried, M. G.,** 2007, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions, *Nature Protocols*, 2(8):1849-1861.
- Henninot, A., Collins, J. C., Nuss, J. M.,** 2018, The current state of peptide drug discovery: back to the future?, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(4):1382-1414.
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., Verbalis, J. G.,** 1993, c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(3):173-213.
- Hu, M., Zhu, D., Zhou, X.,** 2022, M– CDC: Magnetic pull-down-assisted colorimetric method based on the CRISPR/Cas12a system, *Methods*, 203:259-267.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, T. J., Adcock, I. M., Chung, K. F.,** 2001, A novel transcription factor inhibitor, SP100030, inhibits cytokine gene expression, but not airway eosinophilia or hyperresponsiveness in sensitized and allergen-exposed rat, *British Journal of Pharmacology*, 134(5):1029-1036.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C.,** 2001, Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence, *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10):695-703.
- Ishida, M., Ueki, M., Morishita, J., Ueno, M., Shiozawa, S., Maekawa, N.,** 2015, T-5224, a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1, improves survival by inhibiting serum high mobility group box-1 in lethal lipopolysaccharide-induced acute kidney injury model, *Journal of Intensive Care*, 3:1-7.
- Kaska, A., Seçme, M.,** 2023, The antioxidant potential, phenolic compounds, cytotoxic activity and mineral element analysis of *Gentiana septemfida* Pallas and its antiproliferative effect on HT-29 cell line, *European Journal of Integrative Medicine*, 59:102240.
- Kelz, M. B., Nestler, E. J.,** 2000, Δ FosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity, *Current Opinion in Neurology*, 13(6):715-720.
- Kikin, O., D'Antonio, L., Bagga, P. S.,** 2006, QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences, *Nucleic Acids Research*, 34:676-682.
- Kim, D. H., Seo, J. M., Shin, K. J., Yang, S. G.,** 2021, Design and clinical developments of aptamer-drug conjugates for targeted cancer therapy, *Biomaterials Research*, 25:1-12.
- Kim, D. M., Go, M. J., Lee, J., Na, D., Yoo, S. M.,** 2021, Recent advances in micro/nanomaterial-based aptamer selection strategies, *Molecules*, 26(17):5187.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klingler, C., Ashley, J., Shi, K., Stiefvater, A., Kyba, M., Sinnreich, M., Aihara, H., Kinter, J.,** 2020, DNA aptamers against the DUX4 protein reveal novel therapeutic implications for FSHD, *The FASEB Journal*, 34(3):4573.
- Kohlberger, M., Gadermaier, G.,** 2022, SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(5):1771-1792.
- Komarova, N., Barkova, D., Kuznetsov, A.,** 2020, Implementation of high-throughput sequencing (HTS) in aptamer selection technology, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22):8774.
- Kong, Q., Yue, F., Liu, M., Huang, J., Yang, F., Liu, J., Li, J., Li, F., Sun, X., Guo, Y., Zhu, Y.,** 2022, Non-immobilized GO-SELEX of aptamers for label-free detection of thiamethoxam in vegetables, *Analytica Chimica Acta*, 1202:339677.
- Koob, G. F., Le Moal, M.,** 2001, Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis, *Neuropsychopharmacology*, 24(2):97-129.
- Koob, G. F., Le Moal, M.,** 2008, Addiction and the brain antireward system, *Annu. Rev. Psychol.*, 59:29-53.
- Kovács, K. J.,** 2008, Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond, *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6):665-672.
- Kökpınar, Ö., Walter, J. G., Shoham, Y., Stahl, F., Scheper, T.,** 2011, Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads, *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10):2371-2379.
- Kratschmer, C., Levy, M.,** 2017, Effect of chemical modifications on aptamer stability in serum, *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(6):335-344.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lam, J. K., Chow, M. Y., Zhang, Y., Leung, S. W.,** 2015, siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4:e252.
- Lane, M. D., Seelig, B.,** 2016, Highly efficient recombinant production and purification of streptococcal cysteine protease streptopain with increased enzymatic activity, *Protein Expression and Purification*, 121:66-72.
- Larson, E. B., Graham, D. L., Arzaga, R. R., Buzin, N., Webb, J., Green, T. A., Bass, C. E., Neve, R. L., Terwilliger, E. F., Nestler, E. J., Self, D. W.,** 2011, Overexpression of CREB in the nucleus accumbens shell increases cocaine reinforcement in self-administering rats, *Journal of Neuroscience*, 31(45):16447-16457.
- Lebruska, L. L., Maher, L. J.,** 1999, Selection and characterization of an RNA decoy for transcription factor NF- κ B, *Biochemistry*, 38(10):3168-3174.
- Li, F., Wang, Q., Zhang, H., Deng, T., Feng, P., Hu, B., Jiang, Y., Cao, L.,** 2018a, Characterization of a DNA aptamer for ovarian cancer clinical tissue recognition and in vivo imaging, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6):2564-2574.
