



**REKOMBİNANT MOLEKÜLLERLE İNSAN
HEMOGLOBİNLERİNİN TANIMLANMASI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Aylin KÖSELER

**Kasım 2009
DENİZLİ**

**REKOMBİNANT MOLEKÜLLERLE İNSAN
HEMOGLOBİNLERİNİN TANIMLANMASI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi
Biyofizik Anabilim Dalı**

Aylin KÖSELER

Danışman: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2008SBE004 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Kasım 2009
DENİZLİ**

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Aylin KÖSELER tarafından, Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY yönetiminde hazırlanan “**Rekombinant Moleküllerle İnsan Hemoglobinlerinin Tanımlanması Üzerine Çalışmalar**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY
Jüri Başkanı(Danışman)



Prof. Dr. Kıymet AKSOY
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Günfer TURGUT
Jüri Üyesi

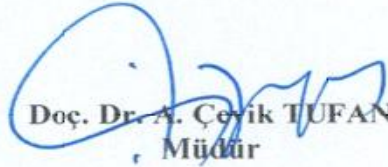


Doç. Dr. Dinçer BİLGİN
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.11.09 tarih ve 09/18-6 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Cevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenciliğim süresince, öğrenim ve eğitimimdeki destekleri için tez danışmanım Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY ve Anabilim dalımız öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY' a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında katkısı olan tüm çalışma arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Tez çalışması için gerekli olan maddi kaynağı 2008SBE004 numaralı proje ile sağlayan "Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (PAÜBAP)'ne" de teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmasının yapılması ve bulguların analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza
Öğrenci Adı Soyadı

: 
: Aylin KÖSELER

ÖZET

REKOMBİNANT MOLEKÜLLERLE İNSAN HEMOGLOBİNLERİNİN TANIMLANMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Köseler, Aylin
Doktora Tezi, Biyofizik ABD
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Kasım 2009, 101 sayfa

Biyosensörler; genel anlamda, algılayıcı ve sinyal dönüştürücü olmak üzere iki farklı bileşenden oluşmaktadır. *Display* yöntemleri ile elde edilen Peptid ve protein algılayıcılar çeşitli biyosensör uygulamalarında, molekül algılayıcı bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu molekül algılayıcıların hedeflerine olan ilginlikleri molekül konformasyon uyumuna dayanmaktadır. Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değişiklikler proteinin yapı ve işlevine yansımaktadır. Elektroforetik ve kromatografik yöntemlerle anormal hemoglobinlerin davranış değişikliği, DNA dizi analizi ile değişikliğe neden olan genetik özellik saptanıp anormal hemoglobin kimliklendirilmesi popülasyon ve premarital taramalarda zaman almaktadır.

Protein hedeflerin algılanmasında Peptid yapısındaki molekül algılayıcıların geliştirilmesi gelişen bir çalışma alanıdır. Bir seçim tekniği olan phage display, antikorlar, enzimler ve hücre yüzey reseptörleri gibi birçok molekül konformasyonel etkileşim ile tanıyabilecek Peptid ligandlarının ekspresyonu esasına dayanmaktadır. Hedef moleküle yüksek ilginlik gösteren Peptidler bu yöntemle tanımlanmaktadır. Hemoglobin modelinde elde edilebilecek algılayıcı rekombinant moleküllerin (Peptid ve scFv formatında), hedef molekülün özgün olarak tanınması, epitop haritalanması, protein-protein ilişkilerinin tanımlanması ile molekül tanıma kullanılması mümkün olacaktır.

Tez çalışmasında; 12-mer lineer ve 7-mer siklik yapay peptid kütüphaneleri kullanılarak HbA₂ ve HbS molekülünü algılayan peptidler elde edilmiş ve peptid hedef molekül etkileşimleri irdelenmiştir. Çalışmalarda elde edilen verilere göre peptid içeriklerindeki hidrofobisiteye bağlı biçimde değişikliklerin ve hedef molekülün sürekli biçimde sabit konformasyonda tutulmasının gerekliliği saptanmıştır. Bu şekilde geliştirilecek yeni peptidlerin hedeflerini daha iyi algılayabilme özelliklerinin incelenebileceği öngörülmektedir. Bu bağlamdaki çalışmalarda AFM, SPR gibi yaklaşımların kullanılması, Peptid hedef molekül arasındaki bağlanma kinetikleri, bağlanma ve ayrılmada rol oynayan gerilme kuvvetleri gibi biyofiziksel özellikler ile desteklenmesi önem taşımaktadır. Bu şekilde geliştirilmiş ve biyofiziksel özellikleri iyi tanımlanmış peptidlerin molekül algılamaya ve benzeri nanoteknolojik çalışmalara değerli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hemoglobin, Phage display, Biyoteknoloji, Peptid-protein etkileşimleri

ABSTRACT**STUDIES FOR THE DIAGNOSIS OF HUMAN HEMOGLOBINS WITH RECOMBINANT MOLECULES**

Köseler, Aylin
PhD. Thesis in Biophysics
Supervisor: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

November 2009, 101 pages

Biosensors have two different components identified as molecular recognition and signal transduction elements. Peptide and protein molecules developed by display techniques are being used as molecular recognition components. Affinities of such selected molecules depend on conformational interactions with their targets. Globin chain differences at genetic level affect the structure and function of the hemoglobin molecules. Abnormal hemoglobins present different electrophoretic and chromatographic behaviors. These genetic differences can be identified with DNA sequencing methods. These molecular methods pose some difficulties in the molecular diagnosis of abnormal hemoglobins also with cost ineffective problems in premarital and prenatal diagnostic approaches.

Peptide based molecular recognition is a developing area in biomedical research. Display techniques including phage and peptide libraries depend on the selection of recognizing molecules for their targets. This selection process can be used for the targets as antibodies, enzymes and cell surface receptors. Specific recognizing molecules as peptides can be used in epitope mapping, protein-protein interactions and molecular diagnosis in the model of abnormal hemoglobins.

In this thesis study, HbS and HbA₂ molecules were used as protein targets. Peptides recognizing these hemoglobins were selected from 12-mer linear and 7-mer cyclic peptide libraries and their interactions were investigated. According to the obtained results, hydrophobicity of the peptide molecules and fixed conformation of the target molecules were determined as major problems. Depending on our results, AFM and SPR approaches should be used for future studies to be able to understand biophysical characteristics as peptide-target binding kinetics, stretching forces in details. Such peptide molecules could be used in molecular recognition research and nano-technological approaches.

Keywords: Hemoglobin, Phage display, Biotechnology, Peptide protein interactions

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İçindekiler	v
Şekiller Dizini	vi
Tablolar Dizini	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Hemoglobinin yapısı ve İşlevi	6
2.2. Hemoglobin Türleri	9
2.3. Talasemiler ve Anormal Hemoglobinler	12
2.4. Talasemi ve Anormal Hemoglobinlerin tanımlanması	15
2.4.1. İyon değiştirici kromatografi	15
2.4.2. Hemoglobin elektroforezi	16
2.4.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	16
2.4.4. Restriksiyon enzim analizi	17
2.4.5. DNA Mikroarray Yöntemi	18
2.4.6. SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>) Spektroskopisi	19
2.5. Rekombinant antikolar ve Display yöntemleri	21
2.5.1. scFv yöntemi	23
2.5.2. Yapay Peptid kütüphaneleri	24
2.5.3. Display yönteminde kullanılan vektörler	25
2.5.4. Biopanning işlemi	27
2.5.5. Faj Eliza	28
3. MATERYAL ve METOD.....	29
3.1 Yapay Peptid Kütüphaneleri	29
3.2 Biopanning işlemi	29
3.3 Faj titrasyonu	31
3.4 Faj çoğaltımı	33
3.5 Faj klonlarının çoğaltımı	34
3.6 Faj eliza	35
3.7 Faj DNA izolasyonu	36
3.8 Kullanılan çözeltiler	36
3.9 DNA dizi analizi	39
3.10. Peptid içeriğinin belirlenmesi	40
3.11. Aminoasit özelliklerinin belirlenmesi	42
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA	74
5.1. HbA ₂ Molekülüne Yönelik Faj Eliza Sonuçlarının Değerlendirilmesi	77
5.2. HbS Molekülüne Yönelik Faj Eliza Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	79
5.3. Peptid dizilerinin karşılaştırılması ve konformasyonel uyum.....	82
5.4. Display yöntemlerinde BSA problemi	85
6. SONUÇ	88
7. KAYNAKÇA	93
8. ÖZGEÇMİŞ.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hemoglobin molekülünün tetramerik yapısı	3
Şekil 2.2 Beta globin alt biriminin üç boyutlu yapısı ve adlandırılması	4
Şekil 2.3 Hem düzlemi	5
Şekil 2.4 Beta ve alfa alt birimleri değme noktaları	5
Şekil 2.5 Hemoglobin molekülünün T ve R formu düzlemi	6
Şekil 2.6 Oksi ve deoksi formunda demir atomunun hem düzlemi içinde hareketi	7
Şekil 2.7 İnsan globin genleri üretim dönemleri	9
Şekil 2.8 İnsan globin genleri	10
Şekil 2.9 Delta ve beta globin alt birimlerinin amino asit	11
Şekil 2.10 Hb J- İran alkali ve asit elektroforezi	16
Şekil 2.11 Hb D Los Angeles ve Hb Beograd DNA dizi analizi	17
Şekil 2.12 scFv yöntemi	23
Şekil 2.13 Yapay peptid kütüphanesi	24
Şekil 2.14 Fajın yapısı	25
Şekil 2.15 Fajın yaşam döngüsü	26
Şekil 2.16 Biopanning işlemi	27
Şekil 2.17 Faj Eliza yöntemi	28
Şekil 3.1 Faj stoğunun seri dilüsyonu	31
Şekil 3.2 Dilüsyon sonrası fajların ER2738 (E.coli) ile inkübasyonu	32
Şekil 3.3 LB/IPTG/Xgal içeren petride gece boyu inkübasyon	32
Şekil 3.4 Faj genomundaki peptid dizisinin PAM900 geri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması	40
Şekil 3.5 12- mer lineer peptid dizisi belirlenmiş bir faj klonu	40
Şekil 3.6 12- mer lineer peptid dizisinin başlangıç noktası	41
Şekil 3.7 7- mer siklik peptid dizisinin başlangıç noktası.....	41
Şekil 3.8 Aminoasitlerin fizikokimyasal özellikleri	42
Şekil 4.1 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü biopanning işlemi	45
Şekil 4.2 Faj genomundaki peptid dizisinin PAM900 geri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması	46
Şekil 4.3 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü dördüncü biopanning işlemi.....	51
Şekil 4.4 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü altıncı biopanning işlemi.....	55
Şekil 4.5 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü on biopanning işlemi.....	59
Şekil 4.6 Faj genomundaki peptid dizisinin Fas-BYF01 geri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması	64
Şekil 4.7 Birinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	67
Şekil 4.8 İkinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	67
Şekil 4.9 Üçüncü, dördüncü ve altıncı grup faj klonlarına ait aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	67
Şekil 4.10 Beşinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	68

Şekil 4.11 Yedinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	68
Şekil 4.12 Sekizinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	68
Şekil 4.13 Tüm gruplara ait faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	69
Şekil 4.14 Tek olarak elde edilen faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	69
Şekil 4.15 Faj klonlarının aminoasit frekansındaki değişim	70
Şekil 4.16 Faj klonlarında yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	71
Şekil 4.17 BS1409 ve BS1410 klonlarında yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerleri	71
Şekil 4.18 Aminoasitlerin frekansları	72
Şekil 5.1 Faj Eliza sonuçları	77
Şekil 5.2 Faj Eliza sonuçları	78
Şekil 5.3 Faj Eliza sonuçları	80
Şekil 5.4 Faj Eliza sonuçları	81
Şekil 5.5 Faj Eliza sonuçları	81
Şekil 5.6 Faj Eliza sonuçları	82
Şekil 5.7 LLADTTHHRPWT peptidin yapısı ve karbon nanotüp yüzeyine adsorpsiyonu	84
Şekil 5.8 Faj Eliza sonuçları (Birinci gün)	86
Şekil 5.9 Faj Eliza sonuçları (İkinci gün)	87
Şekil 5.10 Faj Eliza sonuçları (Üçüncü gün)	87
Şekil 6.1 Tetramerik proteinin (Hemoglobin) yüzey ile olan farklı etkileşimi	91
Şekil 6.2 Proteinin yüzeye adsorpsiyonu	91

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri	13
Tablo 2.2 Türkiye’de 2002’den sonra saptanan anormal hemoglobin türleri	13
Tablo 2.3 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler	14
Tablo 3.1 DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler ve özellikleri	39
Tablo 3.2 DNA dizi analizi reaksiyon karşımı ve uygulama biçimi	39
Tablo 3.3 Aminoasitlerin hidrofobisite değerleri ve yan zincir lineer yapıları	43
Tablo 4.1 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları	44
Tablo 4.2 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları	47
Tablo 4.3 Faj Klonlarına ait peptid dizileri	48
Tablo 4.4 Faj eliza sonuçları	49
Tablo 4.5 Faj eliza sonuçları	49
Tablo 4.6 Faj eliza sonuçları	49
Tablo 4.7 12-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları	50
Tablo 4.8 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları	52
Tablo 4.9 Faj Klonlarına ait peptid dizileri	53
Tablo 4.10 Dördüncü biopanning sonrası 20 faj klonuna ait eliza sonuçları	54
Tablo 4.11 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları	56
Tablo 4.12 Faj Klonlarına ait peptid dizileri	56
Tablo 4.13 Altıncı biopanning sonrası 20 faj klonuna ait eliza sonuçları	57
Tablo 4.14 7-mer lineer kütüphane ile HbA ₂ molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları	58
Tablo 4.15 Dördüncü biopanning sonrası faj eliza sonuçları	60
Tablo 4.16 Sekizinci biopanning sonrası faj eliza sonuçları	61
Tablo 4.17 Dokuzuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları	62
Tablo 4.18 Dokuzuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları	63
Tablo 4.19 Onuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları	64
Tablo 4. 20 Faj Klonlarına ait peptid dizileri	65
Tablo 4. 21 12-mer lineer peptid dizilerine ait aminoasitlerin sırası ve hidrofobisite değerleri	66
Tablo 4. 22 7-mer siklik peptid dizilerine ait aminoasitlerin sırası ve hidrofobisite değerleri	70

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARMS:	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
AFM:	Atomic Force Microscopy
BSA:	Sığır serum albumin
CVS:	Koryonik Villüs Örneklemesi
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DPG:	2,3-Difosfogliserat
DTCS:	Dye Terminator Cycle Sequencing
E.Coli:	Escherichia coli
ELİZA:	Enzim İlişkili İmmün Test
EDTA:	Etilendiamin tetraasetikasit
Hb:	Hemoglobin
HPLC:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
IVS:	Intervening Sequence
IPTG:	izopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozid
mRNA:	Haberci Ribonükleik asit
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG:	Polietilen glikol
RFLP:	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
scFv:	Tek zincir değişken fragmentleri
SPR:	Surface Plasmon Resonance
TBS:	Tris Tamponlu Tuz
Xgal:	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid

1.GİRİŞ

Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değişiklikler proteinin yapı ve işlevine yansımaktadır (Schrier 1994). Globin genlerinin okunan bölgelerindeki (ekson dizileri) mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkan aminoasit değişiklikleri anormal hemoglobinleri oluşturmaktadır. Anormal hemoglobinler içerisinde, orak hücre anemisine özgü HbS gibi sağlık sorununa neden olanlar olduğu gibi herhangi bir klinik sorunu ortaya koymayan hemoglobin türleri de gelişebilmektedir. Diğer taraftan globin genlerindeki mutasyonlar nedeni ile globin zincirlerinin hiç üretilmemesi veya olması gerekenden az üretilmesi sonucunda yaygın olarak rastlanan ve kalıtsal bir hastalık olan talasemiler oluşmaktadır (Itano 1956, Forget 1975). Beta-globin zincirinin anormal üretimi sonucu oluşan beta-talasemiler, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye’de görülen en yaygın kalıtsal bozukluklardan bir tanesidir (Schroeder 1963). Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobinler ve beta taleemiler, uygulanan premarital kontrol programı çerçevesinde ayrıntılı bir biçimde tanımlanmaktadır (Atalay 2005). Yapılan bu premarital kontrol programında, birçok anormal hemoglobin belirlenmiş olup özellikle premarital tanıda bu hemoglobinlerin hızlı tanısında karmaşık yöntemlere gereksinim duyulduğu gösterilmiştir. (Bahadır 2009, Köseler 2009).

Moleküler tanılamaya yönelik hızlı biçimde artan ve geliştirilen yöntemler birçok hastalığı gen düzeyinde anlaşılır kılmış, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA düzeyinde yapılabile hale gelmiştir. Bu gelişmeler hemoglobinopatilerin moleküler işlevlerinin ve ilişkili mutasyonlarının anlaşılmasında önem kazanmıştır. Elde edilen bilgiler ile protein ve DNA analizinde yeni tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Gelişen yeni tanı yöntemleri ile hastalıkla ilişkili protein ve DNA analizinde daha basit, kolay, tekrarlanabilen, tek aşamalı, radyoaktivite gerektirmeyen, ekonomik ve tanı laboratuvarı ortamında da uygulanabilen yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemler arasında; talasemilerin bilinen mutasyonların tespitinde kullanılan ARMS, Dot Blot, RFLP ve bilinmeyen mutasyonların tespitinde kullanılan DNA dizi analizi yöntemi sayılabilir. Anormal hemoglobinlerin protein düzeyinde tanımlamasında ise öncelikle elektroforetik yöntemler uygulanmaktadır. Elektroforetik davranışları benzer özellik gösteren anormal hemoglobinlerin ayırıcı tanısı için ise DNA dizi analizi yönteminin uygulanması gereklidir (Bahadır 2009).

Hemoglobinopati kontrol programlarında, beta talasemilerin premarital tanımlanmasında önem taşıyan HbA₂ düzeyi ile orak hücre anemisine yol açan HbS'in ayırıcı tanısı belirgin bir önem taşımaktadır (Spritz 1983, Weatherall 2000). HbS'in ön tanısı elektroforetik olarak yapılırken beta talasemide ön tanı HbA₂ düzeyi ölçülerek uygulanmaktadır. Olası prenatal tanıda kullanılmak üzere ilişkili mutasyonların saptanmasında ise çeşitli PCR tabanlı yöntemlere başvurulmaktadır. Hemoglobinopati kontrol programlarında uygulanan yöntemlerin hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir olmaları özellikle bu hastalıkların yaygın olarak görüldüğü toplum ve yörelerde önem kazanmaktadır.

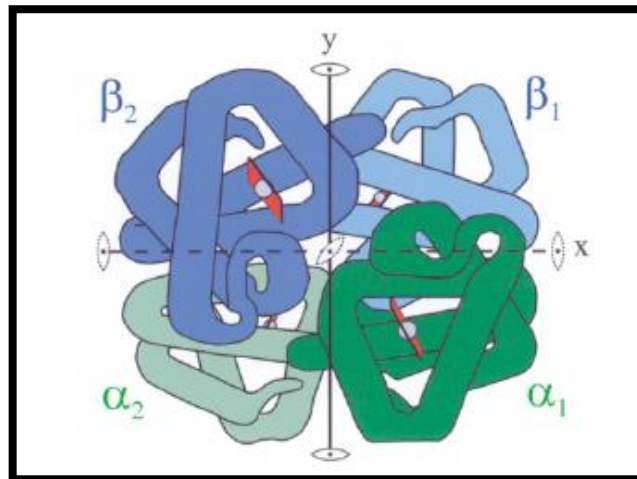
Gelişen gen mühendisliği teknikleri ile oluşturulan rekombinant antikorların ya da rekombinant algılayıcıların kullanımı protein hedeflerinin tanımlanmasında önem kazanmaktadır. Rekombinant antikorların geliştirilmesinde ise güncel bir yaklaşım olan *display* teknolojileri özel bir yer tutmaktadır (Fan 2007, Sheedy 2007). *Display* teknolojileri kendi içerisinde scFv (*single chain of variable fragments*) ve yapay peptid kütüphanelerine dayalı iki temel yaklaşımı içermektedir. *Display* teknikleri ile elde edilen peptid ve protein algılayıcılar çeşitli uygulamalarında, molekül algılayıcı bileşen olarak kullanılmaktadır (Lowman 1997). Bu molekül algılayıcıların hedeflerine olan ilginlikleri molekül konformasyon uyumuna dayanmaktadır. *Display* teknolojilerinin uygulama alanları, temelde molekül yaklaşımların uygulandığı tüm alanları içermektedir. Örneğin; tanı, tedavi ve yapısal ayrımların gözlemlenmesine ek olarak bir sınıflama yapılırsa, peptid, hormon, agonist, antagonist, antikor, enzim ve aşı geliştirilmesi kullanıldığı alanlar olarak yer almaktadır (Baines 2006, Clément 2003).

Bu tez çalışmasında, beta talasemi ve HbS'in ayırıcı tanısında uygulanan protein veya DNA yöntemlerinden farklı olarak rekombinant yapay peptidlerin kullanılması amaçlanmıştır. Çalışmada rekombinant algılayıcı peptidlerin elde edilmesinde yapay peptid kütüphanelerin kullanımı hedeflenmiştir. Yapay peptid kütüphanelerinden elde edilecek verilerin, molekül algılamada yer alabilecek peptid dizilerinin belirlenerek bu alanda katkı oluşturulması öngörülmektedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

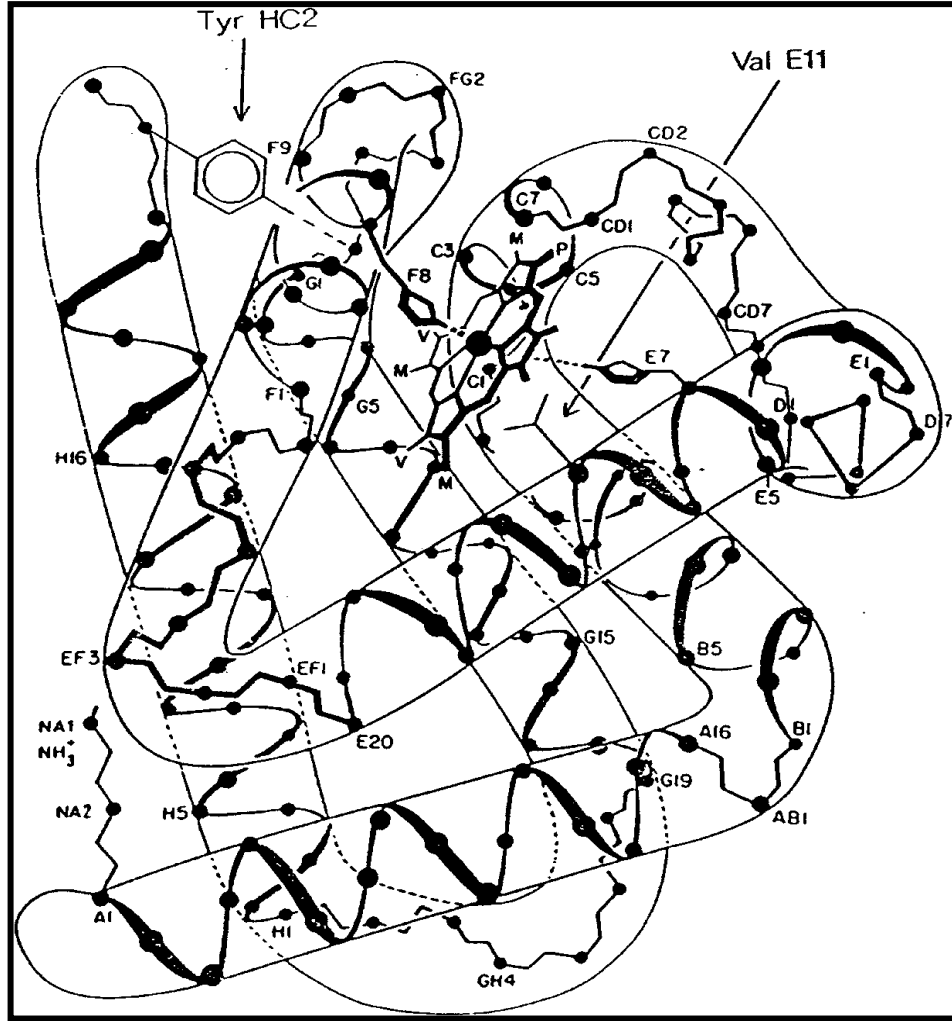
2.1 Hemoglobin Yapısı ve İşlevi

Dolaşımdaki oksijenin taşınmasından sorumlu olan hemoglobin molekülünün yapısı, 1959 yılında Perutz ve ark. tarafından at hemoglobinin X-ışını kristallografisi yöntemi ile incelenmesi sonucunda keşfedilmiştir (Perutz 1960). Hemoglobin molekülü, hem grupları içeren, zayıf kovalent olmayan bağlar ile birbirine bağlı dört polipeptid zincirinden oluşmuş tetramerik bir proteindir (Şekil 2.1).



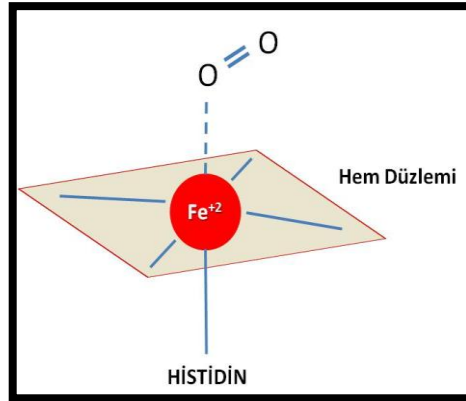
Şekil 2.1 Hemoglobin molekülü tetramerik yapısı (Henry 2002)

Globin adı verilen bu alt birimler iki tane özdeş alfa ((α veya ζ) ve iki tane beta (ϵ , γ , δ veya β) türü olarak tanımlanır (Ackers 2006). Bu alt ünitelerin üç boyutlu yapılanması non-kovalent bağlar, hidrojen bağları, tuz köprüleri ve non-polar etkiler ile sağlanmaktadır. Polipeptid yapıyı oluşturan polar aminoasit yan grupları dış yüzeyde, non-polar yan gruplar ise iç yüzeyde yer almaktadır. Bu oluşum üçüncül yapıyı belirlemektedir (Perutz 1970, Antonini 1970). Farklı aminoasit içeriğine rağmen her bir α ve β globin zincirinin benzer üç boyutlu yapısında rol oynayan α - heliks oluşumlar ortaktır. α ve β globin zincirinde yer alan heliksler evrensel olarak amino ucundan karboksil ucuna kadar isimlendirilmiştir (Şekil 2.2). Buna göre β - globin molekülünde sekiz helikal bölge A'dan H'ye kadar, heliks içermeyen bölgeler ise AB, CD, EF, GH olarak adlandırılmaktadır. Buna karşın α - globin molekülü D heliks bölgesini içermemektedir (Lukin 2004, Wajcman 2009).



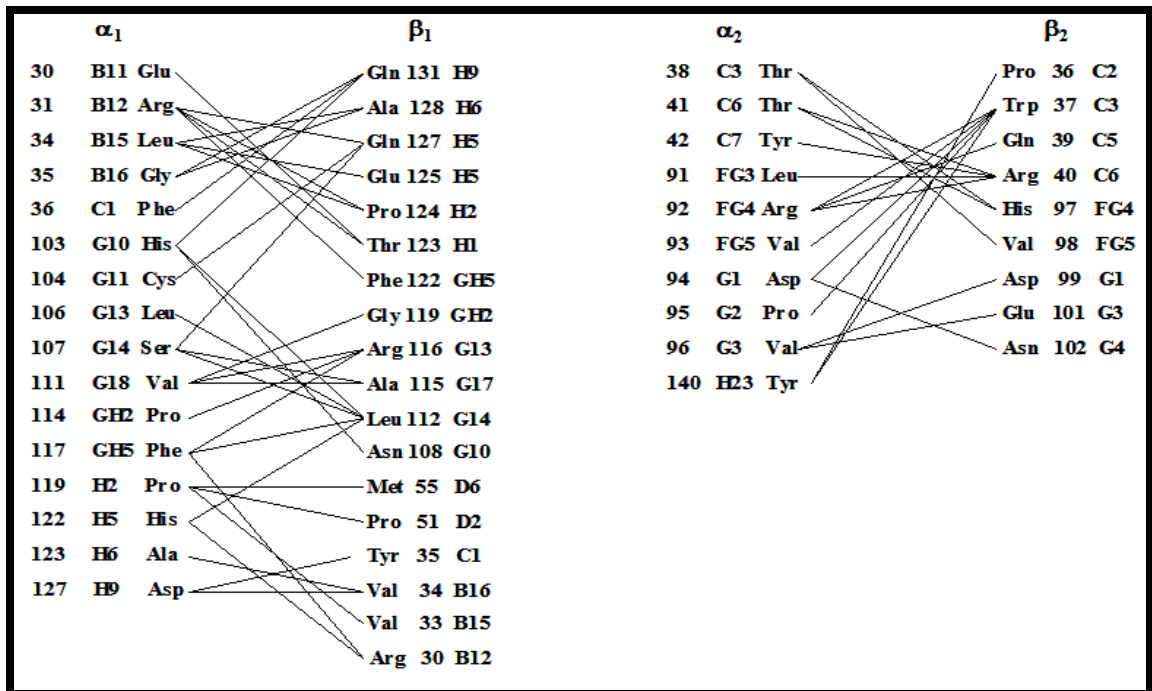
Şekil 2.2 β -globin alt biriminin üç boyutlu yapısı ve adlandırılması (Perutz 1970)

Globin molekülü, yapısında hidrofobik bir çukura gömülü biçimde prostetik grup olarak halkalı bir tetrapireol olan hem içermektedir. Tetrapireoller düzlemsel bir halka içinde dört α -metenil köprüsü ile birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşmaktadır. Bu düzlemsel halkanın merkezinde bir demir atomu (Fe^{2+}) yer almaktadır (Şekil 2.3). Demir, porfirin halkasının dört azot atomuyla bağlanarak hem molekülünün ortasında tutulmaktadır (Perutz 1972). Bu kompleksler, non-polar R- grupları ile globinler içine gömülüdür. Bu şekilde yapıda yer alan demir atomlarının beş numaralı koordinasyon bağı globindeki histidine ait imidazol nitrojenine bağlı durumda, oksihemoglobinde altı numaralı koordinasyon bağı moleküler oksijene bağlı, buna karşın deoksi hemoglobinde ise yine altı numaralı koordinasyon bağı globine ait diğer histidinin imidazol nitrojeni ile bağ yapmış durumdadır (Schroeder 1963, Ho 2000, Schechter 2008).