- Li, J., Ren, X., Zhao, J., Lou, X.,** 2021a, PD-L1 aptamer isolation via Modular-SELEX and its applications in cancer cell detection and tumor tissue section imaging, *Analyst*, 146(9):2910-2918.
- Li, L., Wan, J., Wen, X., Guo, Q., Jiang, H., Wang, J., Ren, Y., Wang, K.,** 2021b, Identification of a new DNA aptamer by tissue-SELEX for cancer recognition and imaging, *Analytical Chemistry*, 93(19):7369-7377.
- Li, L., Xu, S., Peng, X., Ji, Y., Yan, H., Cui, C., Li, X., Pan, X., Yang, L., Qiu, L., Jiang, J., Tan, W.,** 2021c, Engineering G-quadruplex aptamer to modulate its binding specificity, *National Science Review*, 8(4): nwa202.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, P. C., Tu, M. J., Ho, P. Y., Jilek, J. L., Duan, Z., Zhang, Q. Y., Yu, A. X., Yu, A. M.,** 2018b, Bioengineered NRF2-siRNA is effective to interfere with NRF2 pathways and improve chemosensitivity of human cancer cells, *Drug Metabolism and Disposition*, 46(1):2-10.
- Liao, Y., Wang, Z., Wang, L., Lin, Y., Ye, Z., Zeng, X., Wei, F.,** 2020, MicroRNA-27a-3p directly targets FosB to regulate cell proliferation, apoptosis, and inflammation responses in immunoglobulin a nephropathy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(4):1124-1130.
- Lijuan, C., Xing, Y., Minxi, W., Wenkai, L., Le, D.,** 2017, Development of an aptamer-ampicillin conjugate for treating biofilms, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(2):847-854.
- Liu, Y., Wang, N., Chan, C. W., Lu, A., Yu, Y., Zhang, G., Ren, K.,** 2021, The application of microfluidic technologies in aptamer selection, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:730035.
- Liu, M., Wang, L., Lo, Y., Shiu, S. C. C., Kinghorn, A. B., Tanner, J. A.,** 2022, Aptamer-Enabled Nanomaterials for Therapeutics, Drug Targeting and Imaging, *Cells*, 11(1):159.
- Lou, X., Qian, J., Xiao, Y., Viel, L., Gerdon, A. E., Lagally, E. T., Atzberger, P., Tarasow, T. M., Heeger, A. J., Soh, H. T.,** 2009, Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9):2989-2994.
- Lu, C., Liu, C., Zhou, Q., Chen, X., Li, H., Wang, S., Guo, Y.,** 2022, Selecting specific aptamers that bind to ovine pregnancy-associated glycoprotein 7 using real serum sample-assisted FluMag-SELEX to develop magnetic microparticle-based colorimetric aptasensor, *Analytica Chimica Acta*, 1191:339291.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lyu, C., Khan, I. M., Wang, Z.**, 2021, Capture-SELEX for aptamer selection: A short review, *Talanta*, 229:122274.
- Lyu, Y., Chen, G., Shanguan, D., Zhang, L., Wan, S., Wu, Y.**, 2016, Generating Cell Targeting Aptamers for Nanotheranostics Using Cell-SELEX, *Theranostics*, 6 (9):1440–1452.
- Makino, H., Seki, S., Yahara, Y., Shiozawa, S., Aikawa, Y., Motomura, H., Nogami, M., Watanabe, K., Sainoh, T., Ito, H., Tsumaki, N., Kawaguchi, Y., Yamazaki, M., Kimura, T.**, 2017, A selective inhibition of c-Fos/activator protein-1 as a potential therapeutic target for intervertebral disc degeneration and associated pain, *Scientific Reports*, 7(1):16983.
- Mason, J. M., Müller, K. M., Arndt, K. M.**, 2007, Positive aspects of negative design: simultaneous selection of specificity and interaction stability, *Biochemistry*, 46(16):4804-4814.
- Matthews, C. P., Colburn, N. H., Young, M. R.**, 2007, AP-1 a target for cancer prevention, *Current Cancer Drug Targets*, 7(4):317-324.
- Mayer, G., Ahmed, M. S. L., Dolf, A., Endl, E., Knolle, P. A., Famulok, M.**, 2010, Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures, *Nature Protocols*, 5(12):1993-2004.
- McClung, C. A., Nestler, E. J.**, 2003, Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and Δ FosB, *Nature Neuroscience*, 6(11):1208-1215.
- McClung, C. A., Nestler, E. J.**, 2008, Neuroplasticity mediated by altered gene expression, *Neuropsychopharmacology*, 33(1):3-17.
- McClung, C. A., Ulery, P. G., Perrotti, L. I., Zachariou, V., Berton, O., Nestler, E. J.**, 2004, Δ FosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Molecular Brain Research*, 132(2):146-154.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McPherson, C. S., Lawrence, A. J.,** 2007, The nuclear transcription factor CREB: involvement in addiction, deletion models and looking forward, *Current Neuropharmacology*, 5(3):202-212.
- Mendonsa, S. D., Bowser, M. T.,** 2004, In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 76(18):5387-5392.
- Milde-Langosch, K.,** 2005, The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis, *European Journal of Cancer*, 41(16):2449-2461.
- Modh, H., Scheper, T., Walter, J. G.,** 2018, Aptamer-modified magnetic beads in biosensing, *Sensors*, 18(4):1041.
- Mondragón, E., Maher III, L. J.,** 2016, Anti-transcription factor RNA aptamers as potential therapeutics, *Nucleic Acid Therapeutics*, 26(1):29-43.
- Moreira, D., Leitão, D., Lopes-Nunes, J., Santos, T., Figueiredo, J., Miranda, A., Alexandre, D., Tomaz, C., Mergny, J. L., Cruz, C.,** 2022, G-Quadruplex Aptamer-Ligand Characterization, *Molecules*, 27(20):6781.