Şekil 2.3 Hem düzlemi

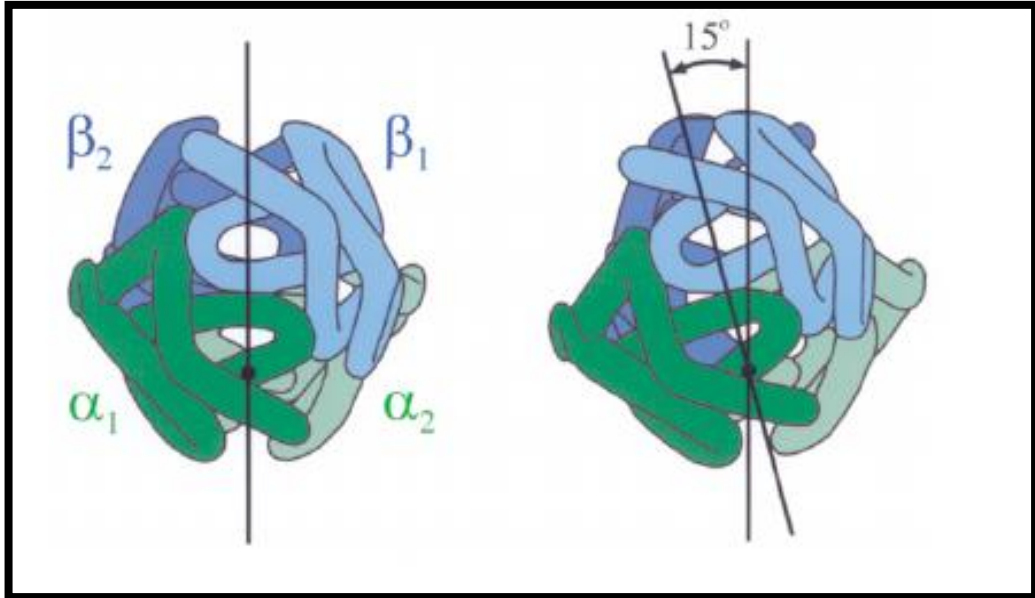
Hemoglobin tetramerinin yapısal özelliklerine bağlı olarak ortaya koyduğu konformasyonel değişimler çeşitli hidrofobik etkileşimler ile sağlanmaktadır. Tetramerik yapıda yer alan globinler arasındaki değme bölgelerinden benzer zincirler arasında olanlar (alfa-alfa globinler ile beta-beta globinler arasında) tuz köprüleri ile gerçekleşmektedir. Benzer olmayan zincirler arasında da değme noktaları bulunmaktadır (Şekil 2.4). En uzun değme bölgesi alfa-1 ile beta-1 arasındadır ve B, G, H heliks bölgeleri olarak adlandırılan 34 amino asitlik uzunluktadır. Bununla birlikte, alfa-1 ile beta-2 arasındaki değme bölgesinden 19 amino asit sorumludur (Antonini 1970, Shikama 2003).



Şekil 2.4 β ve α globin alt birimlerinde değme noktaları (Antonini 1970)

Temel olarak hemoglobinin, oksijenin solunum organından dokulara, karbondioksit ve protonların dokulardan solunum organına taşınması olmak üzere iki temel işlevi bulunmaktadır (Perutz 1978). Oksijenin % 97'si hemoglobine bağlı olarak taşınmaktadır. Bunun yanında hemoglobinin, kanın ve dolaylı olarak diğer vücut sıvılarının pH değerini sabit tutma özelliği de vardır. Hemoglobinin bu özelliği deoksihemoglobinin protonlara olan ilgisinden kaynaklanmaktadır. Bu bakımdan, hemoglobin molekülü hem kandaki yüksek derişimleri hem de içeriğinde yer alan aminoasitlerin fizyolojik pH değerine yakın olan pK' ları sayesinde güçlü bir tampon sistemi oluşturmaktadır (Giardina 1995, Hardison 1998) .

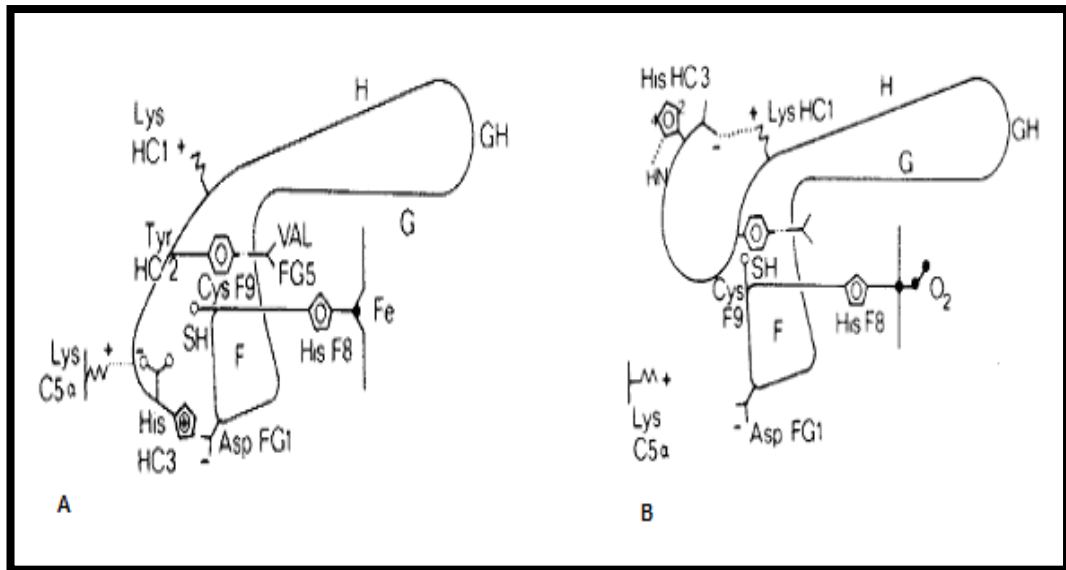
Tetramerik yapıda olan hemoglobin molekülü, oksijen varlığında ve yokluğunda gösterdiği konformasyonel değişimler ile proteinin yapısal, dinamik ve işlevsel özelliğinin anlaşılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. X- ışını kristallografisinde hemoglobinin oksijen ve deoksi formlarının dördüncül yapılarının farklılık gösterdiği saptanmıştır. Oksijen ile bağlı durumdaki hemoglobin daha sıkışık bir yapı ortaya koymaktadır. Bu oksijen ve deoksi formlarının dördüncül yapıları arasındaki farklılıktan hem grubu içinde bulunan demir atomu ile globinler arasındaki değme noktaları sorumludur (Antonini 1970, Perutz 1978, Lukin 2004).



Şekil 2.5 Hemoglobin molekülünün T ve R formu (Henry 2002)

Hemoglobin, içinde bulunduğu ortamdaki derişim değişimlerine göre, yapısal olarak, oksijene ilgisi düşük olan T (*tense-gergin*) veya yüksek olan R (*relaxed-gevşek*)

formlarını alabilir (Şekil 2.5). T formundan farklı olarak R formunda tuz köprüleri bulunmamaktadır (Perutz 1972, Bettati 1998, Lukin 2004). Moleküler oksijeni aldığı zaman, beta zincirlerine ait demir atomları arasındaki uzaklık azalır. Bu olay, demir atomunun oksijen molekülüne doğru hem düzlemi içinde hareket etmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.6). Oksijenlenme işlemi sırasındaki bir diğer önemli değişim, hemoglobin molekülünün alt birimleri olan polipeptid zincirleri arasındaki değme noktalarında oluşmaktadır (Manning 1998, Bettati 1998). Alfa-1/beta-1 değme bölgesindeki değişiklik önemsiz olmakla birlikte, alfa-1/beta-2 arasındaki değme bölgesi değişikliği önemlidir. Alfa-1/beta-1 değme bölgesinde, beta-1 alt birimi, alfa-1 alt birimine göre 4°'lik bir dönme gerçekleştirir. Bu dönme ise, değme bölgesindeki atomlar arasında 1 A°'lük bir açılma yaratır. Oysa ki, alfa-1/beta-2 değme bölgesinde, beta-2 alt birimi, alfa-1 alt birimine göre 13.5 A°'lük bir dönme gerçekleştirerek değme bölgesindeki atomlar arasında 1.9 A°'lük bir açıklık yaratmaktadır. Tüm bu dönme hareketleri sonucunda beta-1 ve beta-2 alt birimleri arasında 6-7 A°'lük bir ötelenme ortaya çıkmaktadır (Antonini 1970, Perutz 1970).



Şekil 2.6 Oksi ve deoksi formunda demir atomunun hem düzlemi içinde hareketi (Bettati 1998)

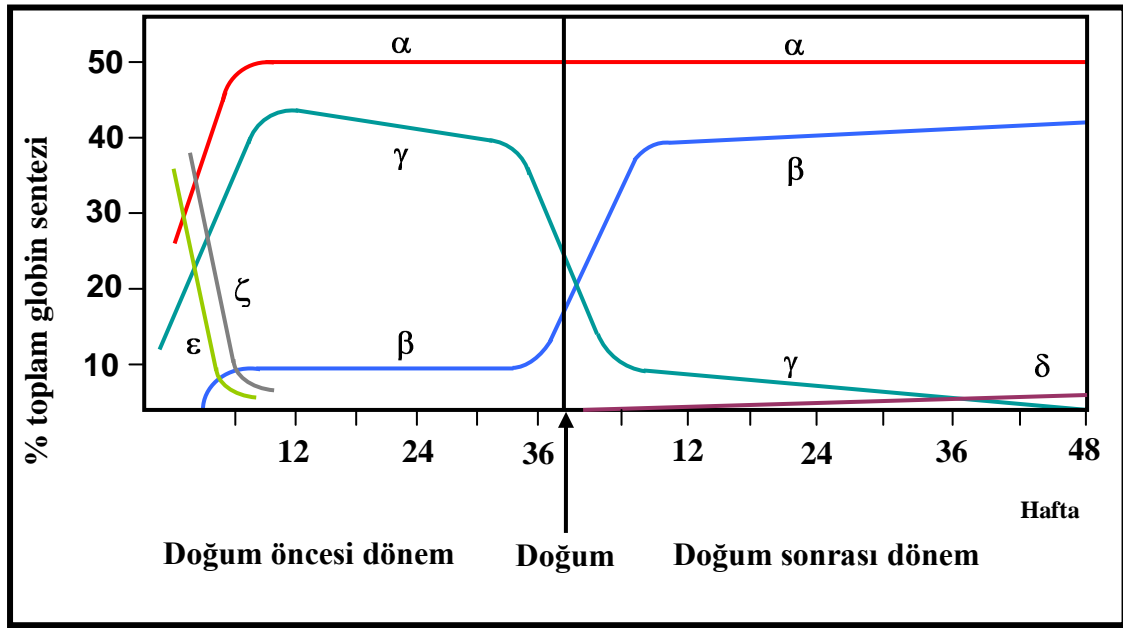
Hemoglobin molekülünün oksijenlenmesi sırasında ortaya çıkan bu konformasyonel değişiklik yapısında bulunan demir atomlarından kaynaklanmaktadır. Çünkü,

deoksihemoglobinde demir atomu, porfirin düzleminin 0.75 \AA kadar dışındadır ve proksimal F8-histidine doğrudur (Perutz 1972, Perutz 1970). Bunun nedeni ise, altıncı koordinasyon bağı moleküler oksijeni bağlamadığı anda atom çapının porfirin düzlemi içindeki boşluktan geçemeyecek kadar büyük oluşundandır. Altıncı koordinasyon bağı moleküler oksijen ile dolduran demir atomu çapını daraltarak, porfirin düzleminin içinden harekete başlar. Bu şekilde de, atom çapını daraltan demir atomu, porfirin düzlemi içerisinden harekete başladığında bağlı olduğu F8-histidini kendisine çeker. Bu hareket sonucunda hem- demir kompleksi ile bağlantılı polipeptid bölgesinde yeni bir şekillenme oluşur. Oluşan bu şekillenme; üçüncül yapıda değişiklik yaratır (Perutz 1970).

Tetramerik yapısından dolayı hemoglobinin farklı fizyolojik koşullarda gösterdiği değişik yapısal ve işlevsel özellikler, allosterik etkileşimlerin incelenbilmesine olanak sağlamaktadır. Hemoglobin molekülü, moleküler oksijenden başka H^+ iyonlarını ve DPG (2,3- difosfogliserat) gibi organik fosfat bileşiklerini de bağlayarak taşıyabilmektedir. DPG, hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltmaktadır. Hemoglobine oksijen ve DPG bağlanma ilgisi ters orantılıdır. DPG oksijenden farklı olarak hemoglobinin α ve β zincirleri arasındaki bir boşluğa bağlanır. Hemoglobin T durumunda iken, zincirler arasında bir DPG molekülünün girebileceği kadar boşluk oluşur ve DPG bu bölgeye bağlanarak T formunu kararlı hale getirip, hemoglobinin oksijene ilgisini azaltmaktadır. R durumuna geçiş ise DPG' nin bağlandığı cebi daraltmakta ve bu nedenle DPG yapıdan ayrılmaktadır. DPG derişiminin artması hemoglobinin T yapıya geçmesi ve oksijene eğiliminin azalması anlamına gelmektedir (Yonetani 2003, Pomponi 2004).

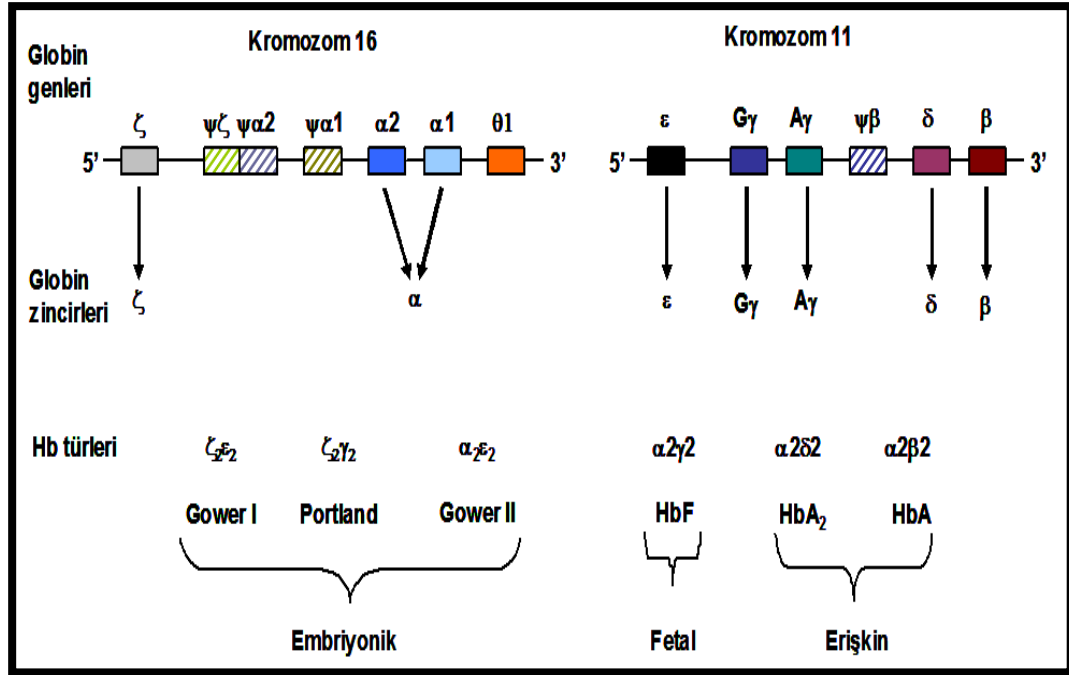
2.2 Hemoglobin Türleri

Yaşamın değişik evrelerinde görülen hemoglobin sentez ve tipleri incelendiğinde temel hemoglobin tipinin 141 aminoasitlik iki alfa zinciri ile 146 aminoasitten oluşan iki beta zincirini içeren HbA olduğu görülmektedir. Embriyonik yaşamdaki başlayarak erişkin yaşama kadar uzanan süreç içerisinde evrelerin özelliklerine göre değişik hemoglobin türlerinin sentezlendiği görülmektedir (Ho 1999).



Şekil 2.7 İnsan globin genleri üretim dönemleri (Ho 1999)

Bu sentez; hemoglobin tetramerini oluşturan globinlerin denetimli biçimde üretilmesine dayanan bir sistemden köken almaktadır. Daha önce morfolojik olarak açıklanan farklılaşmanın değişik evrelerinde kontrol edilmesi ile evrelere özgü hemoglobin alt birimleri sentezlenebilmektedir (Şekil 2.7). Alfa ve beta globin gen aileleri içinde yer alan genler hemoglobin sentezi için aminoasitleri kodlamakla görevlidir. Alfa globin gen ailesi (5'-ζ-α2-α1-3') kromozom 16'nın kısa kolunda bulunurken, beta globin gen ailesi (5'-ε-G_γ-A_γ-ψη-δ-β-3') kromozom 11'in kısa kolunda yaklaşık 60 kb'lık bir alanda yer almaktadır. Her iki gen ailesinde yer alan genler, insanın gelişim evrelerine bağlı olarak ifade edilmektedir. Embriyonik hemoglobinlerde alfa globin benzeri zincirler (ζ, zeta zincirleri) ile gama (Hb Portland, ζ₂γ₂) veya epsilon globin zincirlerinin (Hb Gower 1, ζ₂ε₂), (Hb Gower 2, α₂ε₂) dördüncül yapıyı oluşturması sonucu meydana gelmektedir (Maniatis 1980, Ho 2000).

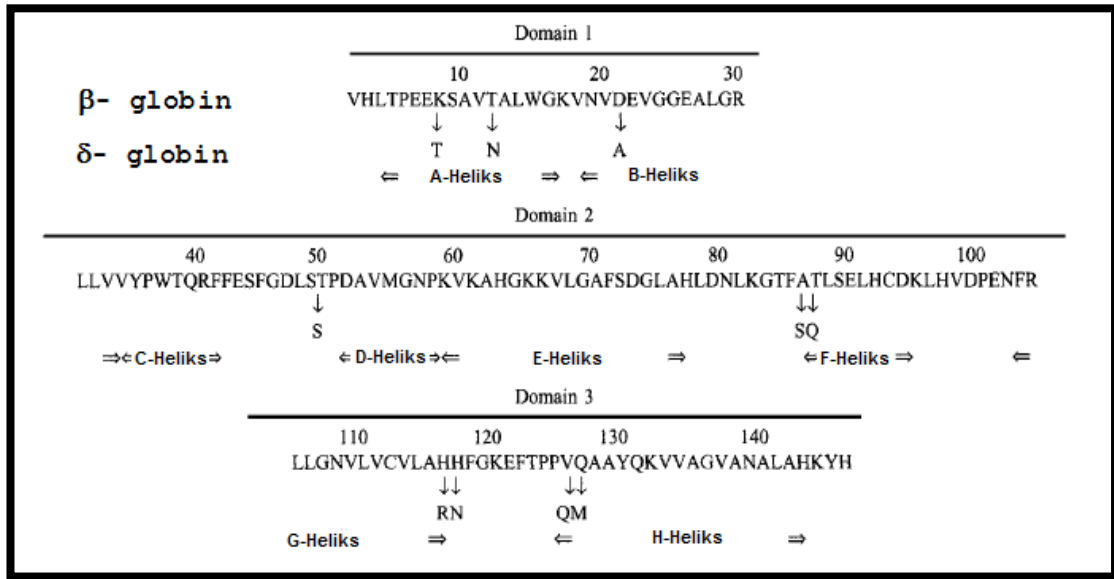


Şekil 2.8 İnsan globin genleri (Ho 1999)

Erişkin ve fetal hemoglobinler alfa globin zincirine ek olarak, beta (Hb A, $\alpha_2\beta_2$), delta (Hb A₂, $\alpha_2\delta_2$) veya gama globin zinciri (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$) ile yapılanmıştır (Şekil 2.8). Tüm beta globin genlerinde ortak olarak 3 ekzon ve 2 intron bulunmaktadır. Bu hemoglobinler alfa ve beta globin genlerinin kontrolü altında sentezlenmektedir (Weatherall 1976, Fronticelli 2002). Beta globin gen ailesi gibi tüm gen aileleri, ürünleri aynı genel işlevi gören bölgesel gen gruplarıdır.

Globin alt birimlerinin tetramerik yapıdaki işlevi yapıyı oluşturan aminoasitlerin aydınlatılması ile helikal yapısının kararlılık ilişkileri irdelenmektedir. Bu durumda meydana gelen aminoasit değişikliklerin helikal katlanmalar ve tetramerik yapıya etkileri gerek protein gerekse gen düzeyinde incelenmektedir. Bu çalışmalarda elde edilecek veriler anormal hemoglobinlerin yapısal ve işlevsel değişikliklerini aydınlatmakta ve tanıda kullanılan yöntemlerdeki farklılıkları ortaya koyabilmektedir. Erişkin hemoglobin türleri olan HbA ve HbA₂ α -globin alt birimlerini ortak olarak içerirler. HbA iki α ve iki β globin alt birimlerinden oluşurken HbA₂ molekülü ise iki α ve iki δ globin alt birimlerinden oluşmaktadır. Alfa (α) alt birimi her iki hemoglobin türünde de ortak olup farklılıkları yaratan δ ve β - globin alt birimleridir (Şekil 2.9). Bu farklılığı yaratan aminoasitler; $\beta 9(A6)Ser \rightarrow \delta 9(A6)Thr$, $\beta 12(A9)Thr \rightarrow \delta 12(A9)Asn$, $\beta 22(B4)Glu \rightarrow \delta 22(B4)Ala$, $\beta 50(D1)Thr \rightarrow \delta 50(D51)Ser$, $\beta 86(F2)Ala \rightarrow \delta 86(F2)Ser$,

β 87(F3)Thr \rightarrow δ 87(F3)Gln, β 116(G18)His \rightarrow δ 116(G18)Arg, β 117(G19)His \rightarrow δ 117(G19)Asn, β 125(H3)Pro \rightarrow δ 125(H3)Gln, β 126(H4)Val \rightarrow δ 126(H4)Met olarak belirlenmiştir (Vasudevan 1998, Inagaki 2000). Bu aminoasitler δ ve β - globin alt birimlerinde dış yüzeyde (eksternal bölgede) yer almaktadır. HbA molekülünde β -globin alt birimlerinde olan 116. ve 125. pozisyonundaki aminoasitler β_1 ve α_1 değme bölgesinde yer almaktadır. Diğer aminoasitler ise β_1 ve α_1 veya β_2 ve α_2 değme bölgesinde yer almamaktadır.



Şekil 2.9 δ ve β - globin alt birimlerindeki aminoasit farklılıkları (Vasudevan 1998)

2.3 Talasemiler ve Anormal Hemoglobinler

Globin genlerinin yapısında bulunan ekzonlardaki DNA dizilerinde oluşan mutasyonlar, amino asit kodlarını değiştirmektedir. Bunun sonucu olarak, kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinler olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Huens 1970, Weatherall 2001, Ho 1999).

Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değişiklikler proteinin yapı ve işlevine de yansımaktadır. Globin genlerinde meydana gelen mutasyonlar globin zincirlerinin üretilmemesi veya normalden az üretilmesi sonucunda yaygın olarak rastlanan ve kalıtsal bir hastalık olan talasemilere neden olmaktadır (Forget 1975). Beta-globin zincirinin anormal üretimi sonucu oluşan beta-talasemiler, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye’de görülen en yaygın kalıtsal bozukluklardan bir tanesidir. Denizli yöresinde beta-talasemi taşıyıcı sıklığı, çeşitli verilere göre % 2,6–3,7 arasında değişmektedir (Yıldız 2005) .

Dünyada 700’ün üzerinde farklı anormal hemoglobin bildirilmiştir (Huisman 1996). 2002 yılında Türkiye genelinde yapılan çalışmada ise, 42 adet anormal hemoglobin türünün varlığı gösterilmiştir (Altay 2002). Bu anormal hemoglobinlerden 13 tanesi α globin zincirinde, 24 tanesi β globin zincirinde, biri de δ globin zincirinde yer almaktadır (Tablo 2.1). 2007 yılında yapılan çalışmada ise Türkiye genelinde anormal hemoglobin türünün 88 olduğu bildirilmiştir (Tablo 2.2) (Akar 2007). Yapılan çalışmalar, Denizli yöresinin beta-talasemi açısından oldukça heterojen yapıda olduğunu göstermektedir. Premarital düzeyde uygulanan hemoglobinopati kontrol programlarında daha fazla moleküler çalışma yapılabildiği için ülkemizdeki ve yöremizdeki çeşitli hemoglobin varyantlarının gözlenmesinde her geçen gün sayısal bir artış oluşmaktadır. T.C Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre, anormal hemoglobinler ve β -talasemi taşıyıcılığı oranı % 3.5 olarak saptanmıştır. Anabilim Dalımız ile Denizli İl Sağlık Müdürlüğü Hemoglobinopati Merkezi arasındaki işbirliği çerçevesinde, yöremizdeki anormal hemoglobinler ve beta talasemilerin evlilik öncesi (*premarital*) tanımlaması yapılmaktadır. Klinik açıdan sağlık sorunu oluşturma riski olan gebeliklerde prenatal tanı uygulaması gerçekleştirilmektedir. Yöremizde

birçok anormal hemoglobin olgusu bildirilmiş olup bazıları ülkemizdeki ilk olgu olma özelliği taşımaktadır. (Tablo 2.3).

Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri (Altay 2002)

Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb O-Padova	α 30(B11) Glu ---> Lys (GAA--->AAG)
Hb Hasharon	α 47(CE5) Asp---> His (GAC--->CAC)
Hb Montgomery	α 48(CE6) Leu ---> Arg (CTG--->CGG)
Hb Adana	α 59(E8) Gly ---> Asp (GGC--->GAC)
Hb J-Anatolia	α 61(E10) Lys--->Thr (AAG--->ACG)
Hb Ube- 2	α 68(E17) Asn--->Asp (AAC--->GAC)
Hb Q-İran	α 75 (EF4)Asp--->His (GAC--->CAC)
Hb Moabit	α 86(F7) Leu--->Arg (CTG--->CGG)
Hb M-Iwate	α 87(F8) His--->Tyr (CAC--->TAC)
Hb Çapa	α 94(G1) Asp--->Gly (GAC--->GGC)
Hb G-Georgia	α 95(G2) Pro--->Leu (CCG--->CTG)
Hb Strumica	α 112(G19) His--->Arg (CAC--->CGC)
Hb J-Meerut	α 120(H3) Ala--->Glu (GCG--->GAG)
β - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb S	β 6 (A3) Glu --->Val (GAG--->GTG)
Hb C	β 6 (A3) Glu --->Lys (GAG--->AAG)
Hb Ankara	β 10 (A7) Ala --->Asp (GCC--->GAC)
Hb E- Saskatoon	B22 (B4) Glu --->Lys (GAA--->AAA)
Hb G- Coushatta	B22(B4) Glu --->Ala (GAA--->GCA)
Hb D-İran	B22 (B4) Glu --->Gln (GAA--->CAA)
Hb E	B26 (B8) Glu --->Lys(GAG--->AAG)
Hb Knossos	B27 (B9) Ala--->Ser (GCC--->TCC)
Hb Hakkâri	B31 (B13) Leu--->Arg (CTG--->CGG)
Hb G-Copenhagen	B47 (CD6) Asp--->Asn (GAT--->AAT)
Hb Summer Hill	B52 (D3) Asp--->His (GAT--->CAT)
Hb Hamadan	B56 (D7) Gly--->Arg (GGC--->CGC)
Hb J-Antakya	B65 (E9) Lys--->Met (AAG--->ATG)
Hb City of Hope	B69 (E13) Gly--->Ser (GGT--->AGT)
Hb J-İran	B77 (EF1) His--->Asp (CAC--->GAC)
Hb G-Szuhu	B80(EF4)Asn--->Lys (AAC--->AAAveya AAG)
Hb İstanbul Saint Etienne	B92 (F8) His--->Gln (CAC--->CAA veya CAG)
Hb N-Baltimore	B95 (FG2) Lys--->Glu (AAG--->GAG)
Hb Köln	B98 (FG5) Val--->Met (GTG--->ATG)
Hb D-Los Angeles	B121 (GH4) Glu--->Gln (GAA--->CAA)
Hb O-Arab	B121 (GH4) Glu--->Lys (GAA--->AAA)
HbBeograd	B121 (GH4) Glu--->Val (GAA--->GTA)
Hb Sarrebourg	B131 (H9) Gln--->Arg (CAG--->CGG)
Hb Brockton	B138 (H16) Ala--->Pro (GCT--->CCT)
γ - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb F-Başkent	γ 128 (H6) Ala--->Thr (GCT--->ACT)

Tablo 2.2 Türkiye’de 2002’den sonra saptanan anormal hemoglobin türleri (Akar 2007)

Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb Selif	α 94(G1) Asp ---> Tyr
Hb Q-İran	α 75(EF4) Asp ---> His
Hb Hasharon	α 47(CE5) Asp ---> His
Hb Bronovo	A103(E8) His ---> Leu
β - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb C	B6 (A3) Glu --->Lys
Hb E- Saskatoon	B22 (B4) Glu --->Lys
Hb G- Coughatta	B22(B4) Glu --->Ala
Hb D-İran	B22 (B4) Glu --->Gln
Hb Hamadan	B56 (D7) Gly--->Arg
Hb Volga	B27 (B9) Ala --->Asp
Hb Beograd	B121 (GH4) Glu--->Val
Hb Siirt	B27 (B9) Ala --->Gly
Hb D Punjab	B52 (D3) Asp--->His
Hb J-İran	B77 (EF1) His--->Asp
Hb Tyne	B65 (E9) Lys--->Met
Hb G-Copenhagen	B69 (E13) Gly--->Ser
Hb D-İran	B22(B4) Glu --->Gln
γ - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb A2 Yialousa	γ 82 C-T Ala 28 Ser

Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin dağılımına bakıldığında % 57.8 ile Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] birinci sırada yer almaktadır (Atalay 2005). Denizli yöresinde bildirilen anormal hemoglobin türleri; Hb-D Los Angeles, Hb-C, Hb-E Saskatoon, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd, Hb-Yaizu, Hb-J-İran, Hb-D-Ouled Rabah ve Hb-Tunis türleridir (Atalay 2008, Köseler 2006, Köseler 2008, Köseler 2009). Bunlardan Hb-D-Ouled Rabah, Hb-Yaizu ve Hb-Tunis dünyada ikinci ülkemizde ilk kez bildirilen anormal hemoglobin özelliği taşımaktadır (Köseler 2009).