- Morrow, J. D., Flagel, S. B.,** 2016, Neuroscience of resilience and vulnerability for addiction medicine: From genes to behavior, *Progress in Brain Research*, 223:3-18.
- Murakami, K., Izuo, N., Bitan, G.,** 2022, Aptamers targeting amyloidogenic proteins and their emerging role in neurodegenerative diseases, *Journal of Biological Chemistry*, 298(1).
- Muschamp, J. W., Carlezon, W. A.,** 2013, Roles of nucleus accumbens CREB and dynorphin in dysregulation of motivation, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(2):a012005.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Na, H. H., Noh, H. J., Cheong, H. M., Kang, Y., Kim, K. C.,** 2016, SETDB1 mediated FosB expression increases the cell proliferation rate during anticancer drug therapy, *BMB Reports*, 49(4):238.
- Namba, M. D., Phillips, M. N., Neisewander, J. L., Olive, M. F.,** 2022, Nuclear factor kappa B signaling within the rat nucleus accumbens core sex-dependently regulates cue-induced cocaine seeking and matrix metalloproteinase-9 expression, *Brain, Behavior, and Immunity*, 102:252-265.
- Narayan, C., Kwon, J., Kim, C., Kim, S. J., Jang, S. K.,** 2020, Virus-based SELEX (viro-SELEX) allows development of aptamers targeting knotty proteins, *Analyst*, 145(4):1473-1482.
- Nascimento, G. C., de Paula, B. B., Ferrari, D. P., Iyomasa, D. M., Pereira, Y. C., Pedrazzi, J. F., Bortolanza, M., Issy, A. C., Issa, J. P. M., Leite-Panissi, C. R. A., Iyomasa, M. M., Del-Bel, E.,** 2021, Upregulation of FosB/ Δ FosB in limbic circuits after tooth exodontia-induced occlusal instability in an experimental model of unpredictable chronic stress, *Brain Research Bulletin*, 176:142-150.
- Nestler, E. J.,** 2004, Molecular mechanisms of drug addiction, *Neuropharmacology*, 47:24-32.
- Nestler, E. J.,** 2005, Is there a common molecular pathway for addiction?, *Nature Neuroscience*, 8(11):1445-1449.
- Nestler, E. J.,** 2008, Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507):3245-3255.
- Nestler, E. J.,** 2012, Transcriptional mechanisms of drug addiction, *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 10(3):136.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nestler, E. J.**, 2015, Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses, *European Journal of Pharmacology*, 753:66-72.
- Nestler, E. J., Barrot, M., Self, D. W.**, 2001, Δ FosB: a sustained molecular switch for addiction, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20):11042-11046.
- Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham Jr, E. T., Guyer, D. R., Adamis, A. P.**, 2006, Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2):123-132.
- Ni, S., Zhuo, Z., Pan, Y., Yu, Y., Li, F., Liu, J., Wang, L., Wu, X., Li, D., Wan, Y., Zhang, L., Yang, Z., Zhang, B. T., Lu, A., Zhang, G.**, 2020, Recent progress in aptamer discoveries and modifications for therapeutic applications, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(8):9500-9519.
- Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., Lupold, S. E.**, 2011, Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons, *Current Medicinal Chemistry*, 18(27):4206-4214.
- Nikam, P. S., Palachandra, S., Kingston, J. J.**, 2022, In vitro selection and characterization of ssDNA aptamers by cross-over SELEX and its application for detection of *S. Typhimurium*, *Analytical Biochemistry*, 656:114884.
- Ninomiya, K., Kaneda, K., Kawashima, S., Miyachi, Y., Ogino, C., Shimizu, N.**, 2013, Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(6):1797-1802.
- Noback, M., Zhang, G., White, N., Barrow, J. C., Carr, G. V.**, 2021, Post-weaning social isolation increases Δ FosB/FosB protein expression in sex-specific patterns in the prelimbic/infralimbic cortex and hippocampus in mice, *Neuroscience Letters*, 740:135423.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Norrholm, S. D., Bibb, J. A., Nestler, E. J., Ouimet, C. C., Taylor, J. R., Greengard, P.,** 2003, Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5, *Neuroscience*, 116(1):19-22.
- Oliveira, R., Pinho, E., Sousa, A. L., Dias, Ó., Azevedo, N. F., Almeida, C.,** 2022, Modelling aptamers with nucleic acid mimics (NAM): From sequence to three-dimensional docking, *Plos One*, 17(3):e0264701.
- Olsen, T., Zhu, J., Kim, J., Pei, R., Stojanovic, M. N., Lin, Q.,** 2017, An integrated microfluidic SELEX approach using combined electrokinetic and hydrodynamic manipulation, *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 22(1):63-72.
- Opazo, F., Eiden, L., Hansen, L., Rohrbach, F., Wengel, J., Kjems, J., Mayer, G.,** 2015, Modular assembly of cell-targeting devices based on an uncommon G-quadruplex aptamer, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4:e251.
- Ozanne, B. W., Spence, H. J., McGarry, L. C., Hennigan, R. F.,** 2007, Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals, *Oncogene*, 26(1):1-10.