Tablo 2.3: Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler

Anormal Hemoglobin	Mutasyon	Bulunma yüzdesi (%)	Kaynak
Hb D- Los Angeles	β 121(GH4)Glu →Gln	57,8	Atalay 2005
Hb S	β 6(A3)Glu →Val	21,9	Atalay 2005
Hb G-Coughatta	β 22(B4)Glu →Ala	15,6	Atalay 2005
Hb E- Saskatoon	β 22(B4)Glu →Lys	3,1	Atalay 2005
Hb C	β 6(A3)Glu →Lys	1,6	Atalay 2005
Hb J-İran	β 77(EF1) His →Asp	-	Köseler 2006
Hb Beograd	β 121(GH4) Glu →Val	-	Atalay 2008
Hb Yaizu	β 79(EF3)Asp →Asn	-	Atalay 2007
Hb D Ouled Rabah	β 19(B1)Asn →Lys	-	Köseler 2008
Hb Tunis	β 124(H2)Pro →Ser	-	Köseler 2009
Hb Hinsdale	β 139(H17)Asn →Lys	-	Yayın aşamasında

2.4 Talasemi ve Anormal Hemoglobinlerin Tanımlanması

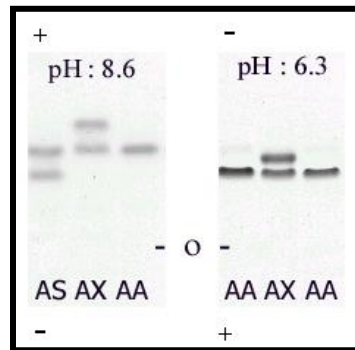
Günümüzde kullanılan tanı yöntemleri, hemoglobin varyantlarının daha ayrıntılı ve doğru biçimde tanımlanabilmesini olanaklı kılmaktadır. Premarital tanımlamada bu hemoglobin türlerinin hızlı tanısında karmaşık yöntemlere gereksinim duyulduğu saptanmıştır. Premarital tanımlama çalışmaları sonrasında, patolojilere neden olabilecek evliliklerde CVS (*chorionic villus sampling*) ve amniyon sıvısı örneklemesine dayalı prenatal tanı uygulanmaktadır (Kurnit 1979, Atalay 1990). Özellikle premarital tanı ve tanımlanmamış evli çiftlerde oluşan gebeliklerde yöremizde sık rastlanan hemoglobin türlerinin hızlı, çabuk ve ucuz tanısı çözüm getirilmesi gereken temel bir sorundur. Beta talasemilerin premarital taramasında önem taşıyan HbA₂ düzeyi ile orak hücre anemisine yol açan HbS'in ayırıcı tanısı belirgin bir önem taşımaktadır.

2.4.1 İyon Değiştirici Kromatografi

Beta-talasemi taşıyıcılığının belirleyici faktörlerinden biri olan HbA₂ düzeylerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler kromatografik tabanlıdır. Bu çalışmalarda kullanılan yöntem anyon değiştirici kolon materyali olan DE-52 sistemidir. DE-52, DEAE-Selüloz içerikli olup glisin-KCN tampon sistemini kullanmaktadır. DE-52 mikro kolon kromatografi yöntemine göre, HbA₂ değeri % 3,7'den düşük olan kişilerin normal, % 3,7'den yüksek olanların ise talasemi taşıyıcısı oldukları kabul edilmektedir. DE-52 mikro kolon kromatografisi yöntemiyle HbA₂ düzeyleri belirlenen hastalarda, normal HbA₂ değerine sahip olanların mutasyonu saptanarak beta-talasemi taşıyıcısı oldukları belirlenmektedir. Anabilim Dalı'mızda yayınlanmamış verilere göre, normal HbA₂ düzeyine sahip beta-talasemi taşıyıcılarının oranı % 8,0 olarak saptanmıştır. Bu analizler, 20 farklı beta-talasemi mutasyonu taranarak elde edilmiştir. Bu mutasyonlar içerisinde en sık rastlanan IVS-1/nt-110 beta-talasemi taşıyıcıları arasında da normal HbA₂ değerine sahip hastalar literatürde bildirilmiştir (Wajcman 2001, Wada 2002).

2.4.2 Hemoglobin Elektroforezi

Anormal hemoglobinlerin tanımlanmasında elektroforez yöntemi hemoglobin türlerinin analizi için kullanılan yaygın bir yaklaşımdır. Bu yöntem, elektrik alanında farklı yükler taşıyan farklı globin zincirlerinin veya farklı hemoglobinlerin hareketine dayanmaktadır. Hemoglobinler alkali pH'da negatif yüklerle yüklenirler ve anoda, asit ortamda ise pozitif yüklerle yüklenmiş olduklarından katoda doğru hareket etmektedirler. Hemoglobin elektroforezi için kullanılan sistemler, selüloz asetat ve agaroz yapıdaki membranlarda uygulanmaktadır (Hartwell 2005). Farklı yük kazanan hemoglobin türleri hem asidik hem de alkali ortamda birbirlerinden ayrılabilirler (Şekil 2.10) Elektroforetik ve kromatografik yöntemler ile anormal hemoglobinlerin davranış değişikliği belirlenmekte, DNA dizi analizi ile bu değişikliğe neden olan genetik etken tanımlanabilmektedir. Buna karşın bu yaklaşım ile elektroforetik ve kromatografik özellikleri benzer hemoglobin varyantlarının tanımlanmasında açık ve kesin bir ayırım sağlanamamaktadır. Örneğin; HbS, Hb D-Los Angeles ve Hb Beograd kromatografik ve elektroforetik olarak benzer özellik göstermektedir (Atalay 2007). Bu durumda açık ve kesin ayırıcı tanı gen düzeyinde DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.10 Hb J- İran örneğinin alkali ve asit ortamdaki elektroforezi (Köseler 2006)

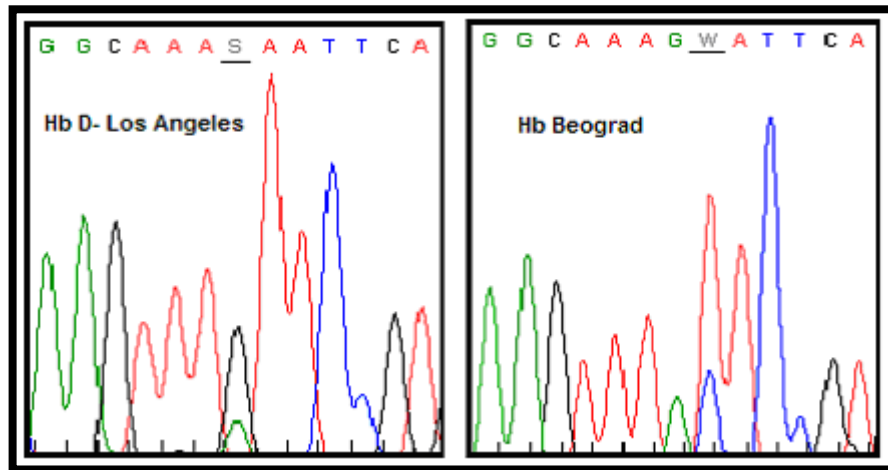
2.4.3 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir diğer kromatografik analiz ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir. Bu sistemde, sabit ve hareketli faz bulunmaktadır. Örnek bileşenleri, sabit faz ile bileşiğin non-kovalent etkileşimine göre göç ederler. Etkileşim derecesi, göç derecesi ve bileşenlerin ayrılması ile tanımlanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, talasemiler ve

hemoglobin varyantlarının ön tanısında yararlı katkılarda bulunmaktadır (Storti-Melo 2009).

2.4.4 Restriksiyon Enzim Analizi

Anormal hemoglobinlerin PCR tabanlı yöntemlerle tanımlanmasında, restriksiyon endonükleazlar ile özgün nükleotit dizilerinin kendilerine özgü biçimde belirli dizilerden kesilmesi yer almaktadır. Bu özellik, hedef dizinin normal diziden ayrılabilmesinde yararlı bir moleküler tanı yaklaşımıdır. PCR yöntemi ile çoğaltılan genomik DNA'daki normal ve mutant alleller bu yöntemle kolaylıkla ayrt edilebilmektedir (Walker 2000). Bu yöntemin uygulanmasında karşılaşılan temel sorun, enzim tanıma bölgesinde gerçekleşebilecek başka mutasyonlarının da benzer sonuç vermesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin; Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln], beta globin geninin 121.kodonunda gelişen GAA>CAA mutasyonu, Hb Beograd [β 121(GH4)Glu>Val] ise beta globin geninin 121.kodonunda gelişen GAA>GTA mutasyonu ile ortaya çıkmaktadır (Atalay 2007) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Hb D- Los Angeles ve Hb Beograd DNA dizi analizi (PAÜTF- Biyofizik Anabilim Dalı Arşivi)

Ayrıca Hb D-Los Angeles ve Hb Beograd kromatografik ve elektroforetik olarak benzer özellik göstermektedir (Atalay 2007). Bu mutasyonun bulunduğu bölge PCR yöntemi ile çoğaltılmakta ve Eco RI enzimi tanımlama çalışması yapılmaktadır. Eco RI enzimi çift iplikli DNA (dsDNA-*double stranded*) üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3'

dizisini tanıyarak kesmektedir. Tanıma bölgesinde yer alan GAA dizisi normal beta globin genine ait 121.kodonu kodlamaktadır. Dolayısı ile yapılan çalışmada anormal hemoglobin varyantının Hb D-Los Angeles veya Hb Beograd olduğuna ilişkin açık ve kesin bir sonuç elde edilememektedir. Bundan dolayı, ayırıcı molekül tanı için özgün problemlerle ilgili nokta emdirimi (*dot-blot*) veya DNA dizi analizi çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Bahadır 2009).

2.4.5 DNA Mikroarray Yöntemi

Nanoteknolojik gelişmeler laboratuvar tanı yöntemlerinde hızlı tanıya yönelik getirdiği avantajlar ile güncel bir yaklaşım olarak yer almaktadır. Bu yaklaşımda çok fazla örneğin aynı anda çalışılması, tanının hızlı biçimde gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır (Jain 2005). DNA mikroarray, genomik DNA'daki mutasyonların taranmasında kullanılan hibritleşme tabanlı yöntemdir (Tuzmen 2001). Hibritleşme, iki tümleyici molekül arasında veya çözültideki bir molekül ve katı bir destek üzerindeki hareketsiz bir tümleyici molekül arasında meydana gelmektedir. DNA çip yöntemleri de tek iplikli floresan işaretli moleküller ve çip yüzeyindeki tek iplikli nükleotid dizileri arasındaki hibritleşme temeline dayanmaktadır (Fadiel 2003). Foglieni ve ark. bu yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada sık rastlanan dokuz β -talasemi mutasyonunu (Cd39C > T, IVS 1-110G > A, IVS 1-1G > A, IVS 1-6T > C, IVS 2-745C > G, Cd6delA, -87C > G, IVS 2-1G > A ve Cd8delAA) araştırmıştır. Çalışmayı, önceden diğer yöntemlerle (allel-spesifik hibritleşme, dot blot ve reverse dot blot, ARMS, RFLP, DGGE ve dizi analizi) genetik yapısı belirlenmiş olan 250 DNA örneği üzerinde denemiş ve daha sonra multiplex PCR yöntemi ile çipin test yüzeyi üzerinde 9 mutasyonun analizini gerçekleştirmişlerdir. Sinyal alınamayan örneklerin nedenini amplifikasyonun yetersiz veya az olması ya da pürifikasyon sırasında örneklerin kaybedilmesi ile açıklamışlardır. Toplam 700 örnek ile yaptıkları çalışmada; bu açık ve esnek yöntemin her bir coğrafik bölgedeki mutasyonların bölgesel yaygınlığına göre tasarlanabileceği sonucuna varmışlardır. Ayrıca dünyanın diğer bölgelerindeki β -talasemiye neden olan diğer mutasyonları da içerecek şekilde düzenlenebileceğini belirtmişlerdir (Foglieni 2004). Türkiye'de Çukurova yöresinde Seydel ve ark. mikroarray yöntemi kullanarak anormal hemoglobin taşıyıcısı toplam 21 olguda bu anormal hemoglobinleri saptamışlardır. Yine aynı bölgede Yalın ve ark. yaygın olarak görülen IVS I-1, IVS I-5,

IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1, IVS II-745, Cd5, Cd8/9, Cd39, Cd44, -87, -30, Hb D ve HbS mutasyonunu mikroarray yöntemi kullanarak tanımlamışlardır (Seydel 2007).

2.4.6 SPR (*Surface Plasmon Resonance*) Spektroskopisi

Gelişen teknoloji ile birlikte yöntemlerdeki hızlı tanı sistemleri önem kazanmaya başlamıştır. Mutasyonlara yönelik DNA analizleri ve protein-protein etkileşimlerine yönelik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına yönelik çalışmalar artmaktadır.

SPR (*Surface Plasmon Resonance*) Spektroskopisi, madde-ışık etkileşimini temel alan, madde-madde etkileşiminin herhangi bir işaretleyici kullanılmaksızın izlenebilmesine olanak sağlayan gerçek zamanlı bir biyosensör sistemidir (Rich 2001). Biyosensörlerin temel işlevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyallere dönüştürülerek elde edilecek verilerin değerlendirilmesini kolaylaştırmaktır. Biyosensörler, biyolojik algılayıcı (*reseptör*) ve bilgi dönüştürücü (*transducer*) bileşenlerden oluşmaktadır. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler genellikle biyoreseptör olarak adlandırılır. Biyoreseptörler arasında en yaygın kullanılanlar enzimler, antikolar, mikroorganizmalar ve nükleik asitlerdir (Homola 2003). SPR sistemleri, optik ve plasmon rezonansı olarak bilinen iki fiziksel ilkenin birlikte kullanımı ile ortaya çıkan gerçek zamanlı biyomolekülse etkileşim analiz sistemi olarak tanımlanmaktadır.

Yeni nesil biyofiziksel aday yöntemlerden birisi olan SPR yaklaşımı, birbirleri ile etkileşim kurabilen moleküller arasındaki etkileşimin incelenebilmesi, enzim ya da radyoaktif madde gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmaksızın bu çalışmaların yapılabilmesini sağlayan bir biosensör türüdür (Besenicar 2006). SPR optik ve plazmon rezonans kavramlarını birleştirerek canlı hücrelerin, protein-protein, protein-nükleik asit, nükleik asit-nükleik asit gibi moleküllerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin doğasına ilişkin önemli veriler sağlamaktadır (Alves 2005). Nükleik asit-nükleik asit etkileşiminin incelenmesinde, Atalay ve ark. SPR ü ile bir anormal hemoglobin türü olan HbS [$\beta 6(A3)(GAG>GTG)$] mutasyonunu içeren örneklerin homozigot ve heterozigot formlarını, Feriotto ve ark. ise kodon 39 (C>T), IVS1/nt.1 (G>A), IVS1/nt.6 (T>C) ve IVS1/nt.110 (G>A) gibi farklı beta talasemi mutasyonlarını

tanımlamışlar ve bu mutasyonların homozigot ve heterozigot formlarını birbirlerinden ayırabilen veriler elde etmişlerdir (Feriotto 2004, Atalay 2006).

SPR tabanlı biosensörlerin kullanılmasından bu yana, biyomolekülse etkileşimlerin farklı alanlarında birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar arasında biyolojik ajanların ve bakterilerin tanımlanması, antijen – antikor ilişkilerinin incelenmesi, immunosensor olarak kullanılması yer almaktadır (Oh 2004, Vostiar 2003). SPR tabanlı yapılan çalışmaların sayısındaki artış optik biosensörlerin kullanımındaki yaygınlığı ve önemini açıklamaktadır. Bu doğrultuda yöntemin geliştirilmesine yönelik ilerlemeler dikkat çekmektedir. Bu noktada immobilize edilen moleküle ait kimyasal özellikler ve elde edilen sonuçların daha ayrıntılı biçimde incelenmesine yönelik araştırmalar sürdürülmektedir (Rich 2008).

2.5 Rekombinant Antikorlar ve Display Yöntemleri

Rekombinant algılayıcı moleküller ya da rekombinant antikorların, hibridoma veya poliklonal antikorların kullanımı gibi geleneksel yöntemlere olan üstünlüklerinde deney hayvanı kullanımını ortadan kaldırmaları, uygulama kolaylığı ve immünojenite ile toksisite kavramlarında göze çarpmaktadır (Hoogenboom 2000). Protein hedeflerin algılanmasında güncel bir yaklaşım olan *display* teknolojileri özel bir yer tutmaktadır. Rekombinant antikorların kullanımı protein hedeflerin algılanmasında, Peptid yapısındaki molekül algılayıcıların geliştirilmesinde gelişen bir çalışma alanı olup hedef moleküle ait özelliklerin, etkileşen moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde ve hedef molekülün tanımlanmasında uygulanan bir alan özelliği taşımaktadır (Smith 1997). Genel ve basit bir anlatım ile rekombinant antikorlar ya da rekombinant algılayıcı moleküllerin üretimi önceden belirlenmiş bir hedefi algılayabilen peptid ya da protein yapıların herhangi bir taşıyıcı üzerinde sunulması temeline dayanmaktadır (Arap, 2005). Uygulamaların hemen hemen tümünde taşıyıcı yapı olarak fajmit partiküllerinin kullanılması, bu tekniği “faj üzerinde sunmak ya da göstermek” anlamına gelen “phage display teknolojisi” olarak tanımlamaktadır (Daugherty 2007).

Phage display teknolojisi, bir peptid veya proteinin filamentöz faj üzerinde eksprese edilmesi veya gösterilmesi olarak Smith tarafından 1985 yılında bildirilmiştir (Paschke 2006). Bu teknolojiye, filamentöz faj kılıf proteinini kodlayan genlerin arasına, rekombinant DNA teknikleri ile bir gen ya da gen parçasının yerleştirilmesi (insertion) gerekmektedir (Arap 2005). Yerleştirilen bu gen ya da gen parçaları faj partikülü üzerinde füzyon proteini olarak 10^9 - 10^{11} çeşitlilikte eksprese edilebilmektedir.

Monoklonal antikor üretim yaklaşımı olan hibridoma teknolojisinin başarısı hedef molekülün, kullanılan (fare, tavşan gibi) canlı sistemdeki immünojenite ile sınırlı kaldığından, phage display yaklaşımının üstünlüğü kolaylıkla ortaya konulabilmektedir (Baca 1997, Fuh 2000). Phage display tekniği bu özellikleri kapsamında, hibridoma tekniği tarafından özgün antikor üreten hücrelerin miyeloma hücreleri ile füzyona uğrattılıp hibrit formatında hücresel immortalizasyon temelinde uygulanırken, burada immortalize edilen özgün antikor genleridir. Diğer taraftan bu açılımın sunduğu bir diğer kolaylık ise peptid ya da scFv (single chain variable fragments) kütüphaneleri oluşturularak bağışıklama ve hayvan kullanımının ortadan kaldırılmasındadır.

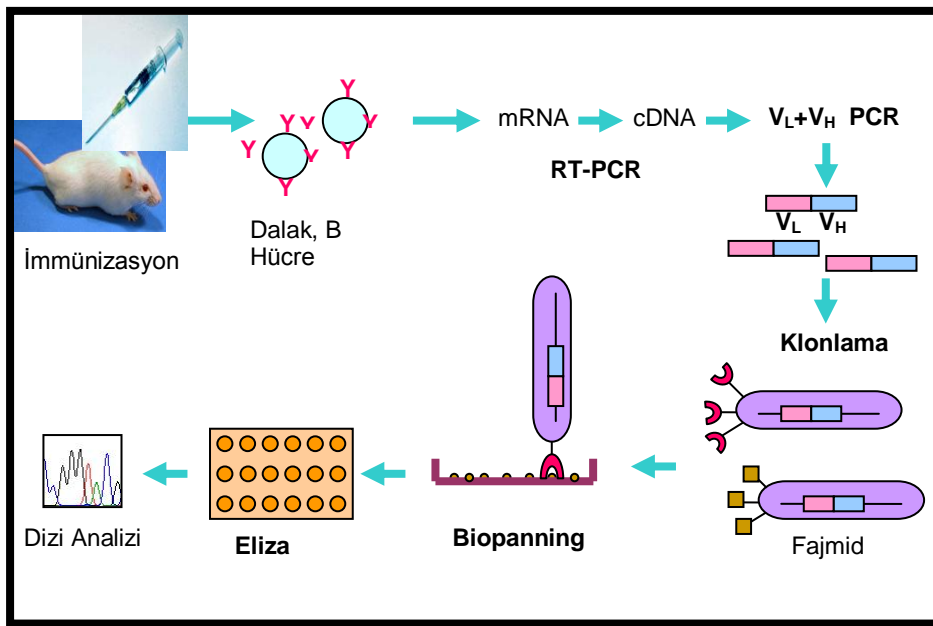
Uygulamada klonlanan, modifiye edilen ya da yapay olarak oluşturulan odaklar ya scFv formatında klonlanan immüoglobulin ağır (V_H) ve hafif (V_L) zincirleri ya da yapay olarak üretilen peptid/scFv kütüphaneleridir (Barbas 1991). Bu yaklaşımın getirdiği bir diğer kolaylık da insan antikorlarının üretimi ve kullanımında sağladığı molekülse değişiklik ve fizyolojik adaptasyon sorunlarının çözümündeki olası katkılarıdır.

Display teknolojileri kendi içerisinde scFv (*single chain of variable fragments*) ve yapay peptid kütüphanelerine dayalı iki temel yaklaşımı içermektedir. Bu yaklaşımlardan diğeri olan yapay peptid kütüphaneleri kullanımında ise, yapay olarak üretilen çeşitli uzunluklardaki (7-mer,12-mer,16-mer, vb.) peptid dizileri fajlar üzerinde eksprese edilerek hedeflerle karşılaştırılmakta ve özgün peptidler seçilmektedir. Bu yaklaşım ile farklı antijen tanıma bölgelerine sahip antikor kütüphaneleri yapılabilmektedir. Üretilen bu kütüphaneler içerisinde öngörülen hedefe karşı seçicilik gösterebilen peptid ya da protein yapıların seçilmesi yöntemin ikinci bir adımı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu seçim aşaması, ilginlik özelliğine dayanmakta ve bu yöntemin uygulanmasında “biopanning” ya da “panning” olarak tanımlanmaktadır (Azzazy, 2002). Her iki yöntemde de elde edilen özgün klonlar Faj Eliza, SPR, gibi ek yöntemlerle desteklenmektedir.

Display teknikleri ile elde edilen peptid ve protein algılayıcılar çeşitli uygulamalarında, molekülse algılayıcı bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu molekülse algılayıcıların hedeflerine olan ilginlikleri molekülse konformasyon uyumuna dayanmaktadır (Kriplani 2005, Filpula 2007). Molekülse konformasyon ilişkileri molekülse biyofizikte önemli bir yer tutmaktadır (Barkhordarian 2006). Phage display teknolojisinin uygulama alanları, temelde moleküler yaklaşımların uygulandığı tüm alanlar olarak özetlenebilir. Başka bir bakış açısı ile tanı tedavi ve yapısal ayrımların gözlemlenmesi olarak da tanımlanabilir. Bu nedenle, uygulama disiplinlerinden çok işlevsel yaklaşım içinde bir sınıflama yapılırsa, peptidler, hormonlar, çeşitli inhibitörler, antikorlar, enzimler, aşular, transgenik hayvan ve bitki üretimi ve benzeri biyoteknolojik yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır (Allen 2001, Bajrovic 2001, Fischer 2005).

2.5.1 scFv Yöntemi

Display tekniklerinden scFv yaklaşımında; hedef molekül ile fare tavşan gibi herhangi bir organizmada bağışıklama işlemi gerçekleştirildikten sonra organizmanın bağışıklık sistemi tarafından üretilen immünglobulin Fab bölgesinde yer alan antijeni algılayıcı protein yapı klonlanmaktadır. Klonlama işlemi organizma tarafından üretilen antikoların antijeni algılayıcı ağır ve hafif (V_L ve V_H) zincirleridir. Organizmada üretilen ağır ve hafif zincirler bir araya getirildikten sonra, uygun faj ve/veya fajmit vektöre klonlanarak bir scFv kütüphanesi elde edilmektedir.



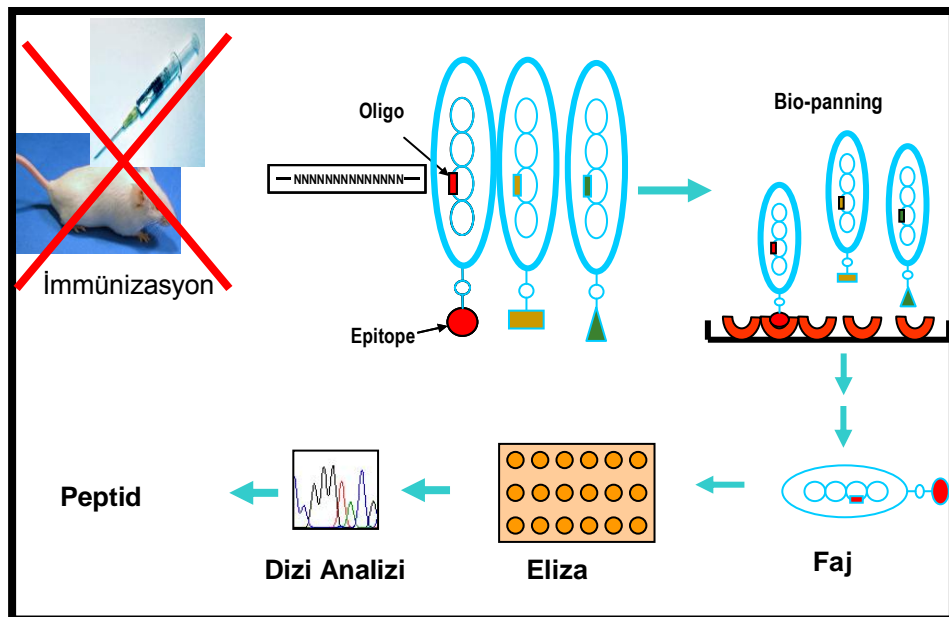
Şekil 2.12. scFv yöntemi

Bu aşamadan sonra seçim, elde edilen kütüphaneden biopanning yaklaşımı ile gerçekleştirilmektedir. Bu yaklaşım ile antijeni algılayan parçaların bir araya getirilmesi ve antijeni algılama yeteneğine sahip olan tek bir zincir değişken parçanın (scFv) elde edilmesi amaçlanmaktadır (Cwirla 1990). Özgün hedef ile bağışıklanan fareden dalak B hücreleri elde edilerek mRNA saflaştırılmakta ve bu mRNA kalıbı kullanılarak cDNA üretilmektedir. Ağır ve hafif (V_L ve V_H) zincirler üretilen bu cDNA kalıbı kullanılarak PCR yöntemiyle hazırlanmaktadır. ScFv yapısını oluşturmak için ağır ve hafif (V_L ve V_H) zincir esnek polipeptid köprüsü ile birleştirilir (Kang 1991). Bu köprü (Gly_4Ser)₃ tekrarından oluşan onbeş amino asitlik bir yapıdır. Oluşturulan bu scFv yapısının filamentöz faj yüzeyinde yer alması için fajmit karakterindeki vektöre klonlanır. Bu

durumda klonlama yapılan scFv kütüphanesi, fajmit partikülünün dış yüzeyinde protein olarak yer alır ve hedef molekül ile karşılaştırılmaya hazır hale getirilmiş olur. Hedef molekül ile fajın karşılaştırılması işlemine biopanning adı verilir ve bu işlem iki – üç kez tekrarlanır. Biopanning sonrası elde edilen klonlardan hangisinin hedef moleküle karşı ilginliğinin yüksek olduğunun bulunması ise Faj Eliza yöntemi kullanılarak saptanır.

2.5.3 Yapay Peptid Kütüphaneleri

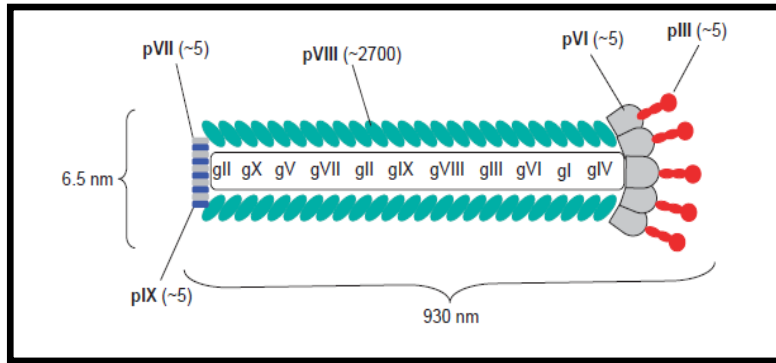
Diğer bir display yönteminde ise; değişik uzunluktaki peptidlerin yer aldığı yapay peptid kütüphaneleri kullanılır (Binetruy-Tournaire, 2000). Yapay olarak üretilen çeşitli uzunluklardaki (7-mer,12-mer,16-mer, vb.) peptid dizileri fajlar üzerinde ekspres edilerek hedeflerle karşılaştırılmakta ve özgün peptidler seçilmektedir. Bu yöntemin kullanılmasıyla scfv yaklaşımındaki bağışıklama aşaması ortadan kalkmakta ve immünojen özelliği olmayan moleküllere karşı da algılayıcı rekombinant moleküllerin seçilebilmesi olanaklı hale gelebilmektedir (Mark 1991, Marks 1992, Li 2003). Hedef molekül ile fajın karşılaştırılarak seçimi (biopanning), Faj Eliza ve DNA dizi analizi ile faj genomundaki algılayıcı peptid dizisinin belirlenmesi phage display tekniklerindeki ortak noktalaradır.



Şekil 2.13 Yapay Peptid kütüphaneleri

2.5.1 Display Yönteminde Kullanılan Vektörler

Display teknolojilerinin uygulamasındaki önemli noktalardan biri uygulamada kullanılan vektör ve o vektöre ait özelliklerdir. Bu teknikte kullanılan vektörler M13 tabanlı filamentöz faj karakterindeki fajmitlerdir. Filamentöz fajların genom yapısının küçük olması nedeni ile geniş kütüphaneler kolaylıkla oluşturulabilir ve böylelikle *in vitro* seçimde ideal taşıyıcı yapı olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla kullanılan filamentöz fajlar M13, fd ve fl veya bu faj kökeninden oluşturulan rekombinant faj yada fajmit türleridir (Sidhu 2000, Sidhu 2001).

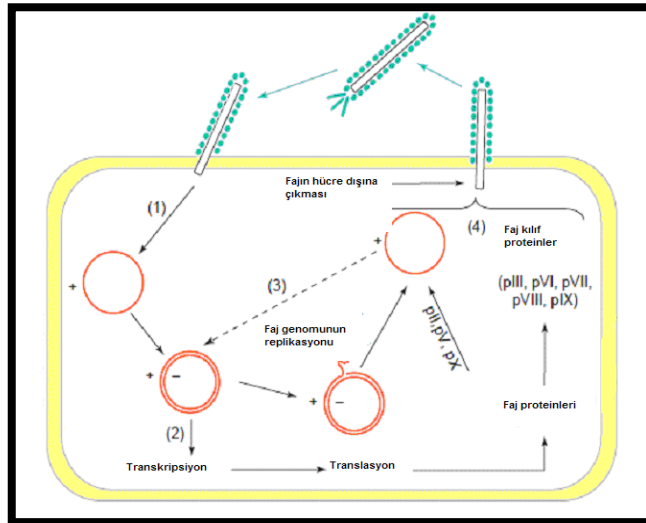


Şekil 2.14 Fajın yapısı (Müllen 2006)

Phage display yönteminin uygulama alanları içerisinde kılıf proteinlerini kodlayan genler arasına yerleştirilerek gerçekleştirilen sunum işlemi, tek tür (mono-valent) çoklu tür (poly-valent) olmak üzere iki farklı yaklaşım ile gerçekleştirilmektedir. Çoklu türün sunumunda, küçük yabancı DNA parçaları faj kılıf proteinleri arasına yerleştirilerek faj partikülü üzerinde sunulmaktadır. Filamentöz fajlardan rekombinant olarak oluşturulan fajmitlerden yararlanılmakta ve gen yerleştirilmesi işlemi, fajmit partikülünün pIII'ü ile füzyon proteini üretebilecek şekilde düzenlenmektedir. Burada oluşturulan fajmit, temelde plazmid davranışlarına ek olarak faj gibi davranabilme özelliği göstermektedir. Bu nedenle, “intergenik bölge” ile “faj replikasyon başlangıç noktası” filamentöz fajlardan gelmekte, ancak diğer bazı faj genlerini içermediğinden doğası gereği bir faj partikülünü kendi başına üretememektedir. Klonlama sonrası bu fajmit formundaki plazmitleri taşıyan hücreler bir yardımcı faj ile enfekte edildiklerinde, fajmit genomundaki eksik genler ve ilgili proteinler üretilebileceğinden, üzerinde değişiklik yapılmış olan fajmitler kolaylıkla konakçı hücreden dışarıya çıkabileceklerdir.

Non-litik bakteriofaj fd ve M13 filament şeklinde olup ~6,5nm çapında ve ~900 nm uzunluğundadır. Fajın tek zincir DNA genomu replikasyonda, morfolojide ve virüs kılıfın oluşumunda görev alan on farklı proteini kodlar (Şekil 2.14). Bu fajlara ait on farklı genden iki tanesi olan gen III (gIII) ve gen VIII(gVIII) display tekniklerinde kullanılmaktadır. Gen III faj partikülünün yakın ucunda fajın türüne göre 3-5 kopya olarak protein III (pIII)'ü, gen VIII ise temel kılıf proteini olan protein VIII (pVIII)'in 2700 kopya olarak üretiminden sorumludur. G8p'nin 50 amino asidi virüs DNA'sı ile etkileşime giren C- terminal bölgesinde bulunur. Merkezi hidrofobik bölge g8p alt ünite ile etkileşimdedir. Asidik N-terminal bölge dışa dönük olarak bulunur (Marvin 1969).

Minör kılıf proteini pIII 406 amino asit uzunluğunda 43.000 dalton molekül ağırlığına sahip iki alt ünitelerden oluşur. İlk alt birimin C- terminal ucu viral kılıf proteinle etkileşir, morfoloji ve membran bağlantısı için gereklidir (Manchak 2002). İkinci alt birimin N- terminal ucu bakterinin F- pilisine bağlanarak bakteri hücrelerini enfekte eder (Şekil 2.15) (Russel 1989, Müllen 2006).



Şekil 2.15 Fajın yaşam döngüsü (Müllen 2006)

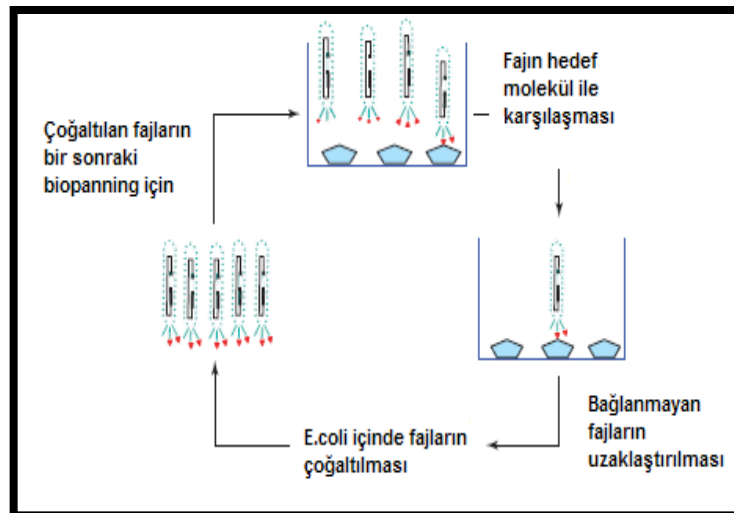
Filamentöz faj ilk olarak Smith tarafından küçük peptidlerin fajın minör kılıf proteini (pIII) ile birlikte füzyon halde eksprese etmek amacı ile kullanılmıştır. Winter ve ark. antikora ait Fab bölgelerinin filamentöz bakteriyofaj üzerinde bulunan pIII kılıf proteini ile birlikte füzyon halde eksprese edilebileceğini göstermişlerdir. Bu tür vektörlerde klonlama yapılan bölge fajmitin yapısal kılıf proteinlerinden pIII'e ait olan genin başlangıç noktasıdır. Bu durumda klonlama yapılan gen ya da gen grubu (gen

kütüphanesi) fajmit partikülünün dış yüzeyinde pIII ile birlikte füzyon proteini olarak anlam kazanmaktadır (Palmer 2003).

Display tekniklerinde vektörlerin sahip oldukları bu özellikler kullanılarak hazırlanan fajmit kütüphanesi içinde hedef molekül ile (antijen, immünojenik olmayan moleküller) konformasyonel ilişki kurabilen özgün yapılar elde edilebilmekte ve bu yapılar protein olarak üretilebilmektedir. Bu aşamalarda vektör davranışını, vektörün içinde bulunduğu konakçı ile ilişkisini belirlemektedir.

2.5.4 Biopanning İşlemi

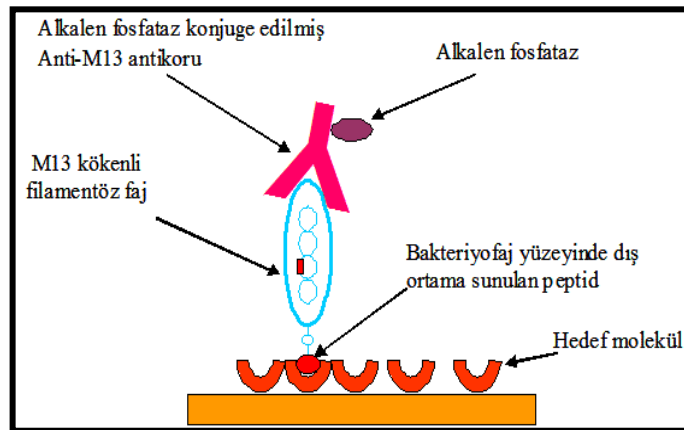
Faj yada fajmit üzerinde eksprese edilen kütüphane içerisinde hedef molekül ile konformasyonel olarak en iyi ilişkiyi kuran yapının seçilmesi için biopanning denilen tarama yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde hedef molekül bir matrikse bağlanmakta ve yüzeyinde farklı konformasyonel yapıları taşıyan filamentöz fajlar bu yapılar ile karşılaştırılmaktadır. Karşılaştırılma işlemi sonrası konformasyonel olarak uyum sağlamayan yapılar ortamdan yıkama işlemi ile uzaklaştırılmakta ve hedef moleküle bağlanan fajlar ise konakçı bakteri yardımıyla çoğaltılmaktadır. Biopanning işlemi üç veya daha fazla tekrarlanarak sonuçta uygun yapıyı taşıyan fajların sayıca arttırılması sağlanmaktadır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Biopanning işlemi (Müllen 2006)

2.5.5 Faj Eliza

Biopanning sonrasında elde edilen klonlardan hangisinin hedef molekül ile etkileşiminin incelenmesi ise, faj ELİZA olarak adlandırılan yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntemde biopanning sonrasında elde edilen klonların her birinden ayrı ayrı filamentöz faj üretimi yapıldıktan sonra bu fajlar ELİZA kuyularında hedef molekül ile karşılaştırılmaktadır. Hedef moleküle bağlanmayan fajlar yıkandıktan sonra ortama filamentöz faja spesifik bir antikor (anti-M13 antikor) ile konjuge halde enzim (alkalen fosfataz) ilave edilmektedir (Şekil 2.17). Bağlanmayan konjugat yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Tekrarlanan yıkama işlemlerinden sonra anti-M13 enzim konjugatı ile reaksiyona girecek enzim substratı ortama ilave edilmektedir. Oluşan renk reaksiyonu sonucu ile hedef molekülü algılayan yapıyı üzerinde taşıyan fajlar saptanmaktadır (Sidhu 2001).



Şekil 2.17 Faj Eliza yöntemi

3. MATERYAL ve METOD

Tez çalışmamızda, yapay peptid kütüphaneleri yaklaşımı kullanılarak HbA₂, HbS ve BSA hedeflerine karşı çalışma yapılmıştır. Biopanning işlemlerinde ilgili hedefleri algılayan 12-mer lineer ve 7-mer siklik yapay peptid kütüphaneleri kullanılmıştır. Biopanning sonrası elde edilen klonlardan hangisinin hedef moleküle karşı ilginliğinin yüksek olduğu faj eliza ile belirlenmiştir. Faj-ELİZA yöntemindeki izleme antifaj-HRP (*Horseradish peroxidase*) antikoru ile gerçekleştirilmiştir. HbA₂ ve HbS molekülüne ilginliği olan algılayıcı fajların Peptid dizileri BECKMAN CEQ™8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak belirlenmiştir.

3.1. Yapay Peptid Kütüphaneleri

Yapay peptid kütüphaneleri olarak 12-mer lineer (Ph.D.-12™) ve 7-mer siklik (Ph.D.-C7C™) faj kütüphanesi kullanılmıştır. Her iki faj kütüphanesinde de 12-mer ve 7-mer'lik Peptid dizileri M13 filamentöz fajın pIII minör kılıf proteini ile eksprese edilmektedir. 12-mer lineer kütüphane başlangıç ve bitiş noktalarında glisin ve serin aminoasitlerini içermektedir. 7-mer siklik kütüphane diğer kütüphanelerden farklı olarak başlangıç ve bitiş noktalarında sistein aminoasitlerini içermektedir. Başlangıç ve bitiş noktalarındaki sistein aminoasitleri disülfid köprüsü oluşturarak ilgili peptide siklik yapı özelliği kazandırmaktadır.

3.2 Biopanning İşlemi

Yapay peptid kütüphaneleri ile elde edilen yapılardan hedef molekül ile konformasyonel olarak en iyi ilişkiyi kuran yapının seçilmesi için biopanning olarak tanımlanan tarama yönteminde hedef molekül immün tüp yüzeyine adsorbe edilmektedir. Hedef moleküller 12-mer lineer kütüphane için HbA₂, 7-mer siklik kütüphane için HbS molekülü olarak belirlendi. Yüzeyinde farklı konformasyonel yapıları taşıyan filamentöz faj (M13) bu hedef moleküller ile karşılaştırılmaktadır. Karşılaştırılma işlemi sonrası konformasyonel olarak uyum sağlamayan yapılar

ortamdan yıkama işlemi ile uzaklaştırılmaktadır Biopanning işlemi üç veya daha fazla tekrarlanarak sonuçta uygun yapıyı taşıyan fajların sayıca arttırılması sağlanmaktadır.

Birinci Gün;

1. Hedef molekül 0.1 M NaHCO₃ içinde 100 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. 200 µL hacimde immün tüp içine koyulup kaplama yapıldı.
2. İmmün tüp +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

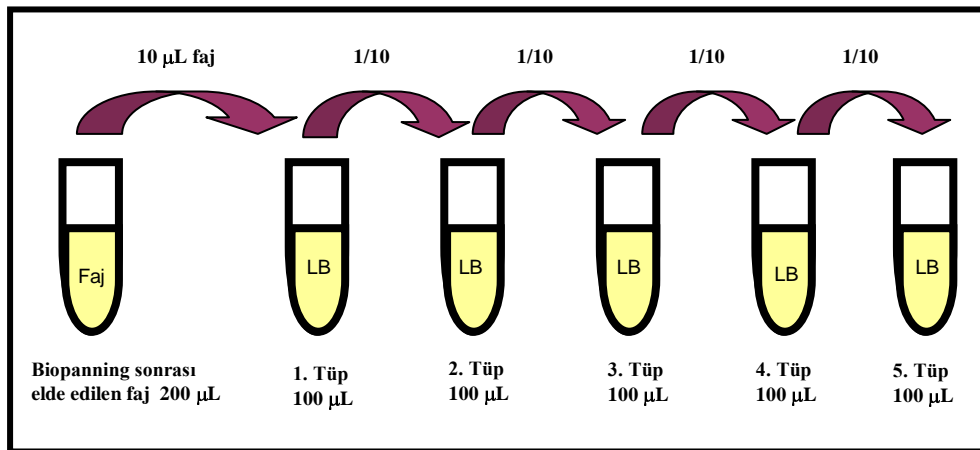
İkinci Gün;

3. İmmün tüp içindeki kaplama solüsyonu dököldü, 200 µL bloklama tamponu koyuldu, + 4 °C'de en az 1 saat inkübe edildi.
4. 10 mL LB ortamına ER2738 bakteri ekildi. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de (OD₆₀₀ 0.500) inkübe edildi.
5. 2 saatlik inkübasyondan sonra bloklama tamponu dököldü, immün tüp 6 kez TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkandı.
6. Ph.D.-12™ orijinal peptid kütüphaneden 10 µL (2x10¹³ pfu/ mL) alınıp 200 µL TBST içinde immün tüpün içine koyuldu.
7. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
8. 1 saatlik inkübasyondan sonra immün tüp içindeki TBST+faj içeren 200 µL solüsyon dökölerek hedef moleküle bağlanmayan fajlar ortamdan uzaklaştırıldı.
9. İmmün tüp 10 kez TBST ile yıkandı.
10. Bağlanan fajların geri kazanımı için immün tüp içine 200 µL 0.2M Glisin-HCL (pH 2.2) koyulup 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. 10 dakika bekletildikten sonra 200 µL olan 0.2 M Glisin-HCL (pH 2.2) içeriği temiz bir ependorf tüpe alınıp üzerine nötrleşme için 150 µL 1 M Tris-HCL eklendi.
12. Elde edilen fajlar isimlendirilerek bir sonraki biopanning işlemi için +4 °C'de saklandı.

3.3 Faj Titrasyonu

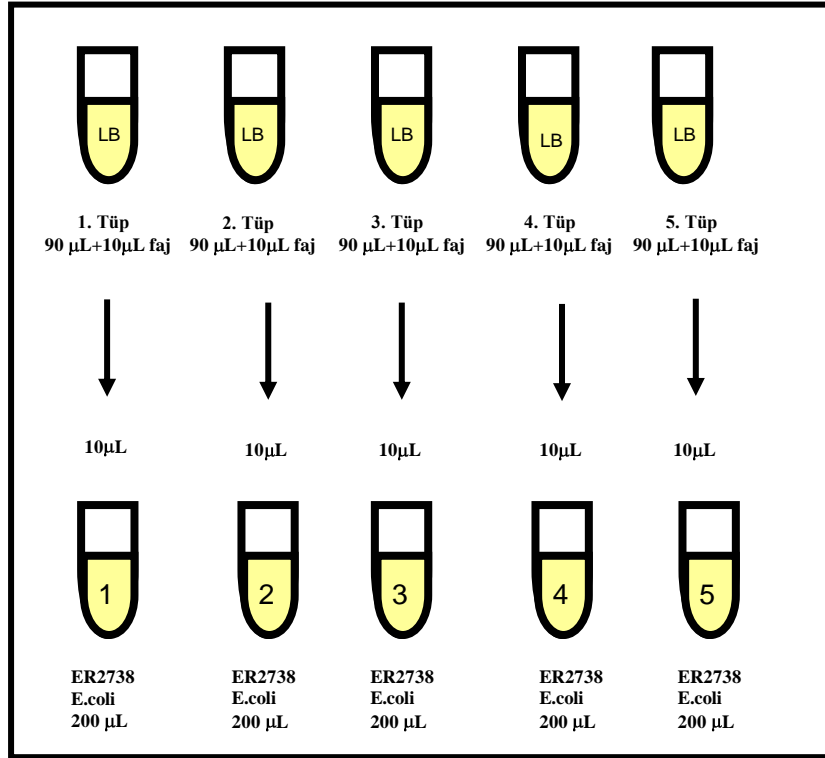
Biopanning sonrası elde edilen faj miktarını belirlemek için faj stoğuna seri dilüsyon uygulanmaktadır (Şekil 3.1). Dilüsyon içerikleri filamentöz faj (M13) konakçısı olan ER2738 bakteri soyu ile inkübe edilmektedir (Şekil 3.2). İnkübasyon sonrası filamentöz faj ve konakçısı IPTG/Xgal içeren petrilere dökülür ve gece boyu inkübasyona bırakılmaktadır. IPTG/Xgal içeriği konakçısını enfekte eden faj plaklarının petri üzerinde mavi renk oluşturup izlenmesini sağlamaktadır (Şekil 3.3). Titrasyon sonucunda son petrideki faj plakları sayılıp dilüsyon faktörleri ile hesaplanarak stok faj miktarı belirlenmektedir.

1. LB/IPTG/Xgal içeren +4 °C'de tutulan petriler 37°C'de faj titrasyonu için uygun sıcaklığa getirildi.
2. Üst agaroz mikrodalgada eritilip 5 mL olarak steril cam tüplere dağıtıldı. Daha sonra 45°C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirildi
3. 10 mL LB ortamına ekilen bakteri (ER2738) 200 µL olarak ependorf tüplere dağıtıldı.
4. Biopanning sonrası elde edilen 200µL faj içeren tüpten 10µL alınarak 1/10 seri dilüsyon yapıldı.



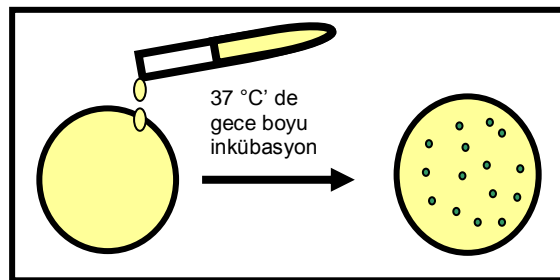
Şekil 3.1 Faj stoğunun seri dilüsyonu

5. Dilüsyon tüplerinden 10 µL alınarak 200 µL bakteri (ER2738) içeren tüp içine koyulup 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.



Şekil 3.2 Dilüsyon sonrası fajların ER2738 (E.coli) ile inkübasyonu

6. İnkübasyon sonrası her bir tüp içeriğinin tümü 5 mL 45°C'de bekleyen erimiş halde üst agaroz içeren tüp içine pipetlendi.
7. Tüp hafifçe çalkalanıp LB/IPTG/Xgal içeren petriye döküldü. Üst agaroz petri üzerini kaplayacak şekilde yayıldı.



Şekil 3.3 LB/IPTG/Xgal içeren petride gece boyu inkübasyon

8. Oda sıcaklığında 30 dakika üst agarozun kuruması için bekletildi.
9. Petriler ters çevrilip 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.4 Faj oğaltımı

Seçim işlemine alınacak olan yapay peptid kütüphanesi 10^{13} pfu/mL derişimde olmalıdır. Bu nedenle biopanning çıkışında elde edilen fajlar titrasyon ile belirlenmekte ve bir sonraki seçim işlemine alınabilmeleri için oğaltırarak 10^{13} pfu/mL değerine getirilmeleri gerekmektedir.

1. Titrasyon sonrası petriyelerdeki faj plakları sayıldı. Biopanning sonrası elde edilen faj sayısı hesaplandı.
2. 20 mL LB ortamına bakteri (ER2738) faj çoğaltımı için ekildi. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de erken log evreye gelene kadar ($OD_{600} \sim 0.200$) inkübe edildi.
3. Fajlarının tamamı ($OD_{600} \sim 0.200$) bakteri içeren 20 mL LB ortamına aktarıldı. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de 5 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası 20 mL kültürün tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı.
5. 6000 rcf 10 dakika santrifüj yapıldı.
6. Üst faz steril falcon tüpe alınarak (üst fazın $\sim \%80$ ’i) üzerine 1/6 oranında PEG/NaCl eklenerek +4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
7. +4 °C’de gece boyu inkübasyon sonrası falkon tüp 9000 rcf’te 15 dakika santrifüj edildi.
8. Üst faz atıldı. Pellet 1 mL TBS ile özölüp ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 1/6 oranında PEG/NaCl eklenerek buzda 1 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrası 9000 rcf’te 10 dakika santrifüjlendi. Üst faz atılarak pellet üzerine 200 μ L TBS, % 0.02 NaN_3 eklenip pellet çözüldü.
10. Elde edilen amplifiye olmuş faj, stok olarak adlandırıldı.

3.5 Faj Klonlarının oğaltımı

Titrasyon sonrası petri üzerindeki faj plakları sayılarak biopanning sonrası elde edilen faj miktarı hesaplanmaktadır. Elde edilen faj plaklarının faj eliza ve DNA izolasyonunda kullanılabilmeleri için yeterli miktarda olmaları gerekmektedir. Bu nedenle faj amplifikasyonunda olduğu gibi konakçı hücre olarak ER2738 E. coli soyu kullanılmaktadır.

1. Titrasyon sonrası petrileredeki faj plakları sayıldı.
2. 20 mL LB ortamına bakteri (ER2738) faj plak çoğaltımı için ekildi. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de erken log evreye gelene kadar ($OD_{600} \sim 0.200$) inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası, bakteri (ER2738) içeren 20 mL LB ortamı 1 mL'lik hacimlerde steril cam tüplere dağıtıldı.
4. Petrileredeki plaklar steril tip ile toplanıp her tüpe bir plak olacak şekilde bakteri (ER2738) içeren 1 mL hacimde LB ortamına koyuldu.
5. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 5 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası 1 mL içeriğin tamamı steril ependorf tüpe boşaltıldı.
7. 9000 rcf 10 dakika santrifüj yapıldı.
8. Üst fazın 800 μ L'si steril ependorf tüpe alınıp 500 μ L'si DNA izolasyonu, 300 μ L'si faj eliza için ayrıldı.

3.6 Faj Eliza

Biopanning sonrası elde edilen klonlardan hangisinin hedef moleküle karşı ilginliğinin yüksek olduğu faj eliza ile belirlenmiştir. Faj-ELİZA yöntemindeki izleme antifaj-HRP (*Horseradish peroxidase*) antikoru ile 415 nm dalga boyunda eliza okuyucuda gerçekleştirilmiştir.

1. Hedef molekül 0.1 M NaHCO₃ içinde 100 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. 50 µL hacimde eliza plate kuyularına koyulup kaplama yapıldı.
2. Eliza plate +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
3. Eliza plate içindeki kaplama solüsyonu döküldü, 50 µL bloklama tamponu koyuldu, + 4 °C'de en az 1 saat inkübe edildi.
4. 1 saatlik inkübasyondan sonra bloklama tamponu döküldü, kuyular 6 kez TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkandı.
5. Amplifiye edilmiş faj stoğundan 10 µL (2×10^{13} pfu/ mL) alınıp 50 µL TBST içinde kuyu içine koyuldu.
6. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. 1 saatlik inkübasyondan sonra kuyular 6 kez TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkandı.
8. HRP- konjugatlı anti-M13 antikoru 1:5,000 oranında dilüe edilip 50 µL hacimde kuyulara dağıtıldı.
9. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
10. 1 saatlik inkübasyondan sonra kuyular 6 kez TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkandı.
11. HRP substrat solüsyonu hazırlanıp renk reaksiyonu oluşunca 415 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi.

3.7 Faj DNA İzolasyonu

Hedef molekül ile fajın molekül sel etkileşimi Faj Eliza reaksiyonunda gözlenmektedir. Faj Eliza sonuçları doğrultusunda elde edilen verilerle hangi faj klonunun hedef molekül ile etkileşiminin yüksek olduğu belirlenmektedir. Faj klonu yüzeyinde yer alan peptid dizisini DNA dizi analizi yöntemi ile belirlemek için faj DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. Faj plak çoğaltımı sonrası ayrılan 500 µL süpernatan üzerine 200 µL PEG/NaCl eklenip karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
2. 12000 rpm'de 10 dk santrifüjlenip süpernatan atıldı.
3. Pellet 100 µL Iodide buffer ile çözüldü. Üzerine 250 µL saf alkol eklendi.
4. 12000 rpm'de 10 dk santrifüjlenip süpernatan atıldı.
5. Pellet %70'lik alkol ile yıkandı.
6. Vakum altında kurutulan pellet 30 µL steril suda çözüldü.

3.8 Kullanılan Çözeltiler:

- **LB Ortamı:**

10 g Bacto-Tryptone

5 g Yeast extract

5 g NaCl

100 µL 10 N NaOH

Otoklavlanıp, oda sıcaklığında saklanır.

- **LB – Agar :**

1 L LB ortamı + 15 g Agar

Otoklavlanıp, petrilere dökülür.

- **LB/ IPTG/Xgal:**

1 L LB ortamı + 15 g /L agar.

Otoklavlanıp, sıcaklığı 70 C'nin altına düştüğü zaman 1mL IPTG/Xgal eklenip karıştırılır. + 4 °C'de karanlıkta saklanır.

- **Üst Agaroz:**
10 g Bacto-Tryptone
5 g yeast extract
5 g NaCl
1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
7 g agaroz
Otoklavlanıp, 50 mL olarak bölünür. Oda sıcaklığında katı halde saklanır.
- **Bloklama Tamponu:**
0.1 M $NaHCO_3$ (pH 8.6)
5 mg/mL BSA
% 0.02 NaN_3
Steril filtre edilip, +4 °C'de saklanır.
- **0.2 M Glisin-HCL:**
1,50 g Glisin
100 mL steril saf suda çözülür (pH 2.2)
Oda sıcaklığında saklanır
- **TBS:**
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
150 mM NaCl
Otoklavlanıp, oda sıcaklığında saklanır.
- **TBS-T:**
1 L TBS
% 0,1 Tween-20 (v/v)
Oda sıcaklığında saklanır.
- **PEG/NaCl:**
% 20 (w/v) polyethylene glycol-8000
2.5 M NaCl
Otoklavlanıp, oda sıcaklığında saklanır.