- Özyurt, C., Canbay, Z. Ç., Dinçkaya, E., Evran, S.,** 2019, A highly sensitive DNA aptamer-based fluorescence assay for sarcosine detection down to picomolar levels, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129:91-97.
- Pagano, B., Mattia, C. A., Giancola, C.,** 2009, Applications of isothermal titration calorimetry in biophysical studies of G-quadruplexes, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7):2935-2957.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Paniel, N., Istamboulié, G., Triki, A., Lozano, C., Barthelmebs, L., Noguer, T.,** 2017, Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor, *Talanta*, 162:232-240.
- Park, J. A., Na, H. H., Jin, H. O., Kim, K. C.,** 2019, Increased expression of fosb through reactive oxygen species accumulation functions as pro-apoptotic protein in Piperlongumine Treated MCF7 breast cancer cells, *Molecules and Cells*, 42(12):884.
- Peakman, M. C., Colby, C., Perrotti, L. I., Tekumalla, P., Carle, T., Ulery, P., Chao, J., Duman, C., Steffen, C., Monteggia, L., Allen, M. R., Stock, J. L., Duman, R. S., McNeish, J. D., Barrot, M., Self, D. W., Nestler, E. J., Schaeffer, E.,** 2003, Inducible, brain region-specific expression of a dominant negative mutant of c-Jun in transgenic mice decreases sensitivity to cocaine, *Brain Research*, 970(1-2):73-86.
- Peng, C. G., Damha, M. J.,** 2007, G-quadruplex induced stabilization by 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acids (2' F-ANA), *Nucleic Acids Research*, 35(15):4977-4988.
- Perea, W., Greenbaum, N. L.,** 2020, Label-free horizontal EMSA for analysis of protein-RNA interactions, *Analytical Biochemistry*, 599:113736.
- Pulipparacharuvil, S., Renthall, W., Hale, C. F., Taniguchi, M., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S. J., Sikder, D., Dewey, C. M., Davis, M. M., Greengard, P., Nairn, A. C., Nestler, E. J., Cowan, C. W.,** 2008, Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity, *Neuron*, 59(4):621-633.
- Qu, H., Csordas, A. T., Wang, J., Oh, S. S., Eisenstein, M. S., Soh, H. T.,** 2016, Rapid and label-free strategy to isolate aptamers for metal ions, *ACS nano*, 10(8):7558-7565.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rao, T., Ruiz-Gómez, G., Hill, T. A., Hoang, H. N., Fairlie, D. P., Mason, J. M.,** 2013, Truncated and helix-constrained peptides with high affinity and specificity for the cFos coiled-coil of AP-1, *PLoS One*, 8(3):e59415.
- Robison, A. J., Vialou, V., Mazei-Robison, M., Feng, J., Kourrich, S., Collins, M., Wee, S., Koob, G., Turecki, G., Neve, R., Thomas, M., Nestler, E. J.,** 2013, Behavioral and structural responses to chronic cocaine require a feedforward loop involving Δ FosB and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell. *Journal of Neuroscience*, 33(10):4295-4307.
- Roca, C., Avalos-Padilla, Y., Prieto-Simón, B., Iglesias, V., Ramírez, M., Imperial, S., Fernández-Busquets, X.,** 2022, Selection of an Aptamer against the Enzyme 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from *Plasmodium falciparum*, *Pharmaceutics*, 14(11):2515.
- Roxo, C., Kotkowiak, W., Pasternak, A.,** 2019, G-quadruplex-forming aptamers—characteristics, applications, and perspectives, *Molecules*, 24(20):3781.
- Saito, S.,** 2021, SELEX-based DNA aptamer selection: a perspective from the advancement of separation techniques, *Analytical Sciences*, 37(1):17-26.
- Sakamoto, T., Ennifar, E., Nakamura, Y.,** 2018, Thermodynamic study of aptamers binding to their target proteins, *Biochimie*, 145:91-97.
- Schägger, H.,** 2006, Tricine-sds-page, *Nature Protocols*, 1(1):16-22.
- Shirley, D. A., Sharma, I., Warren, C. A., Moonah, S.,** 2021, Drug repurposing of the alcohol abuse medication disulfiram as an anti-parasitic agent, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 165.
- Schoenbaum, G., Stalnaker, T. A., Shaham, Y.,** 2007, A role for BDNF in cocaine reward and relapse, *Nature Neuroscience*, 10(8):935-936.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., Erdmann, V. A., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M., Arndt, P. F., Glökler, J.,** 2011, Probing the SELEX process with next-generation sequencing, *PloS One*, 6(12):e29604.
- Schwoebel, F., van Eijk, L. T., Zboralski, D., Sell, S., Buchner, K., Maasch, C., Purschke, W., G., Humphrey, M., Zöllner, S., Eulberg, D., Morich, F., Pickkers, P., Klussmann, S.,** 2013, The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(12):2311-2315.
- Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'donoghue, M. B., Tan, W.,** 2010, Development of DNA aptamers using Cell-SELEX, *Nature Protocols*, 5(6):1169-1185.
- Seo, M., Lei, L., Egli, M.,** 2019, Label-Free Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Measuring Dissociation Constants of Protein-RNA Complexes, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 76(1):e70.
- Shatila, F., Yalçın, H. T., Özyurt, C., Evran, S., Çakır, B., Yaşa, İ., Nalbantsoy, A.,** 2020, Single-stranded DNA (ssDNA) Aptamer targeting SipA protein inhibits *Salmonella* Enteritidis invasion of intestinal epithelial cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 148:518-524.
- Shaulian, E., Karin, M.,** 2001, AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene*, 20(19):2390-2400.
- Silwal, A. P., Themakoon, S. K. S., Arya, S. P., Postema, R. M., Jahan, R., Phuoc, C. M. T., Tan, X.,** 2022, DNA aptamers inhibit SARS-CoV-2 spike-protein binding to hACE2 by an RBD-independent or dependent approach, *Theranostics*, 12(12):5522.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simov, V., Altman, M. D., Bianchi, E., DelRizzo, S., DiNunzio, E. N., Feng, G., Goldenblatt, P., Ingenito, R., Johnson, S. A., Mansueto, M. S., Mayhood, T., Mortison, J. D., Serebrov, V., Sondey, C., Sriraman, V., Tucker, T. J., Walji, A., Wan, H., Yue, Y., Stoeck, A., DiMauro, E. F.,** 2021, Discovery and characterization of novel peptide inhibitors of the NRF2/MAFG/DNA ternary complex for the treatment of cancer, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224:113686.
- Spiegel, J., Adhikari, S., Balasubramanian, S.,** 2020, The structure and function of DNA G-quadruplexes, *Trends in Chemistry*, 2(2):123-136.
- Stoltenburg, R., Nikolaus, N., Strehlitz, B.,** 2012, Capture-SELEX: selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B.,** 2007, SELEX—A (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular Engineering*, 24(4):381-403.
- Sullivan, R., Adams, M. C., Naik, R. R., Milam, V. T.,** 2019, Analyzing secondary structure patterns in DNA aptamers identified via CompELS, *Molecules*, 24(8):1572.
- Szalóki, N., Krieger, J. W., Komáromi, I., Tóth, K., Vámosi, G.,** 2015, Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling, *Molecular and Cellular Biology*, 35(21):3785-3798.
- Tang, C., Jiang, Y., Shao, W., Shi, W., Gao, X., Qin, W., Jiang, T., Wang, F., Feng, S.,** 2016, Abnormal expression of FOSB correlates with tumor progression and poor survival in patients with gastric cancer, *International Journal of Oncology*, 49(4):1489-1496.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Teague, C. D., Picone, J. A., Wright, W. J., Browne, C. J., Silva, G. M., Futamura, R., Minier-Toribio, A., Estill, M. E., Ramakrishnan, A., Martinez-Rivera, F. J., Godino, A., Parise, E. M., Schmidt, K. H., Pulido, N. V., Lorsch, Z. S., Kim, J. H., Shen, L., Neve, R. L., Dong, Y., Nestler, E. J., Hamilton, P. J.,** 2023, CREB binding at the Zfp189 promoter within medium spiny neuron subtypes differentially regulates behavioral and physiological adaptations over the course of cocaine use, *Biological Psychiatry*, 93(6):502-511.
- Thiel, W. H., Bair, T., Peek, A. S., Liu, X., Dassie, J., Stockdale, K. R., Behlke, M.A., Miller, F.J., Giangrande, P. H.,** 2012, Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection, *PloS One*, 7(9):e43836.
- Thiviyanathan, V., Gorenstein, D. G.,** 2012, Aptamers and the next generation of diagnostic reagents, *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 6(11-12):563-573.
- Tuerk, C., Gold, L.,** 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249(4968):505-510.
- Uchihashi, S., Fukumoto, H., Onoda, M., Hayakawa, H., Ikushiro, S. I., Sakaki, T.,** 2011, Metabolism of the c-Fos/activator protein-1 inhibitor T-5224 by multiple human UDP-glucuronosyltransferase isoforms, *Drug Metabolism and Disposition*, 39(5):803-813.
- Uemachi, H., Kasahara, Y., Tanaka, K., Okuda, T., Yoneda, Y., Obika, S.,** 2021, Hybrid-type SELEX for the selection of artificial nucleic acid aptamers exhibiting cell internalization activity, *Pharmaceutics*, 13(6):888.
- Ulery, P. G., Rudenko, G., Nestler, E. J.,** 2006, Regulation of Δ FosB stability by phosphorylation, *Journal of Neuroscience*, 26(19):5131-5142.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ul-Haq, A., Jin, M. L., Jeong, K. W., Kim, H. M., Chun, K. H., 2019.,** Isolation of MLL1 inhibitory RNA aptamers, *Biomolecules & Therapeutics*, 27(2):201.
- Valenzano, S., De Girolamo, A., DeRosa, M. C., McKeague, M., Schena, R., Catucci, L., Pascale, M., 2016,** Screening and identification of DNA aptamers to tyramine using in vitro selection and high-throughput sequencing, *ACS combinatorial science*, 18(6):302-313.
- Vialou, V., Robison, A. J., LaPlant, Q. C., Covington III, H. E., Dietz, D. M., Ohnishi, Y. N., Mouzon, E., Rush, A. J. 3rd, Watts, E. L., Wallace, D. L., Iñiguez, S. D., Ohnishi, Y. H., Steiner, M. A., Warren, B. L., Krishnan, V., Bolaños, C. A., Neve, R. L., Ghose, S., Berton, O., Tamminga, C. A., Nestler, E. J., 2010,** Δ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses, *Nature Neuroscience*, 13(6):745-752.
- Wagner, E. F., 2010,** Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun), *Annals of the rheumatic diseases*, 69(Suppl 1):i86-i88.
- Wallace, D. L., Vialou, V., Rios, L., Carle-Florence, T. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Graham, D. L., Green, T. A., Kirk, A., Iñiguez, S. D., Perrotti, L. I., Barrot, M., DiLeone, R. J., Nestler, E. J., Bolaños-Guzmán, C. A., 2008,** The influence of Δ FosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior, *Journal of Neuroscience*, 28(41):10272-10277.