- **Na Sitrata:**
0,75 g Na Sitrata
50 mL steril saf suda özölür (pH 4.0)
Steril filtre edilip, +4 °C'de saklanır.
- **IPTG/Xgal**
0,25 g IPTG
0,20 g Xgal
1 mL DMF içinde özölür.
- 20 °C'de saklanır.
- **Iodide Buffer:**
12 g NaI
0.2 mL 1 M Tris
40 µL 50 mM EDTA
20 mL steril saf suda özölür.
Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

3.9 DNA Dizi Analizi

Hedeflerine iginliği yüksek olan algılayıcı fajların içeriklerindeki Peptid dizileri BECKMAN CEQ™8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak saptanmıştır. DNA dizi analizi reaksiyon karışımı ve uygulama biçimi Tablo 3.2’de, kullanılan geri primerlerin baz dizilimleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

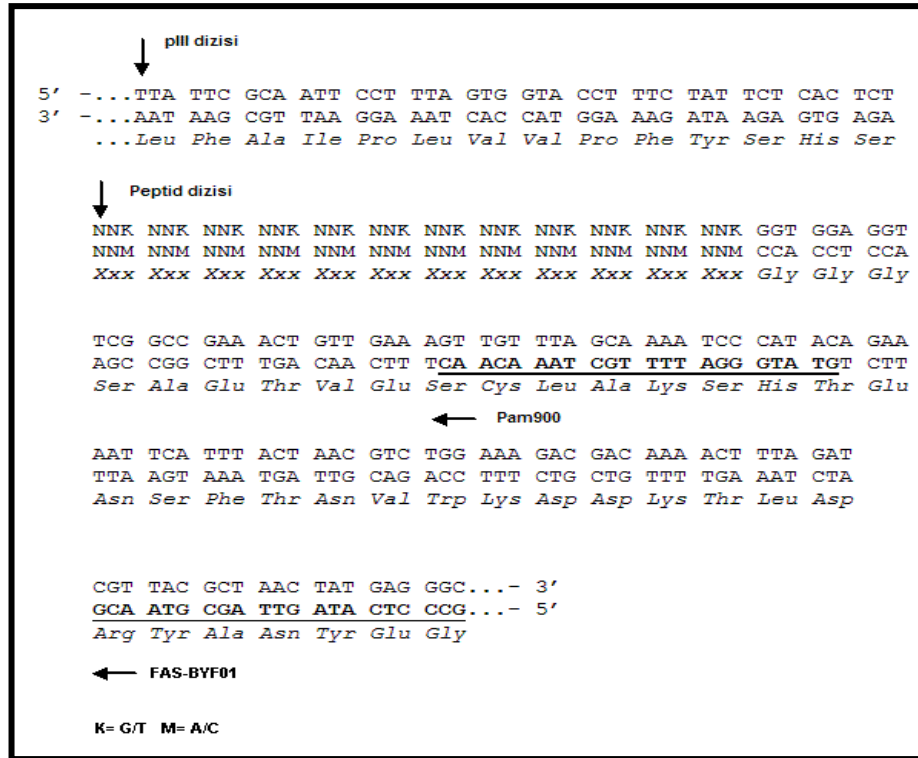
Tablo 3.1 DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer Adı	Primer Dizisi
PAM 900 (22-mer)	5’- GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C-3’
FAS-BYF01 (20-mer)	5’- CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3’

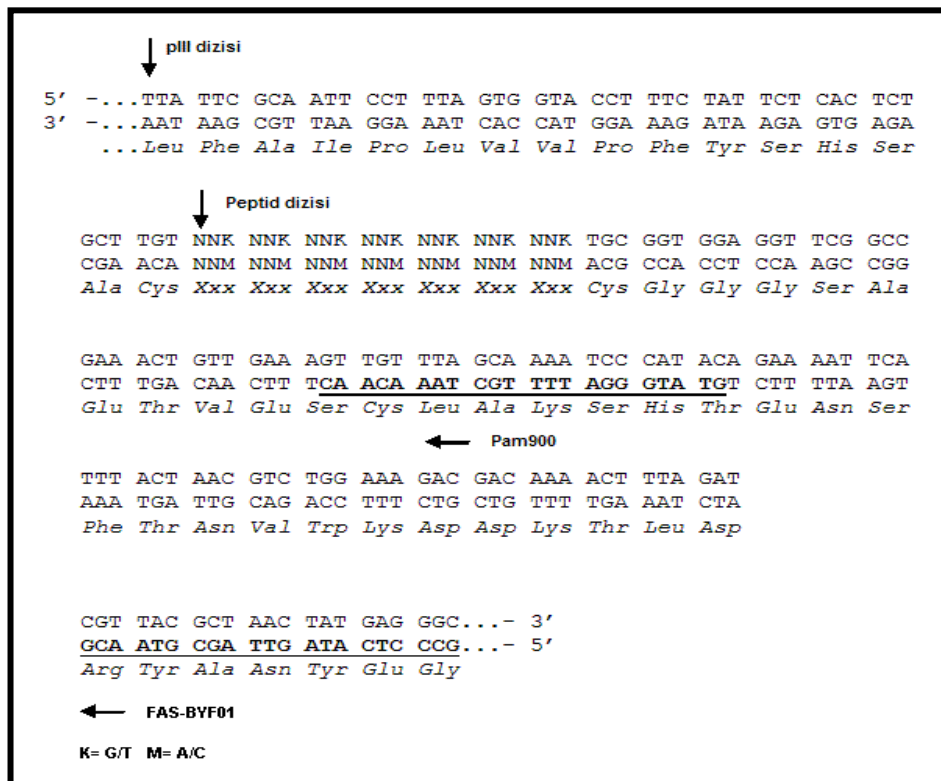
Tablo 3.2 DNA dizi analizi reaksiyon karışımı ve uygulama biçimi.

DNA dizi analizi reaksiyon bileşenleri	Tek tüp için miktar
DNA	5 µl
DTCS mix	10 µl
FAS-BYF01 (1,6 pmol/µl)	2 µl
Steril dH ₂ O	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

Dizi analizi yönteminde, Beckman Coulter Genome Lab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Kiti ile faj genomu içeriklerindeki Peptid dizileri saptanmıştır. Reaksiyon uygulaması 94 °C’de 20 sn, 50 °C’de 20 sn ve 60 °C’de 4 dak olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında Pam 900 ve FAS-BYF01 geri primerleri kullanılmıştır. Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de primerlerin yerleri belirtilmiştir. Bu primerlerin seçimi kullanılan faj kütüphanesine göre belirlenmiştir. Şekil 3.4’te dizi analizi yöntemi ile faj genomundaki dizisinin tanımlanmasına yönelik bir örnek gösterilmiştir.



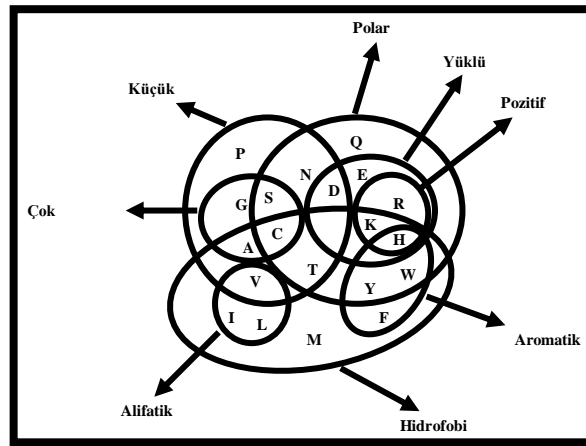
Şekil 3.6 DNA dizi analizinde kullanılan primerlerin konumları ve 12-mer lineer peptid dizisinin başlangıç noktası.



Şekil 3.7 DNA dizi analizinde kullanılan primerlerin konumları ve 7-mer siklik peptid dizisinin başlangıç noktası

3.11. Aminoasit Özelliklerinin Belirlenmesi

HbA₂ ve HbS molekülüne karşı uygulanan biopanningler sonrası elde edilen klonların peptid dizileri belirlendi. Bu peptid dizilerin içerdiği aminoasitlere ait özellikler incelendi. Bu incelemede; amino asitlerin fiziko-kimyasal özelliklerine göre oluşturulan Venn şeması kullanıldı (Şekil 3.8). Bu bağlamda amino asitlerin elde edilen peptid dizilerinde bulunma sıklıkları, hidrofobik, polar, aromatik, özellikleri incelendi (Innis 2004). Amino asitlerin peptid dizilerinde buldukları konuma göre hidrofobisite eğrileri belirlendi (Tablo 3.3).



Şekil 3.8 Aminoasitlerin fizikokimyasal özellikleri (Innis 2004)

Tablo 3.3 Aminoasitlerin hidrofobisite değerleri ve yan zincir lineer yapıları

Aminoasit		Yan Zincir		Hidrofobisite Değeri
İsim	Sembol	Lineer Yapı		
Alanin	Ala	A	CH ₃ -	1.9
Arjinin	Arg	R	HN=C(NH ₂)-NH-(CH ₂) ₃ -	-12.3
Asparajin	Asn	N	H ₂ N-CO-CH ₂ -	-4.8
Aspartik asit	Asp	D	HOOC-CH ₂ -	-9.2
Sistein	Cys	C	HS-CH ₂ -	2.0
Glutamin	Gln	Q	H ₂ N-CO-(CH ₂) ₂ -	-4.1
Glutamik asit	Glu	E	HOOC-(CH ₂) ₂ -	-8.2
Glisin	Gly	G	H-	1.0
Histidin	His	H	NH-CH=N-N-CH=C-CH ₂	-3.0
İzolösin	Ile	I	CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-	3.1
Lösin	Leu	L	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -	2.8
Lizin	Lys	K	H ₂ N-(CH ₂) ₄ -	-8.8
Metionin	Met	M	CH ₃ -S-(CH ₂) ₂ -	3.4
Fenilalanin	Phe	F	Ph-CH ₂ -	3.7
Prolin	Pro	P	NH-(CH ₂) ₃ -CH ₂ H-	-0.2
Serin	Ser	S	HO-CH ₂ -	0.6
Treonin	Thr	T	CH ₃ -OH(OH)-	1.2
Triptofan	Trp	W	Ph-NH-CH=C-CH ₂ -	1.9
Tirozin	Tyr	Y	OH-Ph-CH ₂ -	-0.7
Valin	Val	V	(CH ₃) ₂ -CH-	2.6

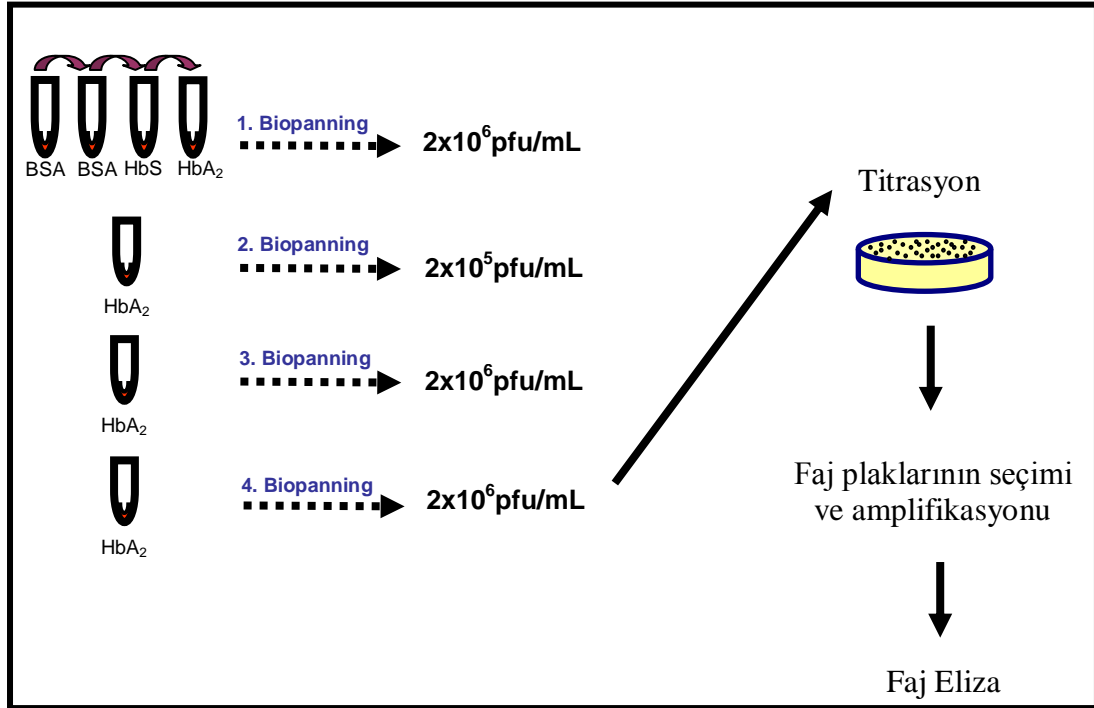
4.BULGULAR

Tez çalışmamızda; yapay Peptid kütüphaneleri yaklaşımı uygulanıp 12-mer lineer ve 7-mer siklik faj kütüphaneleri kullanılarak biopanning işlemleri gerçekleştirildi. HbA₂ molekülüne yönelik 12-mer lineer kütüphane ile ilk olarak dört biopanning daha sonra altı biopanning işlemi gerçekleştirildi. Toplam 72 faj klonu seçildi. HbS molekülüne yönelik 7-mer siklik faj kütüphanesi ile toplam on biopanning işlemi gerçekleştirilip 70 faj klonu seçildi. Elde edilen klonların hedef molekül ile etkileşimleri faj eliza ile saptandı. Klonlara ait peptid dizileri BECKMAN CEQTM8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak belirlendi. Ortak peptid dizisini içeren klonlar gruplanarak sınıflandırıldı. Peptidlerin yapısında bulunan aminoasitler polarite, yük, hidrofobisite özelliklerine göre incelendi.

HbA₂ hedefine karşı 12-mer lineer kütüphane ile toplam dört biopanning işlemi gerçekleştirildi (Tablo 4.1). İlk biopanning işleminde sırasıyla BSA, BSA, HbS ve HbA₂ molekülleri ile immün tüp kaplandı. BSA ile kaplı immün tüp içinde 12-mer lineer fajlar BSA molekülü ile iki kez karşılaştırıldı. Bağlanmayan fajlar alınıp HbS kaplı immün tüp içinde HbS molekülü ile karşılaştırıldı. Tekrar bağlanmayan fajlar alınıp HbA₂ molekülü ile kaplı immün tüp içinde HbA₂ molekülü ile karşılaştırıldı. Biopanning sonrası yıkama işlemlerinde bağlanmayan fajlar ortamdaki uzaklaştırılıp HbA₂ molekülüne bağlanan fajlar toplandı. İkinci, üçüncü ve dördüncü biopanning işleminde hedef molekül HbA₂ ile immün tüp kaplanıp bağlanan fajlar toplandı (Şekil 4.1).

Tablo 4.1 12-mer lineer kütüphane ile HbA₂ molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları

	Hedef molekül	Giriş	Çıkış
1. Biopanning (A2100)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL
2. Biopanning (A2200)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁵ pfu/mL
3. Biopanning (A2300)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL
4. Biopanning (A2400)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL



Şekil 4.1 12-mer lineer kütüphaneye ile HbA₂ molekülüne özgü biopanning işlemi

Dördüncü biopanningde elde edilen 2×10^8 pfu/mL konsantrasyonundaki faj stoğuna seri dilüsyon uygulandı (Şekil 4.1). Seri dilüsyon sonucu 30 faj plağı toplanıp amplifiye edildi. Amplifiye edilen klonların DNA'ları izole edilip fajların peptid dizileri DNA dizi analizi ile belirlendi. DNA dizi analizinde PAM900 ve Fas-BYF01 geri primerleri kullanıldı. Peptid dizilerinin belirlenmesinde gereç ve yöntemler bölümünde yer alan 12-mer lineer kütüphaneye özgü referans dizi kullanıldı. Ortak peptid dizilere sahip faj klonları bir araya getirilerek gruplandırıldı. Şekil 4.2'de 12-mer lineer faj klonuna ait DNA dizi analizi gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları (M= A/C K= G/T)

Klon	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN
A2408	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2409	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2428	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2430	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2431	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2426	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2423	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2419	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2418	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2414	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2437	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2401	CTC	CGC	ATT	CGA	CTT	ATG	ATT	CTG	CGG	ATA	ATA	CGC
A2425	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2424	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2422	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2416	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2402	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2403	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2427	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2429	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2432	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2433	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2407	CGG	CCA	ATC	CCG	AGG	CGA	AGG	AGA	CCC	ATT	ACC	ATG
A2421	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
A2420	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
A2415	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
A2413	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
A2411	AAG	CCG	CAG	CGG	AGC	CGG	CTC	CTC	CTG	AGG	CAT	ATG
A2404	AAG	AGT	AGA	AAG	AAA	ACT	AAT	AGG	ATG	ACG	ATG	CGC
A2406	CCC	ATG	AAG	AGG	CGA	AAG	CCC	CAT	CTT	AGC	CAG	AGT

Tablo 4.3 Faj Klonlarına ait peptid dizileri

Peptid dizi	GCG	TAT	TAT	CCG	CAG	AAT	CAT	AAG	TCG	AAT	GCG	GAG
I. Grup	ala	tyr	tyr	pro	gln	asn	his	lys	ser	asn	ala	glu
	A	Y	Y	P	Q	N	H	K	S	N	A	E
Peptid dizi	CAT	GGT	AAT	GGG	TCT	CCT	TCG	CCT	CGG	GAT	TGG	CCG
II. Grup	his	gly	asn	gly	ser	pro	ser	pro	arg	asp	trp	pro
	H	G	N	G	S	P	S	P	R	D	W	P
Peptid dizi	CTG	CTT	GCG	GAT	ACG	ACG	CAT	CAT	AGG	CCG	TGG	ACT
III. Grup	leu	leu	ala	asp	thr	thr	his	his	arg	pro	trp	thr
	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
Peptid dizi	CAT	ATG	CCT	CAG	GAG	GAG	CCG	GCT	CCG	CTG	CGG	CTT
A2404	his	met	pro	leu	glu	glu	pro	ala	pro	leu	arg	leu
	H	M	P	L	E	E	P	A	P	L	R	L
Peptid dizi	GCG	CAT	CGT	CAT	CCT	ATT	AGT	TTT	CTT	TCT	ACT	CTT
A2406	ala	his	arg	his	pro	ile	ser	phe	leu	ser	thr	leu
	A	H	R	H	P	I	S	F	L	S	T	L
Peptid dizi	ACT	CTG	GCT	AAG	ATG	GGG	CTT	TCG	CCT	CTT	CAT	GGG
A2411	thr	leu	ala	lys	met	gly	leu	ser	pro	leu	his	gly
	T	L	A	K	M	G	L	S	P	L	H	G

Peptid dizileri belirlenen faj klonlarının HbA₂ molekülü ile etkileşimleri faj Eliza yöntemi ile gerçekleştirildi. Eliza kuyuları HbS, HbA₂ ve BSA ile kaplandı. Ölçümler Eliza okuyucuda 415 nm dalga boyunda gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Eliza ölçümleri ardışık olarak üç kez tekrarlandı. Her uygulamada eliza kuyuları hedef moleküller ile tekrar kaplandı.

Tablo 4.4 Faj eliza sonuçları (ilk ölçüm)

Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	HbA ₂	BSA	
I. Grup	0.620	0.993	0.927	0.041
II. Grup	0.246	0.534	0.930	0.036
III.Grup	0.156	0.203	0.480	0.047
A2404	0.057	0.071	0.097	0.042
A2406	0.180	0.354	0.684	0.041
A2411	0.090	0.131	0.544	0.042

Tablo 4.5 Faj eliza sonuçları (ikinci ölçüm)

Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	HbA ₂	BSA	
I. Grup	0.459	1.568	1.477	0.038
II. Grup	1.261	1.538	0.530	0.040
III.Grup	0.870	0.556	0.204	0.039
A2404	0.065	0.057	0.052	0.042
A2406	0.752	1.471	1.095	0.041
A2411	0.196	0.492	0.458	0.038

Tablo 4.6 Faj eliza sonuçları (üçüncü ölçüm)

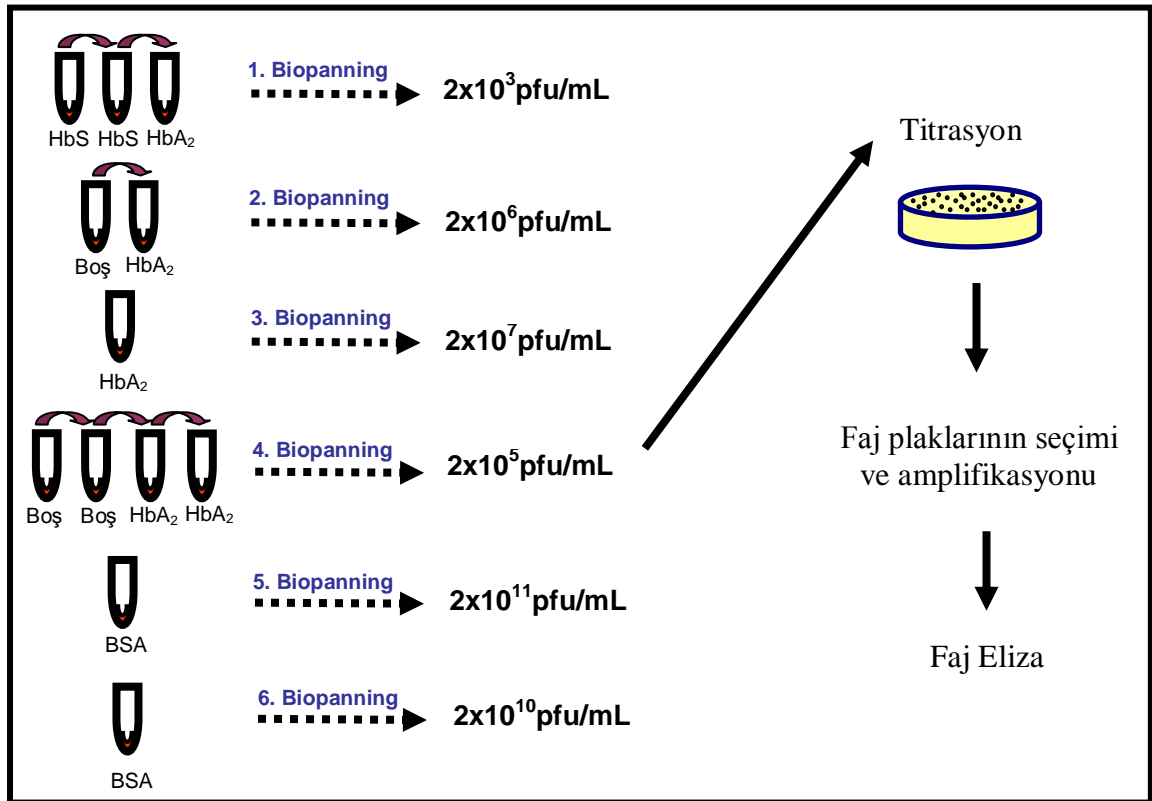
Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	HbA ₂	BSA	
I. Grup	0.486	0.628	0.659	0.038
II. Grup	1.001	0.720	1.475	0.040
III.Grup	0.640	0.642	0.662	0.039
A2404	0.114	0.200	0.109	0.042
A2406	1.291	1.255	1.268	0.041
A2411	0.382	1.085	0.592	0.038

Faj eliza sonuçlarında tekrarlanan ölçümler sonucunda seçilen faj klonlarının BSA moleküle ile etkileşimlerinin daha fazla olduğu saptandı. Biopanning işlemleri tekrar edildi.

Tekrarlanan biopanning işleminde 12-mer lineer kütüphane ile toplam altı biopanning işlemi bloklama solüsyonu kullanılmadan gerçekleştirildi (Tablo 4.7). İlk biopanning işleminde sırasıyla HbS, HbS ve HbA₂ molekülleri ile immün tüp kaplandı. HbS ile kaplı immün tüp içinde 12-mer lineer fajlar HbS molekülü ile iki kez karşılaştırıldı. Bağlanmayan fajlar alınıp HbA₂ molekülü ile kaplı immün tüp içinde HbA₂ molekülü ile karşılaştırıldı. Biopanning sonrası yıkama işlemlerinde bağlanmayan fajlar ortamdaki uzaklaştırılıp HbA₂ molekülüne bağlanan fajlar toplandı. İkinci biopanning işleminde elde edilen fajlar ilk olarak boş tüp ile karşılaştırıldı. Bağlanmayan fajlar alınıp HbA₂ molekülü ile kaplı immün tüp içinde HbA₂ molekülü ile karşılaştırıldı. Üçüncü biopanning işleminde fajlar HbA₂ molekülü ile kaplı immün tüp içinde HbA₂ molekülü ile karşılaştırıldı. Dördüncü biopanning işleminde ise fajlar iki kez boş tüp ile iki kez de HbA₂ molekülü ile kaplı immün tüp içinde HbA₂ molekülü ile karşılaştırıldı. Dördüncü biopanning sonrası yıkama işlemlerinde bağlanmayan fajlar ortamdaki uzaklaştırıldı. HbA₂ molekülüne bağlanan fajlar toplanıp sonrasında ise elde edilen 2X10⁶ pfu/mL konsantrasyonundaki faj stoğuna seri dilüsyon uygulandı (Şekil 4.3). Seri dilüsyon sonrası 20 faj plağı seçilerek amplifikasyonları ve DNA izolasyonları gerçekleştirildi.

Tablo 4.7 12-mer lineer kütüphane ile HbA₂ molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları

	Hedef molekül	Giriş	Çıkış
1. Biopanning (TA2100)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ³ pfu/mL
2. Biopanning (TA2200)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL
3. Biopanning (TA2300)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁷ pfu/mL
4. Biopanning (TA2400)	HbA ₂	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁵ pfu/mL
5. Biopanning (TA2500)	BSA	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ¹¹ pfu/mL
6. Biopanning (TA2600)	BSA	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ¹⁰ pfu/mL



Şekil 4.3 12-mer linear kütüphane ile HbA₂ molekülüne özgü 4. biopanning işlemi

DNA dizi analizi sonuçlarına göre seçilen 12 klonun AGT CCA CGG CCT ATG ATG CGT CGT ATC CGC AAG CAG dizisini, iki klonun CCT CGT AAG CGC ACT CCT CGG AGA CGT ATC CAA CAT dizisini içerdiği saptandı (Tablo 4.8). Elde edilen DNA dizi analizi sonuçlarına göre; AGT CCA CGG CCT ATG ATG CTG CGT ATC CGC AAG CAG dizisini içeren 12 faj klonu dördüncü grup, CCT CGT AAG CGC ACT CCT CGG AGA CGT ATC CAA CAT dizini içeren faj klonları beşinci grup olarak olarak adlandırıldı (Tablo 4.9). Diğer faj klonları ortak dizi içermediği için tek olarak değerlendirildi. Faj klonlarının gruplanmasından sonra peptid dizileri belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.8 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları (M= A/C K= G/T)

klon	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN
TA2401	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2402	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2406	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2407	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2408	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2409	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2412	AGT	AAT	ATC	CTT	ATA	CCA	CGA	CAT	ACG	AGG	CGC	CGT
TA2414	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2415	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2418	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2419	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2420	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2410	CCT	CGT	AAG	CGC	ACT	CCT	CGG	AGA	CGT	ATC	CAA	CAT
TA2411	CCT	CGT	AAG	CGC	ACT	CCT	CGG	AGA	CGT	ATC	CAA	CAT
TA2403	CAC	ACT	AAT	AAG	CGA	AGT	AAT	AGG	ATT	ACT	CAT	AGT
TA2404	AAT	CTG	CTG	CTG	CGT	AGC	ATG	AAG	ATC	CCT	AGG	AAG
TA2405	CAA	CGA	AGA	CAC	CGG	CAG	CGG	CGT	ACG	AGA	ATT	AAT
TA2413	ACG	CGC	AGT	AGG	CCC	ACT	CAC	CTT	CAG	AAC	AGG	ACC
TA2416	ATA	AGC	ACA	CGT	CGG	ACA	ATT	AAC	GTG	CCT	CTC	AGT
TA2417	AGC	AGC	CGT	ACT	CCA	AGT	CAA	AGG	CAG	CGC	ATG	AGA

Tablo 4.9 Faj Klonlarına ait peptid dizileri

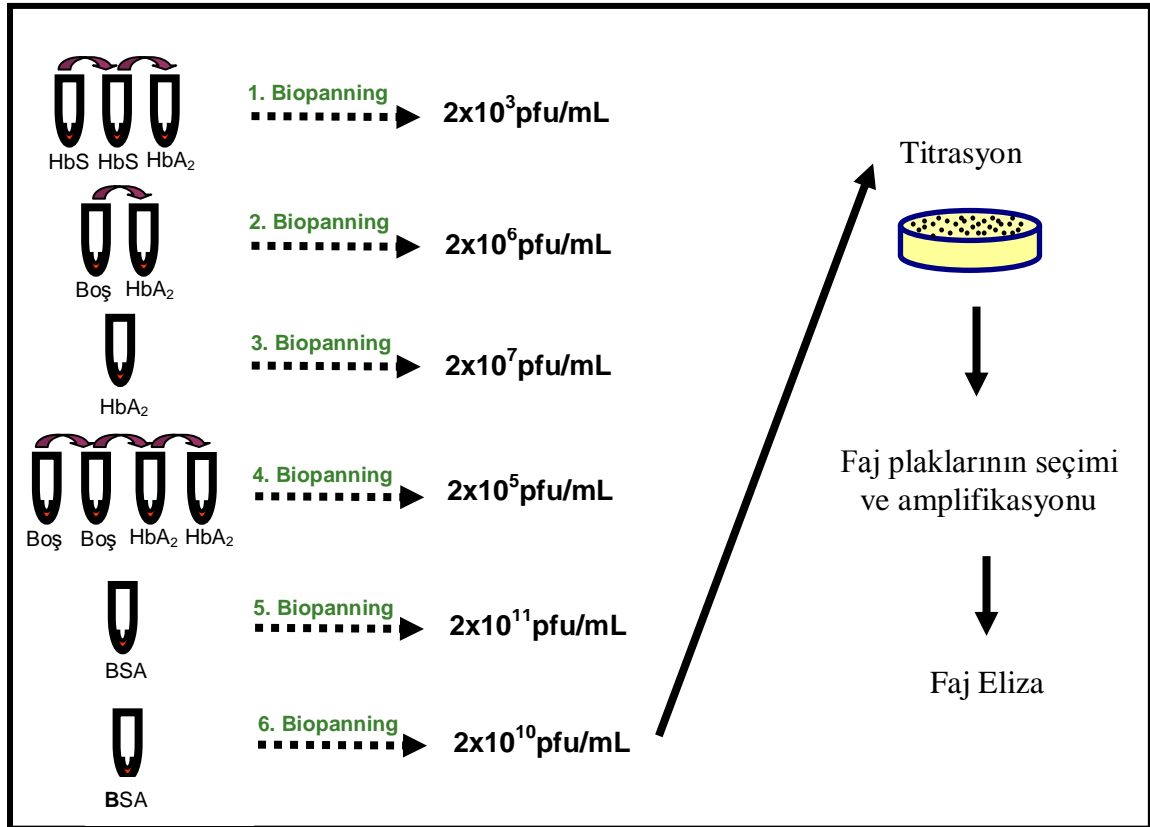
Peptid dizi	CTG	CTT	GCG	GAT	ACG	ACG	CAT	CAT	AGG	CCG	TGG	ACT
IV. Grup	leu	leu	ala	asp	thr	thr	his	his	arg	pro	trp	thr
	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
Peptid dizi	ATG	TTG	GAT	ACG	TCT	CCG	AGG	AGT	GCG	CTT	ACG	AGG
V. Grup	met	leu	asp	thr	ser	pro	arg	ser	ala	leu	thr	arg
	M	L	D	T	S	P	R	S	A	L	T	R
Peptid dizi	ACT	ATG	AGT	AAT	CCT	ATT	ACT	TCG	CTT	ATT	AGT	GTG
TA2403	thr	met	ser	asn	pro	ile	thr	ser	leu	ile	ser	val
	T	M	S	N	P	I	T	S	L	I	S	V
Peptid dizi	CTT	CCT	AGG	GAT	CTT	CAT	GCT	ACG	CAG	CAG	CAG	ATT
TA2404	leu	pro	arg	asp	leu	his	ala	thr	gln	gln	gln	ile
	L	P	R	D	L	H	A	T	Q	Q	Q	I
Peptid dizi	ATT	AAT	TCT	CGT	ACG	CCG	CTG	CCG	GTG	TCT	TCG	TTG
TA2405	ile	asn	ser	arg	thr	pro	leu	pro	val	ser	ser	leu
	I	N	S	R	T	P	L	P	V	S	S	L
Peptid dizi	GGT	CCT	GTT	CTG	AAG	GTG	AGT	GGG	CCT	ACT	GCG	CGT
TA2413	gly	pro	val	leu	lys	val	ser	gly	pro	thr	gly	leu
	G	P	V	L	K	V	S	G	P	T	G	L
Peptid dizi	ACT	GAG	AGG	CAC	GTT	AAT	TGT	CCG	ACG	TGT	GCT	TAT
TA2416	thr	glu	arg	his	val	asn	thr	pro	thr	cys	ala	tyr
	T	E	R	H	V	N	T	P	T	C	A	Y
Peptid dizi	TCT	CAT	GCG	CTG	CCT	TTG	ACT	TGG	AGT	ACG	GCT	GCT
TA2417	ser	his	gly	leu	pro	leu	thr	trp	ser	thr	ala	ala
	S	H	G	L	P	L	T	W	S	T	A	A

Amplifiye edilen faj plaklarının molekül ile etkileşimleri faj eliza ile saptandı. Eliza kuyuları HbS, HbA₂ ve BSA ile kaplandı. Ayrıca kuyulardan bir tanesi boş bırakılarak bloklama yapmadan faj klonunun boş kuyu ile etkileşimi gözlemlendi. Faj eliza yöntemi, seçilen fajların HbA₂ molekülünü algılamadaki farkı görmek için, bloklama solüsyonu kullanılmadan, BSA içeren bloklama solüsyonu ve BSA içermeyen bloklama solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10 Dördüncü biopanning sonrası 20 faj klonuna ait eliza sonuçları

	Blokla olmadan		Blokla (BSA içeren)		Blokla (BSA içermeyen)		Boş	BSA	Kör
	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül			
Klon	HbS	HbA ₂	HbS	HbA ₂	HbS	HbA ₂			
TA2401	0.300	0.428	1.909	1.776	0.344	0.574	0.635	0.975	0.038
TA2402	0.687	0.876	2.103	1.967	0.624	1.574	0.720	1.465	0.038
TA2403	2.072	2.385	2.187	2.457	1.253	1.656	2.575	2.437	0.039
TA2404	1.436	2.127	1.876	2.567	0.408	0.677	2.455	1.976	0.040
TA2405	1.285	2.478	2.389	2.224	1.289	2.814	2.475	1.913	0.040
TA2406	1.533	2.407	1.798	1.892	1.148	2.729	2.541	1.356	0.039
TA2407	0.725	2.791	2.135	2.195	1.529	1.861	2.442	1.989	0.038
TA2408	0.975	0.636	1.700	2.074	1.637	1.762	0.987	1.131	0.038
TA2409	1.290	1.327	2.675	2.876	0.626	0.858	1.080	1.138	0.038
TA2410	0.235	0.328	0.717	0.787	0.482	0.470	0.750	0.552	0.042
TA2411	0.187	0.254	0.320	0.547	0.475	0.556	0.651	0.541	0.039
TA2412	0.178	0.263	0.682	0.709	0.544	0.561	0.746	0.481	0.038
TA2413	0.263	0.272	0.726	0.781	0.533	0.571	0.899	0.502	0.038
TA2414	0.459	0.571	0.655	0.651	0.420	0.492	0.776	0.369	0.038
TA2415	0.796	0.857	0.662	0.769	0.486	0.523	0.730	0.498	0.039
TA2416	0.545	0.465	0.704	0.692	0.522	0.551	0.784	0.600	0.038
TA2417	0.427	0.619	0.715	0.740	0.530	0.529	0.754	0.400	0.038
TA2418	0.821	0.894	0.685	0.730	0.530	0.541	0.695	0.552	0.040
TA2419	0.613	0.736	0.653	0.654	0.504	0.556	0.801	0.549	0.040
TA2420	0.571	0.895	0.714	0.698	0.314	0.585	0.921	0.629	0.043

Beşinci ve altıncı biopanning işleminde immün tüp BSA ile kaplandı. Altıncı biopanning sonrası 2×10^{10} pfu/mL konsantrasyonda elde edilen fajlara seri dilüsyon yapıldı. 20 faj plağı seçilerek amplifiye edildi. Seçilen faj plaklarının amplifikasyonları ve DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilen faj plaklarının molekül ile etkileşimleri faj eliza ile saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 12-mer lineer kütüphane ile HbA₂ molekülüne özgü altıncı biopanning işlemi

DNA dizi analizi sonuçlarına göre seçilen on klonun AGT CCA CGG CCT ATG ATG CTG CTG ATC CGC AAG CAG dizisini, beş klonun ATT AGG CAT CTT ATT ATT CAA CAA CAG CTG ATG CCC AGA dizisini, diğer beş klonun da CGG CGT AGG CAG CTT AAC CCG CAA ATG ACT ATA ATT dizisini içerdiği saptandı (Tablo 4.11). Elde edilen verilere göre; AGT CCA CGG CCT ATG ATG CTG CGT ATC CGC AAG CAG dizisini içeren on faj klonu altıncı grup, ATT AGG CAT CTT ATT ATT CAA CAA CAG CTG ATG CCC AGA dizisini içeren faj klonları yedinci grup, CGG CGT AGG CAG CTT AAC CCG CAA ATG ACT ATA ATT dizisini

içeren beş faj klonu sekizinci grup olarak adlandırıldı (Tablo 4.11). Faj klonlarının gruplanmasından sonra peptid dizileri belirlendi (Tablo 4.12).

Tablo 4.11 Klonlara ait DNA dizi analizi sonuçları (M= A/C K= G/T)

Klon	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN	MNN
TA2601	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2602	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2603	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2604	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2605	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2606	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2615	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2616	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2617	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2618	AGT	CCA	CGG	CCT	ATG	ATG	CGT	CGT	ATC	CGC	AAG	CAG
TA2611	ATT	AGG	CAT	CTT	ATT	CAA	CAA	CAG	CTG	ATG	CCC	AGA
TA2612	ATT	AGG	CAT	CTT	ATT	CAA	CAA	CAG	CTG	ATG	CCC	AGA
TA2613	ATT	AGG	CAT	CTT	ATT	CAA	CAA	CAG	CTG	ATG	CCC	AGA
TA2614	ATT	AGG	CAT	CTT	ATT	CAA	CAA	CAG	CTG	ATG	CCC	AGA
TA2610	ATT	AGG	CAT	CTT	ATT	CAA	CAA	CAG	CTG	ATG	CCC	AGA
TA2607	CGG	CGT	AGG	CAG	CTT	AAC	CCG	CAA	ATG	ACT	ATA	ATT
TA2608	CGG	CGT	AGG	CAG	CTT	AAC	CCG	CAA	ATG	ACT	ATA	ATT
TA2609	CGG	CGT	AGG	CAG	CTT	AAC	CCG	CAA	ATG	ACT	ATA	ATT
TA2619	CGG	CGT	AGG	CAG	CTT	AAC	CCG	CAA	ATG	ACT	ATA	ATT
TA2620	CGG	CGT	AGG	CAG	CTT	AAC	CCG	CAA	ATG	ACT	ATA	ATT

Tablo 4.12 Faj Klonlarına ait peptid dizileri

Peptid dizi	CTG	CTT	GCG	GAT	ACG	ACG	CAT	CAT	AGG	CCG	TGG	ACT
VI. Grup	leu	leu	ala	asp	thr	thr	his	his	arg	pro	trp	thr
	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
Peptid dizi	TCT	GCG	CAT	CAG	CTG	TTG	TTG	AAT	AAG	ATG	CCT	AAT
VII. Grup	ser	gly	his	gln	leu	leu	leu	asn	arg	met	pro	asn
	S	G	H	Q	L	L	L	N	R	M	P	N
Peptid dizi	AAT	TAT	AGT	CAT	TTG	CGG	GTT	AAG	CTG	CCT	ACG	CCG
VIII. Grup	asn	tyr	ser	his	leu	pro	val	arg	leu	pro	thr	pro
	N	Y	S	H	L	P	V	R	L	P	T	P

Faj eliza yöntemi, seçilen fajların HbA₂ molekülünü algılamadaki farkı görmek için bloklamada solüsyonu kullanılmadan, BSA içeren bloklama solüsyonu ve BSA

içermeyen bloklama solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar tablo 4.13’de gösterilmiştir.

Tablo 4.13 Altıncı biopanning sonrası 20 faj klonuna ait eliza sonuçları

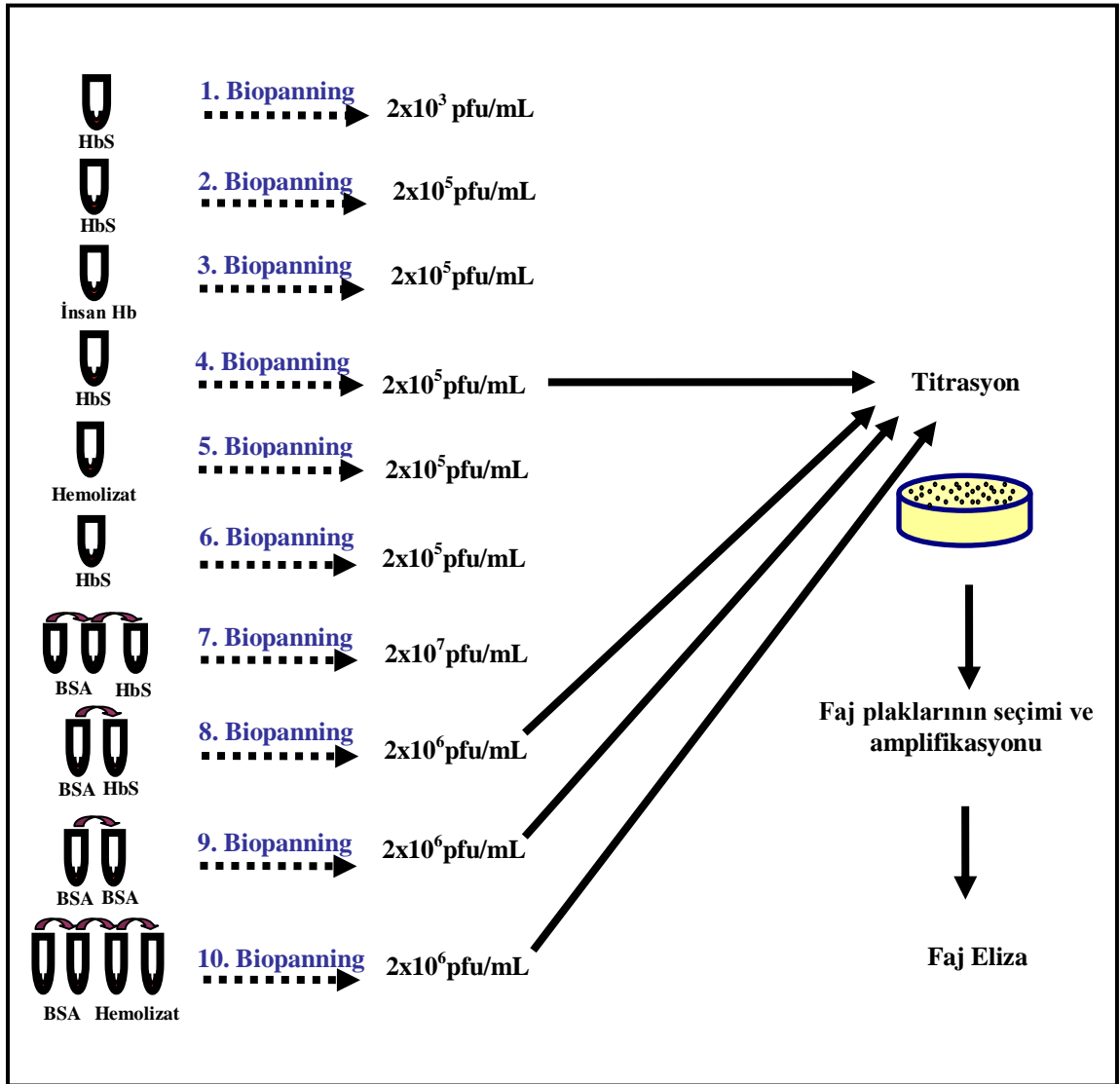
Klon	Bloklama olmadan		Bloklama (BSA içeren)		Bloklama (BSA içermeyenen)		Boş	BSA	Kör
	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül	Hedef Molekül			
TA2601	1.468	1.745	2.290	2.607	1.564	1.937	1.286	2.345	0.038
TA2602	1.896	2.094	2.034	2.347	1.987	2.386	1.882	1.652	0.039
TA2603	1.562	1.876	0.126	0.174	1.739	2.045	0.149	0.111	0.038
TA2604	2.060	2.546	2.347	2.400	2.248	2.734	1.688	1.604	0.038
TA2605	1.346	1.764	1.721	2.083	1.452	2.123	1.570	0.951	0.039
TA2606	0.722	0.739	0.714	0.724	0.611	0.631	0.865	0.623	0.040
TA2607	0.757	0.752	0.624	0.750	0.328	0.408	0.785	0.553	0.040
TA2608	0.563	0.735	0.616	0.725	0.354	0.450	0.786	0.432	0.040
TA2609	0.322	0.551	0.565	0.646	0.367	0.528	0.795	0.438	0.040
TA2610	0.563	0.721	0.682	0.744	0.296	0.425	0.913	0.439	0.042
TA2611	0.799	0.930	0.643	0.695	0.350	0.470	0.738	0.496	0.039
TA2612	0.541	0.730	0.620	0.617	0.307	0.304	0.887	0.395	0.038
TA2613	0.383	0.410	0.607	0.640	0.349	0.337	0.791	0.414	0.038
TA2614	0.598	0.762	0.215	0.194	0.342	0.396	0.819	0.363	0.038
TA2615	0.666	0.856	0.576	0.631	0.378	0.420	0.794	0.482	0.039
TA2616	0.615	0.734	0.696	0.749	0.381	0.404	0.824	0.523	0.038
TA2617	0.631	0.310	0.685	0.711	0.524	0.600	0.937	0.469	0.038
TA2618	0.753	0.815	0.729	0.658	0.568	0.640	0.885	0.448	0.040
TA2619	0.614	0.670	0.526	0.640	0.369	0.343	0.486	0.289	0.040
TA2620	0.298	0.750	0.590	0.701	0.350	0.418	0.606	0.298	0.043

HbS molekülüne yönelik ise 7-mer siklik kütüphane ile 10 biopanning işlemi gerçekleştirildi (Tablo 4.14). Biopanningler sonrası toplam 70 faj klonu elde edildi. Elde edilen faj klonlarının HbS ile etkileşimleri faj eliza ile saptandı. Klonlara ait peptid dizileri BECKMAN CEQTM8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak belirlendi.

Tablo 4.14 7-mer siklik kütüphane ile HbS molekülüne özgü biopanninglerdeki faj miktarları

	Hedef molekül	Giriş	Çıkış
1. Biopanning (B1100)	HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁵ pfu/mL
2. Biopanning (B1200)	HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ³ pfu/mL
3. Biopanning (C1300)	Hb İnsan	2x10 ¹³ pfu/mL	1x10 ¹¹ pfu/mL
4. Biopanning (B1400)	HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL
5. Biopanning (D1500)	Hemolizat	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁷ pfu/mL
6. Biopanning (B1600)	HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁸ pfu/mL
7. Biopanning (BS1200)	BSA, BSA, HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁷ pfu/mL
8. Biopanning (BS1300)	BSA, HbS	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁷ pfu/mL
9. Biopanning (BS1400)	BSA, BSA	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁶ pfu/mL
10. Biopanning (BS1500)	BSA, BSA, Hemolizat, Hemolizat	2x10 ¹³ pfu/mL	2x10 ⁵ pfu/mL

Birinci ve ikinci biopanning işleminde hedef molekül olarak HbS ile immün tüp kaplandı. Biopanning sonrası yıkama işlemlerinde bağlanmayan fajlar ortamdan uzaklaştırılıp HbS molekülüne bağlanan fajlar toplandı. Üçüncü biopanning işleminde hedef molekül olarak insan hemoglobini ile immün tüp kaplanıp ve bağlanmayan fajlar toplandı. Dördüncü biopanning işleminde hedef molekül olarak HbS ile immün tüp kaplandı ve sonrasında elde edilen 2X10⁶ pfu/mL konsantrasyonundaki faj stoğuna seri dilüsyon uygulandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 7-mer siklik kütüphane ile HbS molekülüne özgü on biopanning işlemi

Seri dilüsyon uygulamasında son petriden 10 faj plağı seçildi. Seçilen faj plaklarının DNA izolasyonları ve amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilen faj plaklarının HbS molekülü ile etkileşimlerinin belirlenmesi için faj eliza yöntemi uygulandı. Faj eliza yönteminde eliza kuyuları HbS ve insan hemoglobini ile kaplandı. Faj eliza yönteminde dilüsyon faktörlerinin etkisini gözlemek için HbS ve insan Hb moleküllerine yönelik stok ve $1/10^7$ luk dilüsyon örnekleri hazırlanarak kaplamalar gerçekleştirildi. Elde edilen faj eliza sonuçları tablo 4.15'te gösterilmiştir.

Tablo 4.15 Dördüncü. Biopanning sonrası faj eliza sonuçları

Klon	Hedef Molekül				Kör
	HbS Stok	HbS 1/10 dilüe	Hb İnsan Stok	Hb İnsan 1/10 dilüe	
B1411	1.859	0.378	0.408	0.112	0.035
B1412	1.520	0.217	0.511	0.135	0.038
B1413	1.335	0.142	0.252	0.096	0.038
B1414	0.908	0.121	0.301	0.107	0.040
B1415	1.425	0.156	0.450	0.121	0.037
B1416	1.346	0.218	0.578	0.035	0.036
B1417	2.048	0.875	1.366	0.303	0.035
B1418	1.807	0.324	1.016	0.162	0.039
B1419	1.309	0.148	0.523	0.109	0.037
B1420	1.276	0.144	0.384	0.099	0.038

Dördüncü biopanning sonrası faj eliza sonuçları alındıktan sonra beşinci biopanning işlemi hemolizat ile gerçekleştirildi. Biopanning sonrası uygulanan titasyondan sonra faj sayısı 2×10^5 pfu/mL olarak hesaplandı. Altıncı biopanning işlemi HbS molekülüne karşı, yedinci biopanning işlemi BSA ve HbS molekülüne karşı gerçekleştirildi. Beşinci, altıncı ve yedinci biopanning işlemlerinde faj plak seçimi ve faj eliza gerçekleştirilmedi. Sekizinci biopanning işlemi BSA ve HbS molekülüne karşı gerçekleştirildi. Sekizinci biopanning işleminden sonra yapılan titasyonda faj miktarı 2×10^6 pfu/mL olarak hesaplandı. Seri dilüsyon uygulamasında son petriden 10 faj plağı seçildi. Seçilen faj plaklarının DNA izolasyonları ve amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilen faj plaklarının HbS molekülü ile etkileşimlerinin belirlenmesi için faj eliza yöntemi uygulandı. Faj eliza yönteminde eliza kuyuları BSA, HbS ve hemolizat ile kaplandı. Elde edilen faj eliza sonuçları tablo 4.16'da gösterilmiştir.

Tablo 4.16 Sekizinci biopanning sonrası faj eliza sonuçları

Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	Hemolizat	BSA	
BS1301	0.714	0.468	0.794	0.040
BS1302	0.642	0.552	0.614	0.038
BS1303	0.674	0.624	0.607	0.038
BS1304	0.832	0.705	0.699	0.040
BS1305	0.557	0.441	0.476	0.037
BS1306	0.694	0.425	0.679	0.040
BS1307	0.336	0.371	0.491	0.040
BS1308	0.588	0.467	0.635	0.039
BS1309	0.695	0.447	0.727	0.040
BS1310	0.403	0.408	0.555	0.040

Dokuzuncu biopanning işlemi BSA molekülüne karşı gerçekleştirildi. Dokuzuncu biopanning işleminden sonra yapılan titrasyonda faj miktarı 2×10^6 pfu/mL olarak hesaplandı. Seri dilüsyon uygulamasında son petriden 30 faj plağı seçildi. Seçilen faj plaklarının DNA izolasyonları ve amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilen faj plaklarının HbS molekülü ile etkileşimlerinin belirlenmesi için faj eliza yöntemi uygulandı. Faj eliza yönteminde eliza kuyuları BSA, HbS ve hemolizat ile kaplandı. Elde edilen faj eliza sonuçları tablo 4.17 ve tablo 4.18'de gösterilmiştir.

Tablo 4.17 Dokuzuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları

Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	Hemolizat	BSA	
BS1401	0.844	0.764	0.965	0.040
BS1402	0.855	1.000	1.502	0.038
BS1403	0.878	0.785	1.007	0.038
BS1404	0.411	0.316	0.536	0.040
BS1405	1.098	1.114	1.546	0.037
BS1406	0.930	0.908	1.366	0.040
BS1407	0.768	0.735	0.823	0.040
BS1408	0.795	0.651	0.838	0.039
BS1409	0.919	0.609	0.854	0.040
BS1410	1.204	0.982	1.311	0.040
BS1411	0.444	0.410	0.453	0.040
BS1412	0.443	0.384	0.416	0.038
BS1413	0.506	0.509	0.638	0.038
BS1414	0.361	0.359	0.489	0.040
BS1415	0.298	0.274	0.296	0.037
BS1416	0.312	0.286	0.333	0.040
BS1417	0.239	0.244	0.225	0.040
BS1418	0.385	0.395	0.355	0.039
BS1419	0.412	0.409	0.515	0.040
BS1420	0.339	0.371	0.424	0.040

Tablo 4.18 Dokuzuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları

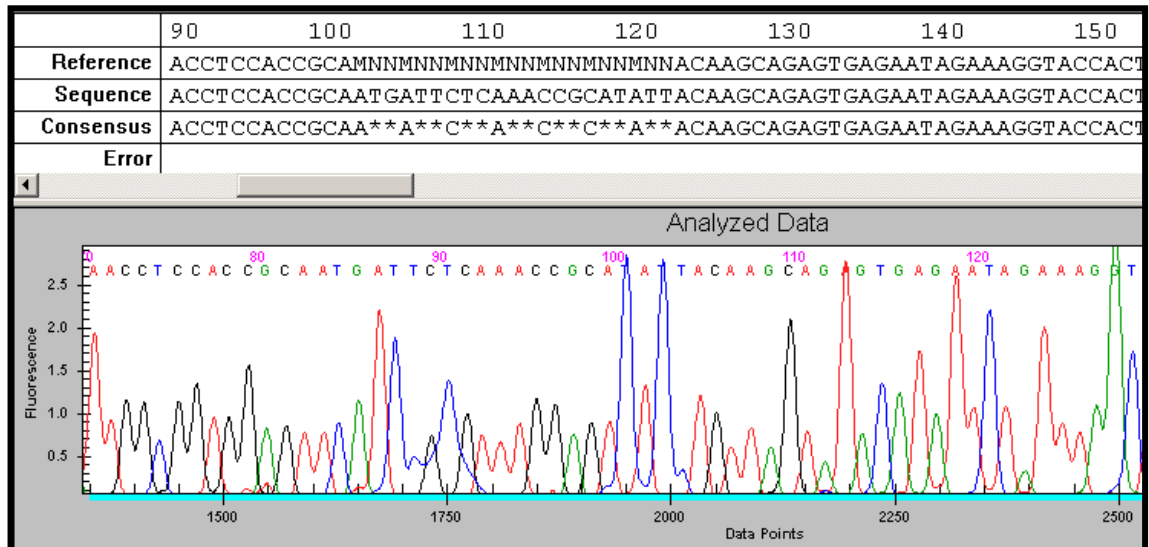
Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	Hemolizat	BSA	
BS1421	0.668	0.595	0.620	0.037
BS1422	0.515	0.626	0.813	0.038
BS1423	0.463	0.500	0.753	0.038
BS1424	0.537	0.530	0.899	0.040
BS1425	0.487	0.488	0.763	0.037
BS1426	0.540	0.520	0.625	0.041
BS1427	0.400	0.448	0.542	0.042
BS1428	0.845	0.672	0.842	0.039
BS1429	0.661	0.564	0.747	0.042
BS1430	0.660	0.668	0.890	0.040

Onuncu biopanning işlemi BSA ve HbS molekülüne karşı gerçekleştirildi. Onuncu biopanning işleminden sonra yapılan titrasyonda faj miktarı 2×10^6 pfu/mL olarak hesaplandı. Seri dilüsyon uygulamasında son petriden on faj plağı seçildi. Seçilen faj plaklarının DNA izolasyonları ve amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilen faj plaklarının HbS molekülü ile etkileşimlerinin belirlenmesi için faj eliza yöntemi uygulandı. Faj eliza yönteminde eliza kuyuları BSA, HbS ve hemolizat ile kaplandı. Elde edilen faj eliza sonuçları tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.19 Onuncu biopanning sonrası faj eliza sonuçları

Klon	Hedef Molekül			Kör
	HbS	Hemolizat	BSA	
BS1501	0.588	0.502	0.532	0.042
BS1502	0.618	0.460	0.516	0.038
BS1503	0.143	0.105	0.137	0.038
BS1504	0.680	0.355	0.408	0.040
BS1505	0.425	0.325	0.428	0.037
BS1506	0.529	0.398	0.520	0.042
BS1507	0.453	0.320	0.385	0.040
BS1508	0.441	0.313	0.501	0.039
BS1509	0.350	0.204	0.283	0.041
BS1510	0.570	0.455	0.541	0.042

HbS molekülüne karşı 7-mer siklik kütüphane ile gerçekleştirilen on biopanning işleminden sonra faj eliza sonuçları değerlendirildi. Elde edilen verilere göre HbS molekülü ile etkileşimi en iyi olan fajların DNA dizi analizi ile peptid dizileri belirlendi (Şekil 4.6). Faj klonlarına ait peptid dizileri tablo 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Faj genomundaki peptid dizisinin Fas-BYF01 geri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması. (M= A/C K= G/T)

Tablo 4.20 Faj Klonlarına ait peptid dizileri

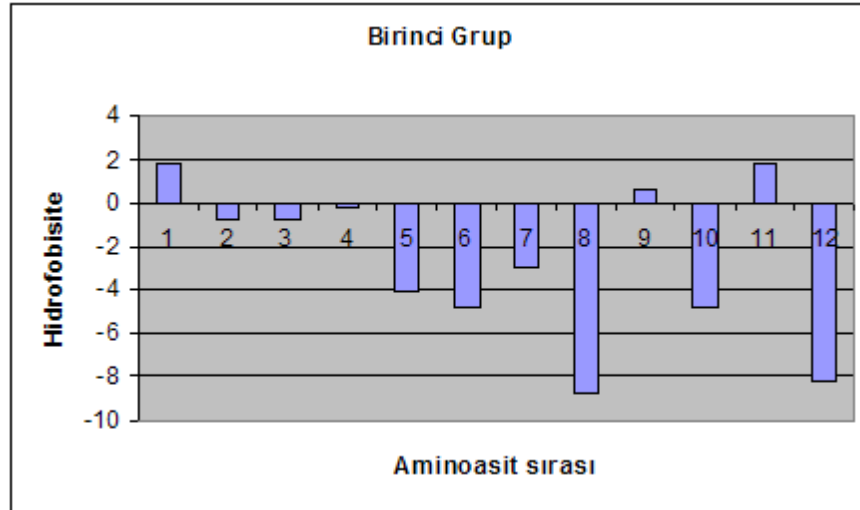
Peptid dizi	GAT	ATT	GCG	CAT	AGT	TGG	TAT
B1411	asp	ile	ala	his	ser	trp	tyr
	D	I	A	H	S	W	Y
Peptid dizi	TGT	GAG	TAT	GAG	ACG	CAG	ACG
B1412	cys	glu	tyr	glu	thr	gln	thr
	C	E	Y	E	T	Q	T
Peptid dizi	CGC	AAT	CTT	ACT	GGT	CAT	CGT
B1413	arg	asn	leu	thr	gly	his	leu
	R	N	L	T	G	H	L
Peptid dizi	CCG	CAG	AAT	ATT	CCT	CAT	AAG
B1416	pro	gln	asn	ile	pro	his	lys
	P	Q	N	I	P	H	K
Peptid dizi	GAG	TTG	GCT	TCT	TGG	AGT	GCG
B1417	glu	leu	ala	ser	trp	ser	ala
	E	L	A	S	W	S	A
Peptid dizi	AAT	ATG	CGG	TTT	GAG	AAT	CAT
BS1409	asn	met	arg	phe	glu	asp	his
	N	M	R	F	E	D	H
Peptid dizi	AAT	ACT	GAT	CTT	AGG	AAT	AAG
BS1410	asn	thr	asp	leu	arg	asn	lys
	N	T	D	L	R	N	K

HbS ve HbA₂ moleküllerine karşı gerçekleştirilen biopanninglerde elde edilen Peptidlerin aminoasit dizileri ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri belirlendi. Buna göre; HbA₂ molekülü için elde edilen tüm faj klonlarına ait peptid dizilerinin aminoasit özellikleri belirlendi (Tablo 4.21). Birinci grup olarak adlandırılan faj klonları AYYPQNHKSNAE aminoasit dizisini içermektedir. Birinci grup aminoasitlerin yerleşim sırası ve her bir aminoaside ait hidrofobisite değeri şekil 4.7’de gösterilmiştir. İkinci grup olarak adlandırılan faj klonları HGNGSPSPRDWP aminoasit dizisini içermektedir. Bu gruba ait aminoasitlerin peptid dizisi içindeki sırası ve hidrofobisite değerleri şekil 4.8’de gösterilmiştir. Üçüncü grup, dördüncü grup ve altıncı grup olarak adlandırılan faj klonlarının farklı biopanning uygulamalarında elde edilmelerine rağmen ortak peptid dizisi içerdiği saptandı. Bu gruplar LLADTTHHRPWT aminoasit dizisini içermektedir. Bu gruplara ait aminoasitlerin peptid dizisi içindeki sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri şekil 4.9’da gösterilmiştir. Beşinci grup olarak adlandırılan faj klonları MLDTSPRSALTR aminoasit dizisini içermektedir. Bu gruba ait