- Walters, R. D., McSwiggen, D. T., Goodrich, J. A., Kugel, J. F., 2014,** Selection and characterization of a DNA aptamer that can discriminate between cJun/cJun and cJun/cFos, *PLoS One*, 9(6):e101015.
- Wang, M., Wang, Q., Li, X., Lu, L., Du, S., Zhang, H., 2020** Selection and identification of diethylstilbestrol-specific aptamers based on magnetic-bead SELEX, *Microchemical Journal*, 159:105354.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, X., Zhang, X. J., Li, Y., Zhang, G. R., Li, J., Wang, X. Q., Tan, W.,** 2022, Molecularly Engineered Aptamers Targeting Tumor Tissue and Cancer Cells for Efficient in Vivo Recognition and Enrichment, *CCS Chemistry*, 4(8):2581-2587.
- WHO,** "Opioid overdose", <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose>, (2021) (Erişim tarihi: 18 Nisan 2023).
- Wolter, O., Mayer, G.,** 2017, Aptamers as valuable molecular tools in neurosciences, *Journal of Neuroscience*, 37(10):2517-2523.
- Wu, J., Zhu, Y., Xue, F., Mei, Z., Yao, L., Wang, X., Zheng, L., Liu, J., Liu, G., Peng, C., Chen, W.,** 2014, Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring, *Microchimica Acta*, 181:479-491.
- Xiang, Q., Tan, G., Jiang, X., Wu, K., Tan, W., Tan, Y.,** 2017, Suppression of FOXM1 transcriptional activities via a single-stranded DNA aptamer generated by SELEX, *Scientific Reports*, 7(1):45377.
- Yang, L., Gao, T., Li, W., Luo, Y., Ullah, S., Fang, X., Cao, Y., Pei, R.,** 2020, Ni-Nitrilotriacetic acid affinity SELEX method for selection of DNA aptamers specific to the N-cadherin protein, *ACS Combinatorial Science*, 22(12):867-872.
- Yang, S., Li, H., Xu, L., Deng, Z., Han, W., Liu, Y., Jiang, W., Zu, Y.,** 2018, Oligonucleotide aptamer-mediated precision therapy of hematological malignancies, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 13:164-175.
- Yang, Y., Xu, J., Sun, Y., Mo, L., Liu, B., Pan, X., Liu, Z., Tan, W.,** 2021, Aptamer-based logic computing reaction on living cells to enable non-antibody immune checkpoint blockade therapy, *Journal of the American Chemical Society*, 143(22):8391-8401.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ye, N., Ding, Y., Wild, C., Shen, Q., Zhou, J.,** 2014, Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) miniperspective, *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(16):6930-6948.
- Yin, Z.,** 2019, Mechanism of small molecules inhibiting activator protein-1 DNA binding probed with induced fit docking and metadynamics simulations, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(12):5276-5280.
- Yu, F., Li, H., Sun, W., Xu, D., He, F.,** 2019, Rapid selection of aptamers based on protein microarray, *RSC Advances*, 9(17):9762-9768.
- Yu, H., Luo, Y., Alkhamis, O., Canoura, J., Yu, B., Xiao, Y.,** 2021, Isolation of natural DNA aptamers for challenging small-molecule targets, cannabinoids, *Analytical Chemistry*, 93(6):3172-3180.
- Zachariou, V., Bolanos, C. A., Selley, D. E., Theobald, D., Cassidy, M. P., Kelz, M. B., Shaw-Lutchman, T., Berton, O., Sim-Selley, L. J., Dileone, R. J., Kumar, A., Nestler, E. J.,** 2006, An essential role for Δ FosB in the nucleus accumbens in morphine action, *Nature Neuroscience*, 9(2):205-211.
- Zboralski, D., Hoehlig, K., Eulberg, D., Frömmling, A., Vater, A.,** 2017, Increasing tumor-infiltrating T cells through inhibition of CXCL12 with NOX-A12 synergizes with PD-1 blockade, *Cancer Immunology Research*, 5(11):950-956.
- Zhao, Q., Zhang, K., Li, Y., Ren, Y., Shi, J., Gu, Y., Qiu, S., Liu, S., Cheng, Y., Qiao, Y., Liu, Y.,** 2021, OLFML2A is necessary for anti-triple negative breast cancer effect of selective activator protein-1 inhibitor T-5224, *Translational Oncology*, 14(8):101100.
- Zhao, Y., Gao, B., Chen, Y., Liu, J.,** 2023, An aptamer array for discriminating tetracycline antibiotics based on binding-enhanced intrinsic fluorescence, *Analyst*, 148:1507-1513.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zheng, W., Liu, X., Li, Q., Shu, Z., Li, Z., Zhang, L.,** 2022, A simple electrochemical aptasensor for saxitoxin detection, *RSC Advances*, 12(37):23801-23807.
- Zhou, G., Wilson, G., Hebbard, L., Duan, W., Liddle, C., George, J., Qiao, L.,** 2016, Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy, *Oncotarget*, 7(12):13446.
- Ziganshina, A. Y., Mansurova, E. E., Voloshina, A. D., Lyubina, A. P., Amerhanova, S. K., Shulaeva, M. M., Nizameev, I. R., Kadirov, M. K., Bakhtiozina, L. R., Semenov, V. E., Antipin, I. S.,** 2023, Thymine-Modified Nanocarrier for Doxorubicin Delivery in Glioblastoma Cells, *Molecules*, 28(2):551.
- Zou, X., Wu, J., Gu, J., Shen, L., Mao, L.,** 2019, Application of aptamers in virus detection and antiviral therapy, *Frontiers in Microbiology*, 10:1462.
- Zuker, M.,** 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Research*, 31(13):3406-3415.

TEŞEKKÜR

Hem lisans ve hem de lisansüstü eğitim hayatım boyunca deneyimlerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Serap EVRAN'a;

Bu süreçte değerli tecrübelerini ve görüşlerini benimle paylaşarak katkıda bulunan Doktora Tez İzleme Komitesi Üyeleri sayın Prof. Dr. Suna TİMUR ve sayın Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya;

TÜBİTAK projesi kapsamında ortak çalışma yapma fırsatı bulduğum sayın Prof. Dr. Cenk SELÇUKİ ve doktora öğrencisi Fulya Çağlar'a;

Zorlaşan laboratuvar şartlarında da bu süreci benimle paylaşan ve destekleriyle hep yanımda olan başta sayın Dr. Öğr. Üyesi Canan ÖZYURT, sayın Araş. Gör. Dr. Umut MENGÜLLÜOĞLU, Ezgi MAN ve bütün çalışma arkadaşlarıma;

Hücre kültürü çalışmalarında tecrübelerini benimle paylaşan ve laboratuvar olanaklarını tezim için zorlayarak katkı sağlayan sayın Dr. Öğr. Üyesi Caner GEYİK ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK'e;

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndaki bütün mesai arkadaşlarıma;

Her durumda yanımda olan, hayatımın hiçbir evresinde desteklerini esirgemeyen annem Rukiye UĞURLU, babam Halis UĞURLU ve ablam Özlem UĞURLU'ya;

Hayatımdaki en değerli insanların başında gelen en yakın dostum Mehmet ALTUNDAĞ'a yanımda olduğu ve her zaman destek verdiği için;

ITC ölçümleri için Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (EGE-MATAL);

Bu tez kapsamında finansal destek sağlayan Türkiye Cumhuriyeti, Kalkınma Bakanlığı'na (Proje Hibe No: 2016K121190) ve TÜBİTAK'a (TÜBİTAK 119Z878 no.lu proje)

SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

ÖZGEÇMİŞ**ÖZGE UĞURLU****Öğrenim Bilgisi****Doktora 2016-2023**

EGE ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyokimya (DR)

Tez adı: Madde bağımlılığında rol oynayan Fos ailesi transkripsiyon faktörlerinin DNA aptamerleri ile hedeflenmesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap EVRAN

Yüksek Lisans 2013-2016

EGE ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyokimya (YL) (TEZLİ)

Tez adı: Bazı YopM-protein etkileşimlerinin floresans protein komplementasyon stratejisi ile incelenmesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap EVRAN

Lisans 2008-2013

EGE ÜNİVERSİTESİ Fen Fakültesi/Biyokimya Bölümü/Biyokimya Pr.

Önlisans 2016-2018

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ Açıköğretim Fakültesi/Otel, Lokanta ve İkram Hizmetleri Bölümü/Aşçılık Pr. (AÇIKÖĞRETİM)

Akademik Görevler**Öğretim Görevlisi (2020- Devam Ediyor)**

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ/Hatay Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu/Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü/Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Pr.)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. *Yersinia* dış protein M (YopM) ve DEAD-kutu helikaz 3 (DDX3) proteinleri arasındaki etkileşimin inhibisyonu için DNA aptamerinin geliştirilmesi, Yürütücü: EVRAN SERAP, Araştırmacı: UĞURLU ÖZGE, TÜBİTAK 1002-A, 15/04/2023- devam ediyor (ULUSAL)
2. Madde Bağımlılığı Biyosensör Laboratuvarları, Kalkınma Bakanlığı, Yürütücü: TİMUR SUNA, Yürütücü: COSKUNOL HAKAN, Araştırmacı: EVRAN SERAP, Yardımcı Personel: UĞURLU ÖZGE, 01/07/2016 - 27/01/2020 (ULUSAL)
3. Kuantum Dot-Plazmid DNA Konjugatının YopM Proteini ile Fonksiyonelleştirilmesi Yoluyla Gen Transfeksiyon Etkinliğinin Arttırılması, TÜBİTAK 1001, Yürütücü: EVRAN SERAP, Bursiyer: UĞURLU ÖZGE, 01/11/2013 - 01/11/2015 (ULUSAL)
4. Arginin, Lizin ve Histidine Spesifik Bir Floresans Protein Sensörünün Tasarlanması, Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Danışman: EVRAN SERAP, Yürütücü: UĞURLU ÖZGE, 01/10/2012 - 24/06/2013 (ULUSAL)