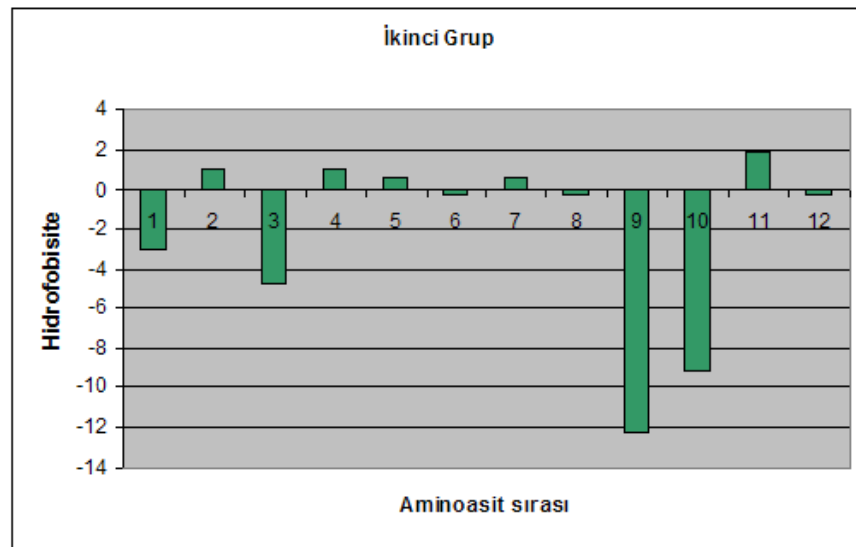
aminoasitlerin sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri şekil 4.10'da gösterilmiştir. Yedinci grup faj klonları SGHQLLLNRMPN, sekizinci grup faj klonları NYSHLPVRLPTP aminoasit dizilerini içermektedir. Şekil 4.11'de yedinci grup faj klonlarına, şekil 4.12'de sekizinci grup faj klonlarına ait aminoasitlerin sırası ve hidrofobisite değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.21 12-mer lineer peptid dizilerine ait aminoasitlerin sırası ve hidrofobisite değerleri

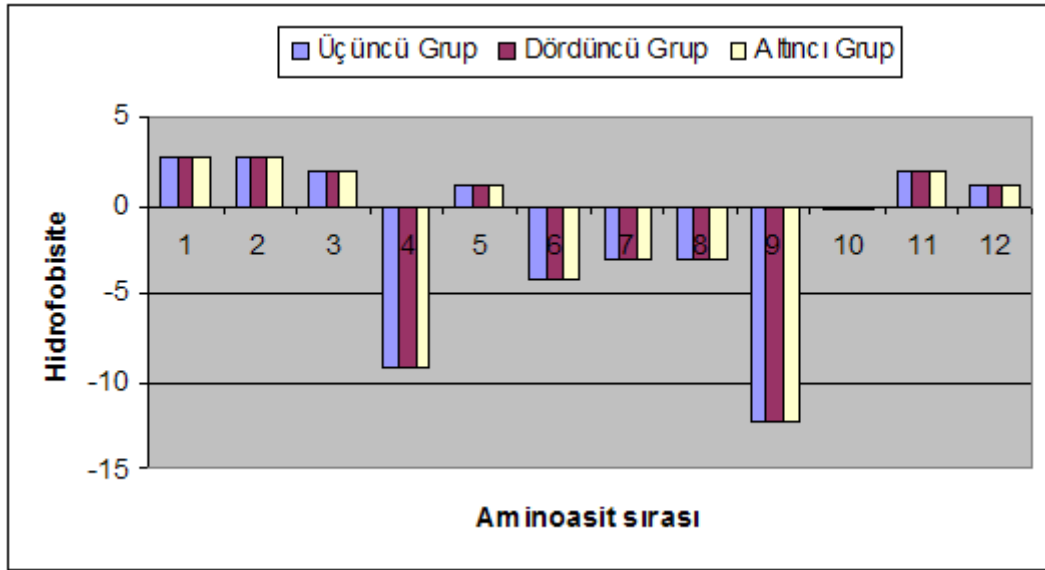
Aminoasit sırası	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Birinci Grup	A	Y	Y	P	Q	N	H	K	S	N	A	E
	1,9	-0,7	-0,7	-0,2	-4,1	-4,8	-3,0	-8,8	0,6	-4,8	1,9	-8,2
İkinci Grup	H	G	N	G	S	P	S	P	R	D	W	P
	-3,0	1,0	-4,8	1,0	0,6	-0,2	0,6	-0,2	-12,3	-9,2	1,9	-0,2
Üçüncü Grup	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
	2,8	2,8	1,9	-9,2	1,2	1,2	-3,0	-3,0	-12,3	-0,2	1,9	1,2
Dördüncü Grup	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
	2,8	2,8	1,9	-9,2	1,2	1,2	-3,0	-3,0	-12,3	-0,2	1,9	1,2
Beşinci Grup	M	L	D	T	S	P	R	S	A	L	T	R
	3,4	2,8	-9,2	1,2	0,6	-0,2	-12,3	0,6	1,9	2,8	1,2	-12,3
Altıncı Grup	L	L	A	D	T	T	H	H	R	P	W	T
	2,8	2,8	1,9	-9,2	1,2	1,2	-3,0	-3,0	-12,3	-0,2	1,9	1,2
Yedinci Grup	S	G	H	Q	L	L	L	N	R	M	P	N
	0,6	1,0	-3,0	-4,1	2,8	2,8	2,8	-4,8	-12,3	3,4	-0,2	-4,8
Sekizinci Grup	N	Y	S	H	L	P	V	R	L	P	T	P
	-4,8	-0,7	0,6	-3,0	2,8	-0,2	2,6	-12,3	2,8	-0,2	1,2	-0,2
A2404	H	M	P	L	E	E	P	A	P	L	R	L
	-3,0	3,4	-0,2	2,8	-8,2	-8,2	-0,2	1,9	-0,2	2,8	-2,3	2,8
A2406	A	H	R	H	P	I	S	F	L	S	T	L
	1,9	-3,0	-2,3	-3,0	-0,2	3,1	0,6	3,7	2,8	0,6	1,2	2,8
A2411	T	L	A	K	M	G	L	S	P	L	H	G
	1,2	2,8	1,9	-8,8	3,4	1,0	2,8	0,6	-0,2	2,8	-3,0	1,0
TA2403	T	M	S	N	P	I	T	S	L	I	S	V
	1,2	3,4	0,6	-4,8	-0,2	3,1	1,2	0,6	2,8	3,1	0,6	2,6
TA2404	L	P	R	D	L	H	A	T	Q	Q	Q	I
	2,8	-0,2	-2,3	-9,2	2,8	-3,0	1,9	1,2	-4,1	-4,1	-4,1	3,1
TA2405	I	N	S	R	T	P	L	P	V	S	S	L
	3,1	-4,8	0,6	-12,3	1,2	-0,2	2,8	-0,2	2,6	0,6	0,6	2,8
TA2413	G	P	V	L	K	V	S	G	P	T	G	L
	1,0	-0,2	2,6	2,8	-8,8	2,6	0,6	1,0	-0,2	1,2	1,0	2,8
TA2416	T	E	R	H	V	N	T	P	T	C	A	Y
	1,2	-8,2	-2,3	-3,0	2,6	-4,8	1,2	-0,2	1,2	2,0	1,9	-0,7
TA2417	S	H	G	L	P	L	T	W	S	T	A	A
	0,6	-3,0	1,0	2,8	-0,2	2,8	1,2	1,9	0,6	1,2	1,9	1,9



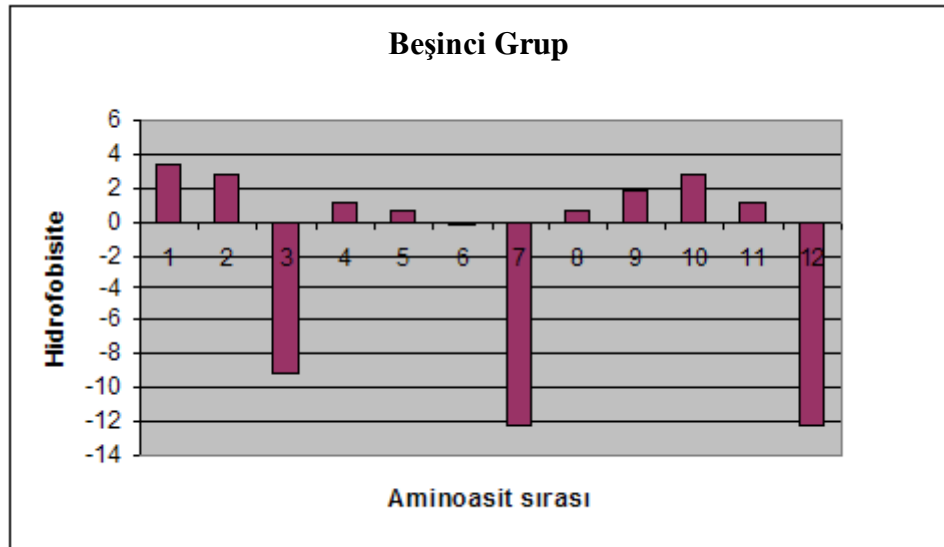
Şekil 4.7 Birinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



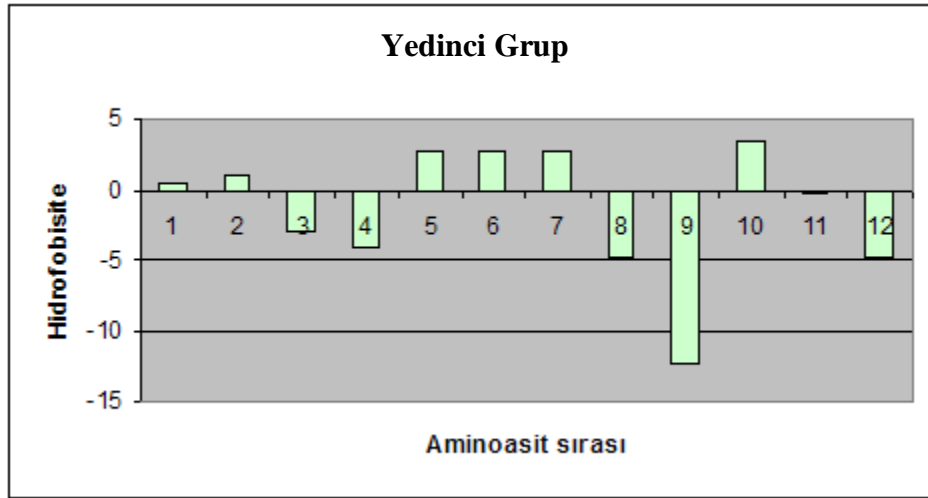
Şekil 4.8 İkinci grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



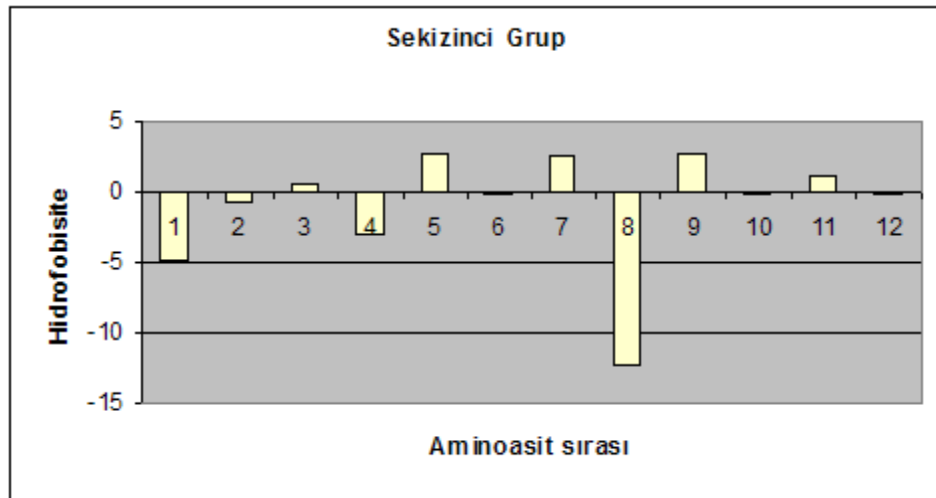
Şekil 4.9 Üçüncü grup, Dördüncü grup ve Altıncı grup faj klonlarına ait aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



Şekil 4.10 Beşinci Grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



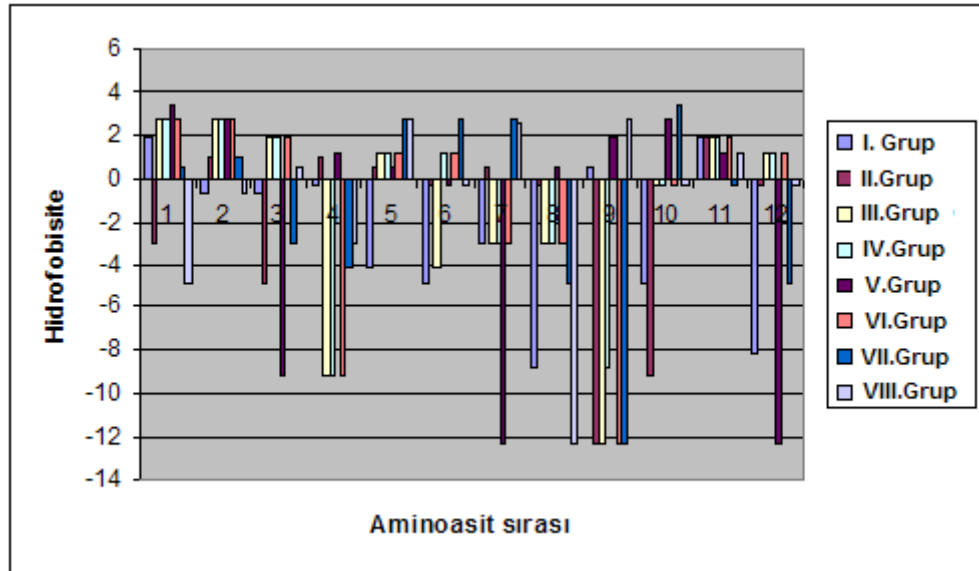
Şekil 4.11 Yedinci Grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



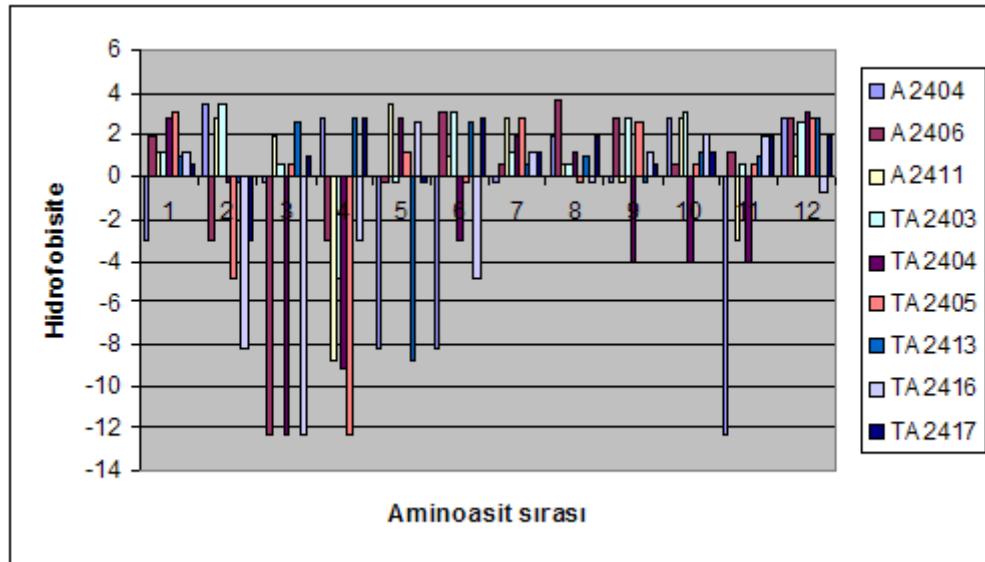
Şekil 4.12 Sekizinci Grup faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri

Tüm gruplar birbirinden bağımsız olarak değerlendirilip daha sonra bir arada olmak üzere tüm grupların aminoasit sıraları ve bu aminoasitlerin hidrofobisite değerleri incelenmiştir (Şekil 4.13). Gruplar içerisinde yer almayan ve biopanninglerde tek klon olarak saptanan faj klonlarının aminoasit dizileri ve bu aminoasitlerin hidrofobisite değerleri şekil 4.14'te gösterilmiştir. Elde edilen verilerde aminoasit dağılımlarının biopanning uygulamalarında oran olarak değişiklik gösterdiği saptandı. Bu farkı

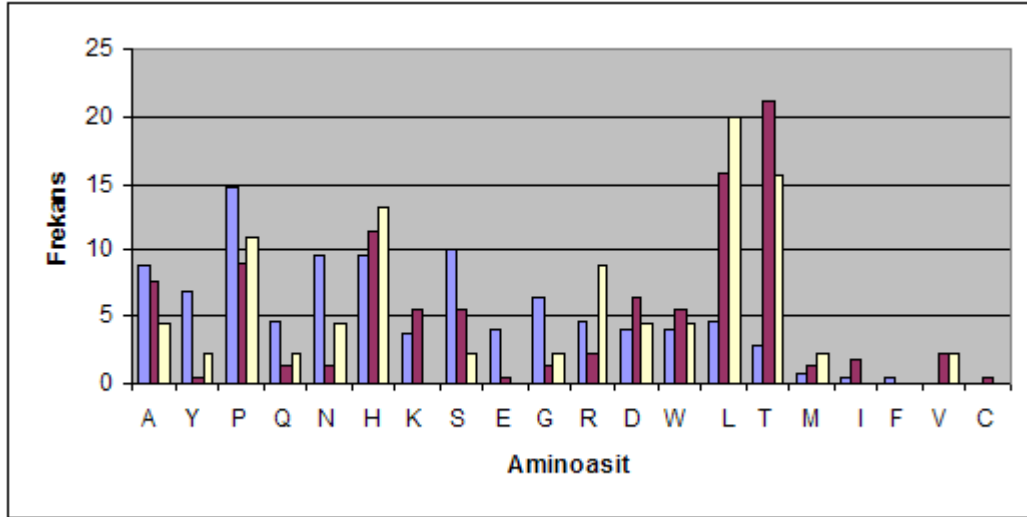
belirlemek için aminoasitlerin frekansları hesaplandı. Şekil 4.15 HbA₂ molekülüne karşı uygulanan tüm biopanninglerde aminoasit frekansının değişimini göstermektedir.



Şekil 4.13 Tüm gruplara ait faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



Şekil 4.14 Tek olarak elde edilen faj klonlarının aminoasit sırası ve aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



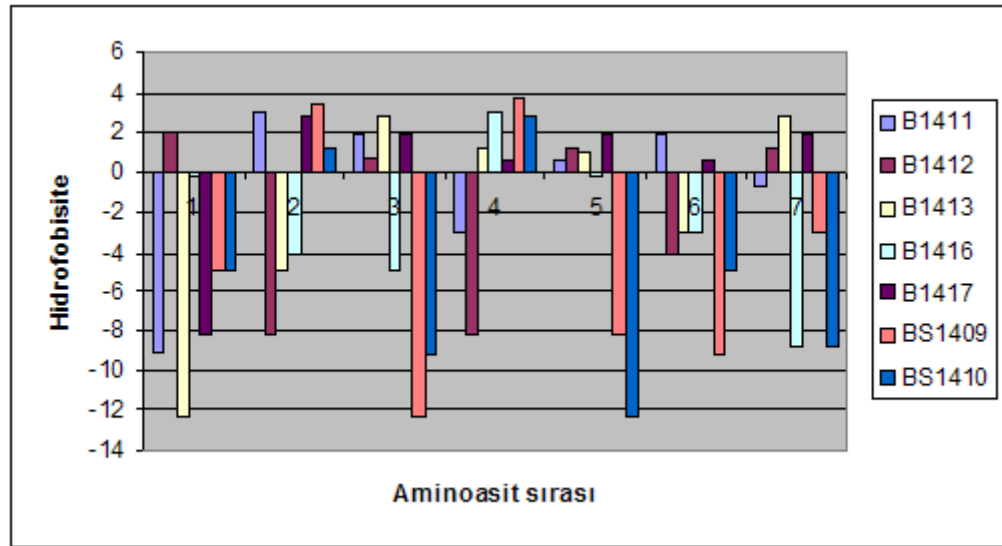
Şekil 4.15 Faj klonlarının aminoasit frekansındaki değişimini

HbS molekülü için elde edilen tüm faj klonlarına ait peptid dizilerinin aminoasit özellikleri de belirlendi (Tablo 4.22). HbS molekülüne karşı gerçekleştirilen biopanning işlemleri sonucunda elde edilen faj klonlarında ortak dizileri içeren peptidler saptanmamıştır. Bu durumda elde edilen faj klonları bir arada değerlendirilmiştir. B1411 faj klonu DIAHSWY, B1412 klonu CEYEQYT, B1413 klonu RNLTGHL, B1416 klonu PQNIPHK, B1417 klonu ELASWSA, BS1409 klonu NMRFEDH, BS1410 klonu NTDLRKN aminoasit dizisini içermektedir. Bu aminoasit dizilerinin peptid içindeki sırası ve hidrofobisite değerleri şekil 4.16’da gösterilmiştir.

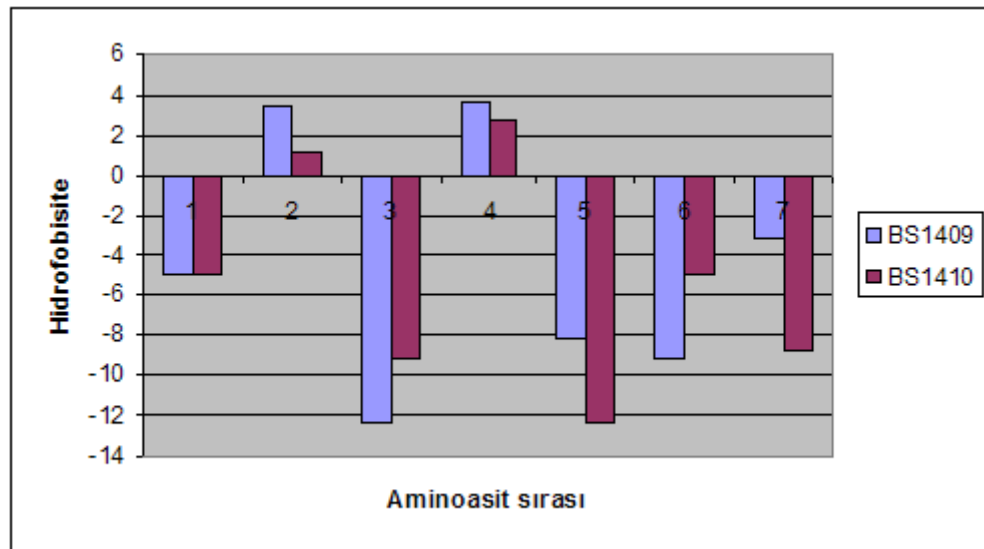
Tablo 4.22 7-mer siklik peptid dizilerine ait aminoasitlerin sırası ve hidrofobisite değerleri

B1411	D	I	A	H	S	W	Y
	-9,2	3,1	1,9	-3,0	0,6	1,9	-0,7
B1412	C	E	Y	E	T	Q	T
	2,0	-8,2	-0,7	-8,2	1,2	-4,1	1,2
B1413	R	N	L	T	G	H	L
	-12,3	-4,8	2,8	1,2	1,0	-3,0	2,8
B1416	P	Q	N	I	P	H	K
	-0,2	-4,1	-4,8	3,1	-0,2	-3,0	-8,8
B1417	E	L	A	S	W	S	A
	-8,2	2,8	1,9	0,6	1,9	0,6	1,9
BS1409	N	M	R	F	E	D	H
	-4,8	3,4	-12,3	3,7	-8,2	-9,2	-3,0
BS1410	N	T	D	L	R	N	K
	-4,8	1,2	-9,2	2,8	-12,3	-4,8	-8,8

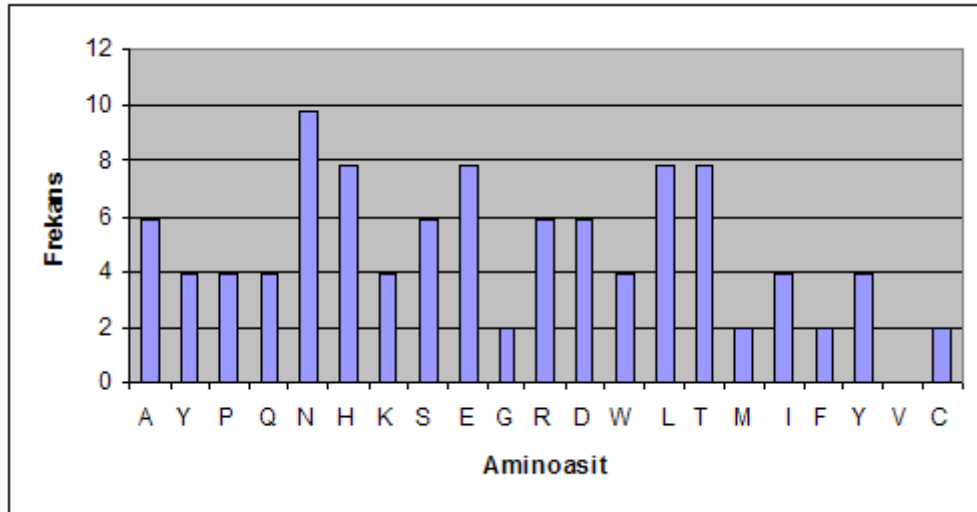
BS1409 klonu NMRFEDH, BS1410 klonu NTDLRKN aminoasit dizisi olarak incelenmiş ve aminoasit dizisinin farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu iki klona ait aminoasitlerin hidrofobisite özellikleri şekil 4.17’de gösterilmiştir. Siklik kütüphane ile elde edilen klonlara ait aminoasitlerin frekanları belirlenmiştir (Şekil 4.18)



Şekil 4.16 Faj klonlarında yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



Şekil 4.17 BS1409 ve BS1410 klonlarında yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerleri



Şekil 4.18 Aminoasitlerin frekansları

5. TARTIŞMA

Talasemiler ve anormal hemoglobinler, gerek ülkemizde ve gerekse de dünyada rastlanan en yaygın kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır (Weatherall 2001, Altay 2002, Akar 2007). Gensel sorun olduğundan yapılabilecek tek girişim, sağlıklı bireylerin doğmasına yönelik biçimde hemoglobinopati kontrol programlarının uygulanabilmesini sağlamaktır. Bu programlardaki temel yaklaşım, özellikle evlilik öncesi dönemde bireylerin molekül olarak kimliklendirilmesinin sağlanması ve olası taşıyıcı evliliklerinde uygulanacak doğum öncesi tanı uygulaması ile sağlıklı bireylerin doğmasına katkıda bulunmaktır. Denizli İl Sağlık Müdürlüğü verilerine göre yöremizdeki beta talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı % 3,5 olarak verilmektedir. Denizli yöresinde evlilik öncesi (premarital) tarama programına dayalı olarak yapılan çalışmalarda Hb-D Los Angeles, Hb-C, Hb-E Saskatoon, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd, Hb-Yaizu, Hb-J-İran, Hb-D-Ouled Rabah ve Hb-Tunis gibi anormal hemoglobin türlerinin varlığı gösterilmiştir (Atalay 2008, Köseler 2006, Köseler 2008, Köseler 2009). Bunlardan Hb-D-Ouled Rabah, Hb-Yaizu ve Hb-Tunis dünyada ikinci, ülkemizde ise ilk kez bildirilen anormal hemoglobin özelliği taşımaktadır (Köseler 2009).

Bu hemoglobin türleri herhangi bir sağlık sorunu yaratmamakla birlikte, evlilik öncesi tarama ve tanımlama çalışmalarında orak hücre anemisine yol açan HbS ile sıklıkla karıştırılabilmektedir. Örneğin yöremizde sıklıkla rastlanan Hb D- Los Angeles ve Hb G- Coughatta' nın alkali ortamdaki elektroforetik davranışlarının HbS ile aynı özellikte olması ön tanıda yeterli sonuç verememektedir. HbS, beta globin geninin altıncı kodonunda yer alan glutamik asit (GAG) yerine, valin (GTG) geçmesiyle oluşan ve orak hücre anemisine neden olan bir anormal hemoglobin türüdür (Itano 1956, Forget 1975). Hb D - Los Angeles ise, beta globin geninin 121. kodonunda yer alan mutasyon nedeni ile glutamik asit (GAA) yerine, glutamin (CAA) geçmesiyle oluşmaktadır. Diğer taraftan Hb G – Coughatta ise, beta globin geninin 22. kodonunda yer alan glutamik asit (GAA) yerine, alanin (GCA) geçmesiyle tanımlanan bir anormal hemoglobin türüdür. Alkali ortamda yapılan elektroforez sonucunda Hb D - Los Angeles ve Hb G-Coughatta, HbS ile benzer elektroforetik harekete sahiptir. Diğer

tarafından; asit hemoglobin elektroforezinde ise, Hb D - Los Angeles, Hb G - Coughatta Hb A ile benzer elektroforetik hareket ortaya koymaktadırlar.

Elektroforetik yöntemlerin kullanımı bu ve benzeri hemoglobin türlerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Protein düzeyinde yapılan hemoglobinopati çalışmaları ile bu tür anormal hemoglobinlerin kesin olarak tanımlanmasında güçlükler bulunmaktadır. Yöremizde beta talasemi taramasında önem taşıyan HbA₂ düzeyi ile orak hücre anemisine yol açan HbS'in ayırıcı tanısı belirgin bir önem taşımaktadır. HbS'in ön tanısı elektroforetik olarak yapılırken, beta talasemide ön tanı % HbA₂ oranının kromatografik yöntem ile yapılmaktadır. Kromatografik yöntemler (DE-52, HPLC vb.). Mutasyon tespiti ise DNA dizi analizi ile saptanmaktadır.