Eserler:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. UGURLU ÖZGE, EVRAN SERAP (2021). Bimolecular fluorescence complementation assay to explore protein-protein interactions of the *Yersinia* virulence factor YopM. Biochemical and Biophysical Research Communications, 582, Doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.039.
2. SANLI SERDAR, MOULAHOU M HICHEM, UGURLU ÖZGE, GHORBANIZAMANI FAEZEH, GÜMÜS ZINAR PINAR, EVRAN SERAP, COSKUNOL HAKAN, TIMUR SUNA (2020). Screen printed electrode-based biosensor functionalized with magnetic cobalt/single-chain antibody fragments for cocaine biosensing in different matrices. Talanta, 217, 121111.
3. UGURLU ÖZGE, BARLAS FIRAT BARIS, EVRAN SERAP, TIMUR SUNA (2020). The cell-penetrating YopM protein-functionalized quantum

dot-plasmid DNA conjugate as a novel gene delivery vector. PLASMID, 110, Doi: 10.1016/j.plasmid.2020.102513.

4. BOR GULSAH, MAN EZGİ, UGURLU ÖZGE, CEYLAN AYSE ELCİN, BALABAN SİMGE, DURMUS CEREN, PİNAR GUMUS Z, EVRAN SERAP, TIMUR SUNA (2020). *In vitro* Selection of Aptamer for Imidacloprid Recognition as Model Analyte and Construction of a Water Analysis Platform. ELECTROANALYSIS, 32(9), 1922-1929.

Yazılan uluslararası kitaplardaki bölümler:

1. Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives, Bölüm adı:(Nucleic Acid and Peptide Aptamers as Potential Antiviral Drugs) (2021)., EVRAN SERAP, UGURLU ÖZGE, MAN EZGI, GÜLTAN MERVE, ÖZYURT CANAN, Bentham Science Publishers, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 45, ISBN:978-981-4998-10-9.
2. Applications of NMR Spectroscopy, Bölüm adı:(NMR Spectroscopy for Probing the Structural Determinants of Aptamer Optimization and Riboswitch Engineering) (2020)., BORA BURHAN, UGURLU ÖZGE, MAN EZGI, GÜLTAN MERVE, ÖZYURT CANAN, EVRAN SERAP, Bentham Science Publishers, Editör:Rahman, Attatur, Choudhary, M. Iqbal, Basım sayısı:1, ISBN:978-981-14-3383-2.
3. Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery, Bölüm adı:(Nucleic Acid Aptamers Against Virulence Factors of Drug Resistant Pathogens) (2018)., ÖZYURT CANAN, UGURLU ÖZGE, BORA BURHAN, EVRAN SERAP, Bentham Baltzer Science Publishers, Basım sayısı:1, ISBN:978-1-68108-563-0.
4. Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs, Bölüm adı:(Cell-penetrating peptides in nanodelivery of nucleic acids and drugs) (2018)., ÖZYURT CANAN, UGURLU ÖZGE, EVRAN SERAP, Elsevier, Editör:Grumezescu Alexandru Mihai, Basım sayısı:1, ISBN:978-0-12-813665-2.
5. Nanostructures for Drug Delivery, Bölüm adı:(Pathogen-specific nucleic acid aptamers as targeting components of antibiotic and gene delivery systems) (2017)., ÖZYURT CANAN, BORA BURHAN, UGURLU ÖZGE, EVRAN SERAP, Elsevier, Editör:Andronescu

Ecaterina, Grumezescu Alexandru Mihai, Basım sayısı:1, ISBN:978-0-323-46143-6.

Uluslararası/Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. ÖZGE UĞURLU, FULYA ÇAĞLAR, SEDA YÜZEREN, SERAP EVRAN, CENK SELÇUKİ (2023). In vitro tests to characterize the inhibitory effect of DNA aptamer on Fos:Jun interaction. 47th FEBS CONGRESS (Özet Bildiri/Poster Sunumu).
2. UĞURLU ÖZGE, EVRAN SERAP (2022). Development and Characterization of FosB Transcription Factor-Specific DNA Aptamers. 4th EURASIA BIOCHEMICAL APPROACHES & TECHNOLOGIES (EBAT) CONGRESS (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
3. UĞURLU ÖZGE (2022). Nükleik Asit Aptamerlerin Geliştirilmesi ve Terapötik Uygulamalarda Kullanımı. 4. International Young Researchers Student Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
4. ÖZGE UĞURLU, SERAP EVRAN (2017). Monitoring Some YopM-Protein Interactions Using Fluorescence Complementation Assay. International Biochemical Congress/28th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster Sunum).
5. O. UGURLU, S. EVRAN, L. E. DOGAN (2015). Functionalization of quantum dot-plasmid dna conjugate with a cell-penetrating protein. 40 th FEBS Congress (Özet Bildiri/Poster Sunum).

Sertifika:

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HADYEK tarafından verilen A kategorisi sertifikası) Veteriner Fakültesi, Tayfur Sökmen Kampüsü, Antakya/Hatay, 23.05.2022-03.06-2022 (Ulusal)

Eğitim Sertifikası, Microcal PEAQ-ITC Cihaz Eğitimi, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Arş Merkezi, 35100, Ege Üniversitesi Kampüsü, Bornova/İZMİR, Sertifika, 20.03.2018 -21.03.2018 (Ulusal)