Moleküler tanımlamaya yönelik hızlı biçimde artan ve geliştirilen yöntemler birçok hastalığı gen düzeyinde anlaşılır hale getirmiş, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA düzeyinde yapılır hale gelmiştir. Bu gelişmeler hemoglobinopatilerin moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının anlaşılmasında da önem kazanmıştır. Elde edilen bilgiler ile protein ve DNA analizinde yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Böylelikle hastalıkla ilişkili protein ve DNA analizinde daha basit, kolay, tekrarlanabilen, tek aşamalı, radyoaktivite gerektirmeyen, ekonomik ve tanı laboratuvarı ortamında da uygulanabilen yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemler arasında; talasemilerin bilinen mutasyonların tespitinde kullanılan ARMS, Dot Blot, RFLP ve bilinmeyen mutasyonların tespitinde kullanılan DNA dizi analizi yöntemi sayılabilir (Newton 1989). Hemoglobinopati kontrol programında premarital dönemde öncelikli olarak elektroforetik ve/veya kromatografik yöntemler uygulanmaktadır. Ancak buna karşın elektroforetik ve kromatografik davranışları benzer özellik gösteren anormal hemoglobinlerin açık ve kesin ayırıcı tanısı için DNA dizi analizi yöntemi gerekmektedir. Örneğin; Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln], beta globin geninin 121. kodonunda gelişen GAA>CAA mutasyonu, Hb Beograd [β 121(GH4)Glu>Val] ise beta globin geninin 121. kodonunda gelişen GAA>GTA mutasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Ayrıca Hb D-Los Angeles ve Hb Beograd kromatografik ve elektroforetik olarak benzer özellik göstermektedir (Atalay 2007). Bu mutasyonun bulunduğu bölge PCR yöntemi ile çoğaltılmakta ve Eco RI enzimi tanımlama çalışması yapılmaktadır. Eco RI enzimi çift iplikli DNA (dsDNA-*double stranded*) üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesmektedir. Tanıma bölgesinde yer alan GAA dizisi

normal beta globin genine ait 121. kodonu kodlamaktadır. Dolayısı ile yapılan çalışmada anormal hemoglobin varyantının Hb D-Los Angeles veya Hb Beograd olduğuna ilişkin açık ve kesin bir sonuç elde edilememektedir. Dolayısı ile gen düzeyinde yapılan bu yaklaşımda da anormal hemoglobin varyantının ayırıcı molekül sel tanısı için özgün problemlerle ilgili nokta emdirimi (*dot-blot*) veya DNA dizi analizi çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Yöremizdeki anormal hemoglobinlerin ve beta talasemilerin evlilik öncesi (*premarital*) tanımlaması yapılmaktadır (Atalay 2005). Evlilik öncesi çalışmalarda taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı uygulamasında sağlıklı bireylerin doğumuna katkıda bulunulabilmesi için beta talasemi ve anormal hemoglobin mutasyonlarının doğru biçimde tanımlanması gerekmektedir. Premarital tanımlama çalışmalarında anormal hemoglobin türlerinin hızlı tanısında kullanılabilir yeni nesil yaklaşımlara dayalı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

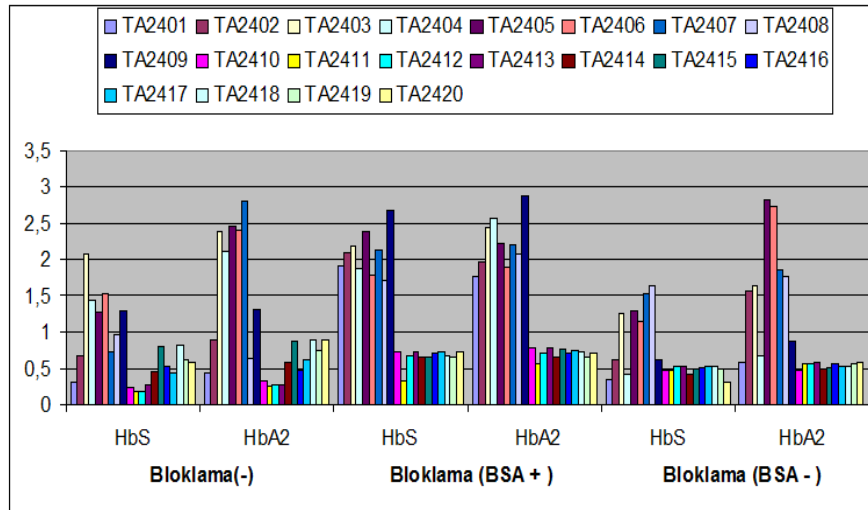
Bu tez çalışması; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı hedeflerinden olan, yöremizde sıklıkla görülen anormal hemoglobinlerin ve beta talasemilerin molekül sel olarak tanımlanmasına dönük biçimde, hızlı ve ucuz rutin test sistemlerinin geliştirilmesi konulu temel yaklaşım içerisinde planlanmıştır.

Gelişen gen mühendisliği teknikleri ile oluşturulan rekombinant antikorların ya da rekombinant algılayıcıların kullanımı protein hedeflerinin tanımlanmasında önem kazanmaktadır. Rekombinant antikorların geliştirilmesinde ise güncel bir yaklaşım olan *display* teknolojileri özel bir yer tutmaktadır (Clément 2003). Display teknolojileri kendi içerisinde scFv (*single chain of variable fragments*) ve yapay Peptid kütüphanelerine dayalı iki temel yaklaşımı içermektedir. Bu yaklaşım kullanılarak elde edilen peptid ve protein algılayıcılar çeşitli biyosensör uygulamalarında, molekül sel algılayıcı bileşen olarak kullanılmaktadır (Hamby 2005). Bu molekül sel algılayıcıların hedeflerine olan ilginlikleri molekül sel konformasyon uyumuna dayanmaktadır. Phage display teknolojisinin uygulama alanları, temelde molekül sel yaklaşımların uygulandığı tüm alanları içermektedir. Bu uygulamaların içerisinde reseptör - ligand etkileşimleri, allerjen moleküllerin tanımlanması, transgenik organizmalar, DNA - protein, protein - protein etkileşimine yönelik çalışmalar yer almaktadır (Russel 1989, Atalay 1999, Erdağ 2000, Sidhu 2000, Bajrovic 2001, Müllen 2006.).

Çalışmamızda PhD-12-mer linear ve PhD-7-mer siklik yapay peptid kütüphaneleri kullanılarak HbA₂ ve HbS molekülünün ayırıcı ve hızlı tanısına yönelik peptid formundaki molekül sel algılayıcıların elde edilmesi hedeflenmektedir.

5.1 HbA₂ Molekülüne Yönelik Faj Eliza Sonuçlarının Değerlendirilmesi

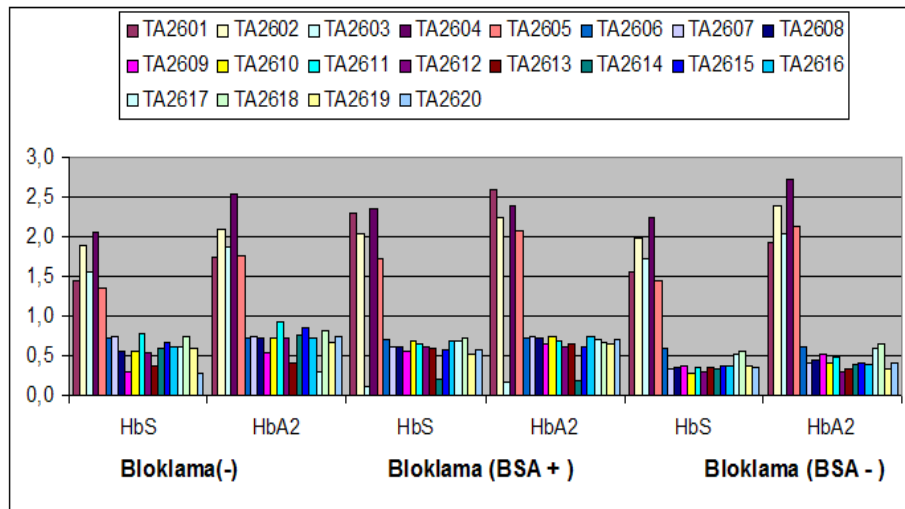
HbA₂ molekülü, iki α ve iki δ globin alt birimlerinden oluşan tetramerik yapıdadır. HbA₂' yi diğer hemoglobinlerden ayıran alt birim δ -globin olduğundan biopanning işlemlerinde, ortak bulunan globin alt birimlerinin (α ve β -globinlerin) elenmesine yönelik biçimde HbS ($\alpha_2\beta_2$) kullanılmıştır. Biopanning işlemlerinde sırası ile BSA, BSA, HbS, HbA₂, HbA₂, HbA₂, HbA₂ karşılaştırmaları yapılmıştır. Bunun sonucunda 72 faj klonunun 12-mer'lik peptid dizileri DNA dizi analizi ile belirlenmiştir. Peptid dizilerinin analizinde bazı klonlarda ortaklık saptanmıştır. Ortak dizilere sahip klonlar gruplanmıştır. Daha sonra faj eliza reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Faj eliza reaksiyonunda izlenen yöntemde ise BSA molekülünün hedef molekül ile etkileşimde etkisini gözlemlemek için eliza kuyuları bloklanmadan, BSA içeren bloklama solusyonu ve BSA içermeyen bloklama solusyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada elde edilen sonuçlarda TA2403, TA2404, TA2405 ve TA2406 klonların hedef molekül olan HbA₂ ile etkileşimlerinin daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Faj Eliza sonuçları

Bu klonlar daha ayrıntılı olarak incelendiğinde ise; TA2405 ve TA2406 faj klonlarının BSA bulunan ve bulunmayan ortamda hedef moleküle karşı ilginliğinin değiştiği görülmektedir. Ortamda BSA'nın varlığı bu klonların hedef molekül ile etkileşimini azaltmaktadır. TA2403 faj klonu ise ortamdaki BSA'nın varlığından etkilenmemekte fakat HbA₂ ve HbS'e aynı oranda ilginlik göstermektedir. TA2404 faj klonunun ise ortamdaki BSA'dan etkilenmediği ve hedef molekül olan HbA₂'ye ilginliğinin HbS'ten daha fazla olduğu görülmektedir. Şekil 5.1'de de görüldüğü gibi faj eliza sonuçları hedef molekül ile faj klonunun etkileşimine yönelik bilgi vermekte ve yönlendirmekte fakat kesin ve ayırıcı bir sonuç ortaya koyamamaktadır. Bu klonların HbA₂ ile etkileşimleri daha fazla olmasına rağmen, bu etkileşim BSA varlığında azalmaktadır. Dolayısı ile ortamdaki BSA varlığının hedef molekül ile etkileşimde olumsuz yönde rol oynadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Verilere göre klonlar tek tek incelendiğinde farklı koşullarla birlikte bazı klonların daha özgün olduğu gözlenmektedir. Daha önce de açıklandığı gibi, bu sonuç bazı klonlar için farklı davranış biçimleri ortaya koymaktadır. Örneğin TA2604 klonunun hedef molekül ile etkileşiminin BSA'dan etkilenmediği görülmektedir (Şekil 5.2). Diğer klonlarda ise hedef molekül ile etkileşim BSA varlığında değişim göstermektedir. Bu durumda BSA etkisinin yanı sıra hedef molekülün immün tüpe adsorbe olurken kazandığı konformasyonel değişikliğin sonuç üzerindeki olası etkisini düşündürmektedir. BSA gerçekten etkileşimi etkilemekte mi yoksa ortak mimotopların varlığı mı sonuçları bu noktaya getirmektedir, sorusu ortaya çıkmaktadır.



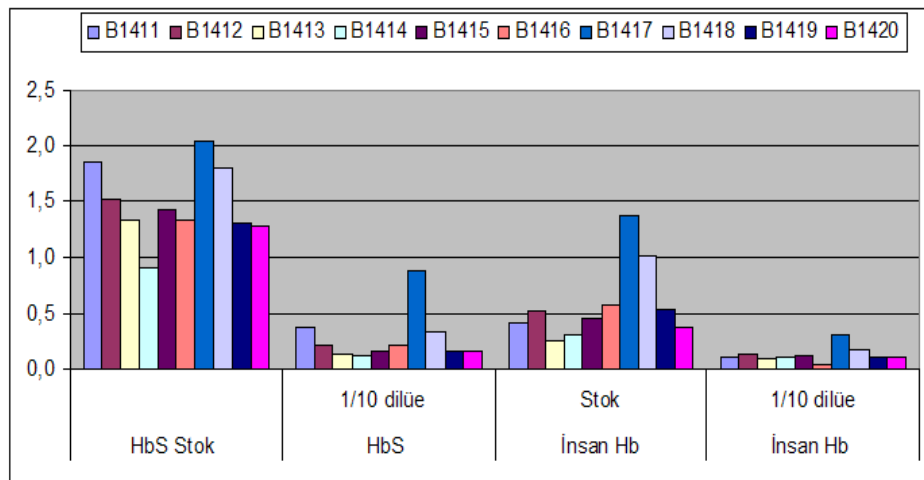
Şekil 5.2 Faj Eliza sonuçları

Bu bakış altında elde edilen sonuçlar, kaplamalardaki hedef molekülün immobilizasyonunda farklı konformasyonların varlığını düşündürmektedir. Tetramerik bir yapı olan hemoglobin molekülü bilindiği gibi deoksi ve oksijen formlarına geçiş özelliği taşımaktadır. Bu durumda hemoglobin molekülünün yüzeye adsorbe olmasında içinde bulunduğu ortam koşullarına göre aldığı konformasyonel yapı önem kazanmaktadır (Viappiani 2004). Bunun sonucunda ise faj eliza sonucundaki değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Diğer taraftan BSA'nın da bir protein olması ve fajların biopanningler sırasında BSA ile karşılaşmaması ve daha sonra eliza reaksiyonu sırasında faj ile BSA molekülü arasında etkileşim olmayacağı anlamını taşımamaktadır. Sonuçta faj partikülünde bulunan peptid, BSA molekülünde benzerlik gösteren farklı bir mimotop ile etkileşime geçebilecektir.

5.2 HbS Molekülüne Yönelik Faj Eliza Sonuçlarının Değerlendirilmesi

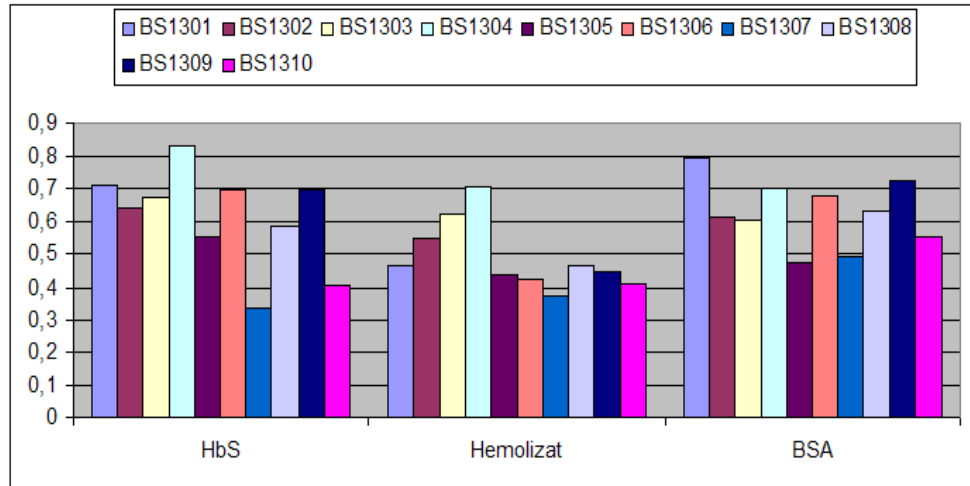
Bilindiği gibi HbS beta globin geninin altıncı kodonunda yer alan glutamik asit (GAG) yerine, valin (GTG) geçmesiyle oluşan ve orak hücre anemisine neden olan bir anormal hemoglobin türüdür. Kodon altı β - globinde eksternal bölgede yer alıp α ve β değme bölgesinde yer almamaktadır. Normal β - globinde yer alan glutamik asit pozitif yüklü polar bir aminoasittir. Orak hücre β - globinde yer alan valin ise hidrofobik özellik göstermektedir. Bu aminoasit değişikliği β - globinde konformasyonel olarak farklılık yaratmaktadır. Bu doğrultuda ise 7-mer'lik siklik kütüphane ile sırası ile HbS, HbS, İnsan HbA, HbS, hemolizat, HbS, BSA, BSA, HbS, BSA, HbS, BSA, BSA, BSA, BSA, hemolizat, hemolizat karşılaştırmaları yapılarak HbS ile etkileşen peptidin bulunması amaçlanmıştır. Toplam on biopanning işlemi sonucunda 70 faj klonu seçilmiştir. Daha önce 12-mer lineer kütüphane ile elde edilen klonların faj eliza sonuçlarında BSA varlığının, hedef molekülün yüzeye adsorbe oluğu kazandığı konformasyonel özellik ve moleküller arası ortak mimotopların etkileri tartışılmıştır. Bir başka etken faktörlerden birisi de ortamdaki hedef molekül konsantrasyonunun faj ilginliğine etkisidir. Faj eliza işleminde bu etkiyi saptamak için hem HbS hem de insan hemoglobini için 1/10'lük dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Eliza sonuçları değerlendirildiğinde; B1411, B1412, B1413 ve B1416 faj klonlarının HbS molekülü ile etkileşimlerinin insan hemoglobini ile olan etkileşiminden daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 5.3). 1/10'lük dilüsyon örneklerinde de faj ile HbS molekülünün etkileşim sonucu insan

hemoglobinine oranla daha fazla bulunmuştur. HbS stok olarak adlandırılan, peptid display protokolünde yer alan konsantrasyon olarak hesaplanmıştır. Buradaki sonuçta görüldüğü gibi fajın HbS molekülü ile olan etkileşim sonucu insan hemoglobininin ortalama altı kat daha fazla olarak saptanmıştır. 1/10'luk dilüsyonda ise bu fazlalık üç ile dört kat arası değişmektedir. Dolayısı ile dilüsyon farkı faj elizada absorsiyon oranında değişiklik yaratmasına rağmen hedef moleküle ilginlikte önemli fark yaratmadığı görülmektedir.

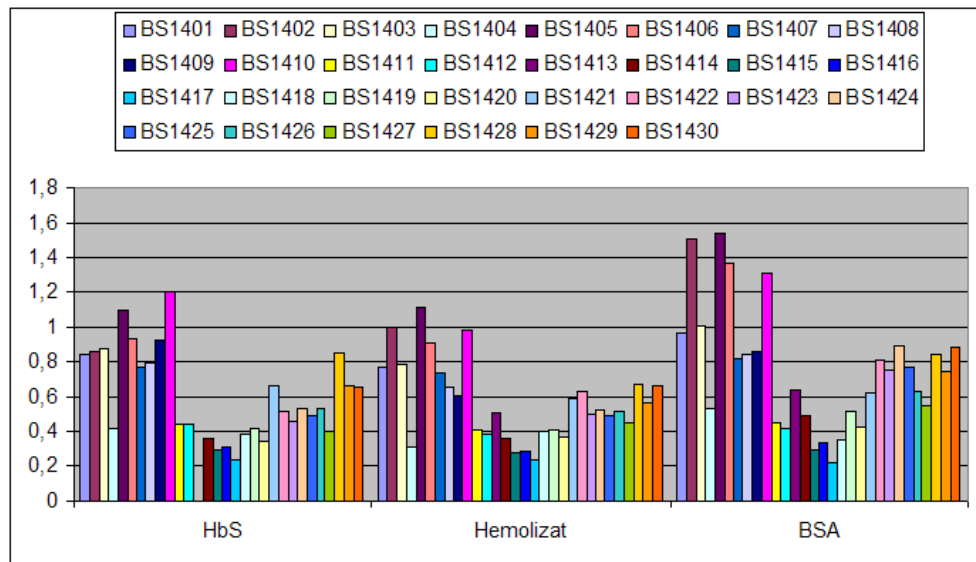


Şekil 5.3 Faj Eliza sonuçları

Daha sonra yapılan faj eliza reaksiyonlarında hedef molekül ile etkileşimde dilüsyonların büyük bir fark yaratmadığı saptandığından dolayı HbS ve insan hemoglobini için 1/10'luk dilüsyonlar uygulanmamış, fajların BSA ve hemolizat ile etkileşimleri incelenmiştir. Sonuçlarda HbS ile etkileşen fajın hemen hemen hemolizat ve BSA ile de aynı ölçüde etkileştiği görülmektedir (Şekil 5.4). Bir diğer sorun ise hemolizat ile elde edilen verilerin de HbS ile etkileşim değerlerine yakın olmasıdır (Şekil 5.5). Burada hemolizat ile gerçekleştirilen biopanninglerde δ - globin alt birimini tanıyan fajları ortamdaki uzaklaştırdığımızı düşünmemize rağmen δ ve β - globin alt birimlerinin ortaklığı etkileşimi etkilemektedir.

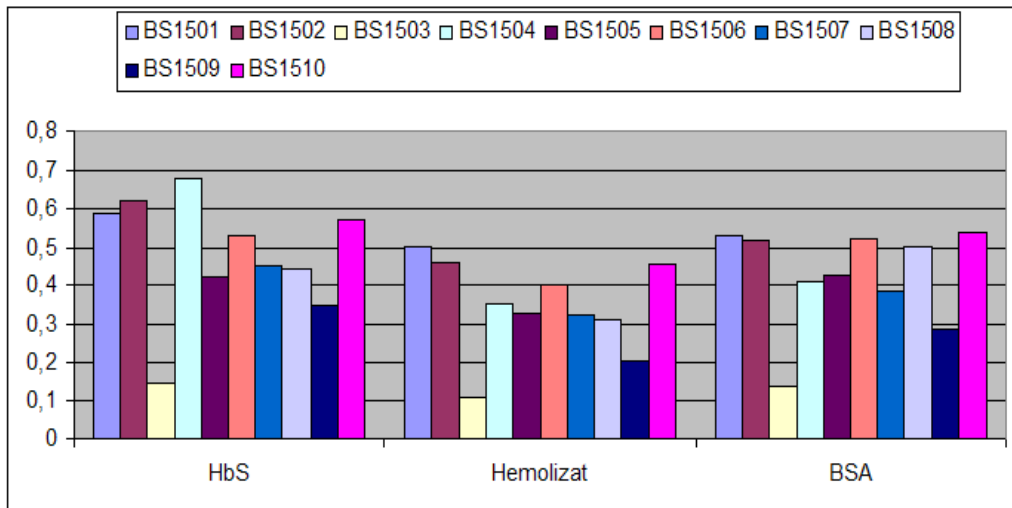


Şekil 5.4 Faj Eliza sonuçları



Şekil 5.5 Faj Eliza sonuçları

Burada karşılaşılan temel sorun 12-mer lineer kütüphane ile karşılaşılan sorun ile benzerdir. BSA'nın ortamda bulunması faj ve HbS etkileşimini etkilemektedir. Ayrıca BSA ile uygulanan biopanningler arka arkaya tekrar edilip BSA'ya bağlanmayan fajların elde edildiği düşünülse de faj eliza sonuçlarında saptandığı gibi HbS ile faj etkileşimini değiştirmektedir (Şekil 5.6). Yanıt olarak ortak konformasyonel yapılanmaların varlığı ortaya çıkmaktadır.



Şekil 5.6 Faj Eliza sonuçları

Akla gelen bir başka düşünce ise 7-mer siklik kütüphane sahip olduğu konformasyon ile sadece hedef molekülü algılayamayıp en belirgin ve bu üç molekülde de ortak olarak bulunan mimotoptan tanımaktadır. Çünkü 12-mer kütüphane ile elde edilen sonuçlarda da birbirinden farklı eliza verileri ile karşılaşılmış ve biopanning uygulamalarında elde edilen faj klonlarının peptid dizilerinin benzer olduğu görülmüştür.

5.3 Peptid Dizilerinin Karşılaştırılması ve Konformasyonel Uyum

Faj eliza reaksiyonlarında yer alan tüm klonların peptid dizileri belirlenmiş ve ortak diziyi içeren klonlara ait grupların varlığı daha önce belirtilmiştir. Veriler incelendiğinde LLADTTHHRPWT aminoasit dizisini içeren üç grup bulunmaktadır. Bunlar; üçüncü grup, dördüncü grup ve altıncı gruptur. Bu gruplardan sadece üçüncü grup biopanningler sırasında BSA ile karşılaştırılmış, diğer gruplar ise biopanningler sırasında BSA ile karşılaştırılmamıştır. Dördüncü grup faj eliza reaksiyonunda BSA ile karşılaştırılmış ve etkileşimi belirlenmiştir. Altıncı grup ise beşinci ve altıncı biopanninglerde elde edilmiş ve bu biopanninglerde ise BSA'ya bağlanmayan fajlar alınmıştır. Bu üç grubun ortak özelliği HbA₂ ile etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu üç grup ayrı biopanning uygulamalarında yer almalarına rağmen ortak aminoasit dizisini içermektedir. Bu durumda ortaya çıkan bir başka soru ise faj eliza sonuçları ve biopanning uygulamaları farklı olan peptid dizilerinin özellikleridir. Örneğin, TA2406, TA2407 ve TA2604 klonlarını BSA'nın varlığında ve BSA olmadan gerçekleştirilen faj eliza reaksiyonlardan elde edilen sonuçlarda farklı olduğu, buna

karşın aynı peptid dizisini içerdikleri belirlenmiştir. Bu aşamada peptid dizilerinin aminoasit içerikleri karakterize edilmiştir (Innis 2004).

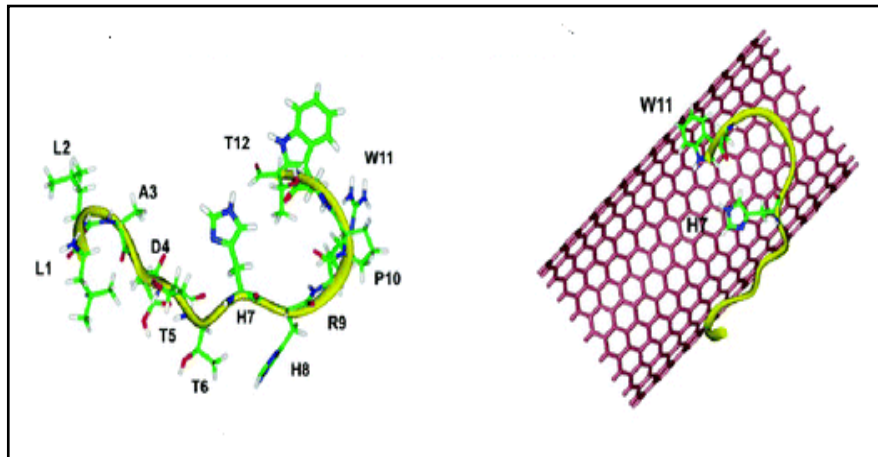
12-mer lineer kütüphane ile elde edilen tüm klonların peptid içindeki aminoasit dizileri ve bu aminoasitlere ait hidrofobisite değerleri incelenmiştir. Genel olarak aminoasitlerin hidrofobisite içeriklerine bakıldığında; dördüncü, yedinci, sekizinci, ve dokuzuncu pozisyonlarda yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerleri negatiftir. Bu pozisyonlardaki aminoasitlere bakıldığında ise dördüncü pozisyonda yer alan aminoasitler prolin, glisin, aspartik asit, treonin, glutamin ve histidin olarak belirlenmiş ve bu pozisyonda yer alan aminoasitler içinde aspartik asit oranının fazla olduğu saptanmıştır. Bu aminoasitler içinden sadece glisinin hidrofobisite değeri pozitiftir. Yedinci pozisyonda yer alan aminoasitler ise histidin, serin, arginin, lösin ve valindir. Bu pozisyonda yer alan aminoasitlerde negatif hidrofobisite değerine sahip histidinin bulunma oranı fazladır. Sekizinci pozisyonda yer alan aminoasitler lizin, prolin, histidin, serin, asparagin, arginindir. Histidinin bulunma oranı fazladır. Dokuzuncu pozisyonda ise serin, arginin, alanin ve lösin bulunmaktadır. Bu pozisyonda ise en fazla bulunma oranı negatif hidrofobisiteye sahip arginine aittir.

7-mer siklik kütüphane ile elde edilen klonlara ait peptid dizilerinin aminoasit dizileri ve hidrofobisite değerleri de belirlenmiştir. Genel olarak aminoasitlerin hidrofobisite içeriklerine bakıldığında; birinci, altıncı ve yedinci pozisyonlarda yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerlerinde negatifliğin daha fazla olduğu görülmektedir. Bu pozisyonlardaki aminoasitlere bakıldığında ise birinci pozisyonda yer alan aminoasitler aspartik asit, sistein, arginin, prolin glutamik asit ve asparagin olarak belirlenmiş ve bu pozisyonda yer alan aminoasitler içinde asparagin oranının fazla olduğu saptanmıştır. Altıncı ve yedinci pozisyonlardaki aminoasitlerde heterojenlik gözlenmiş fakat ortak paydada hidrofobisite değerlerinin negatif olduğu saptanmıştır.

12-mer lineer kütüphane ile elde edilen verilerde negatif hidrofobisite değerinin iç kısımlarda yer alan aminoasitlerde olduğu saptanmıştır. Fakat 7-mer siklik kütüphanede bu durumun uç kısımlarda yer alan aminoasitlerde toplandığı görülmektedir. Genel olarak bakıldığında hedef molekül ile etkileşen peptidler negatif hidrofobisite yönünde eğilim göstermektedir. 7-mer siklik kütüphane ile elde edilen BS1409 ve BS1410 faj klonları ise içerdikleri aminoasitlerde farklılık bulunmasına rağmen aminoasitlerin

hidrofobisite değerleri incelendiğinde bir benzerliğin varlığı gözlenmektedir. Faj eliza reaksiyonlarında da benzer sonuç vermeleri bu peptidlerin HbS zerindeki benzer konformasyonel yapılanmaya yöneldiği sonucunu doğurmaktadır. Yada biopanning işlemlerinde sorun yaratan BSA ile benzer konformasyonel mimitoplardan etkileştiği görülmektedir. Bir diğer sonuç ise BSA, insan Hb ve HbS molekülünde ortak mimotopu tanımaktadır denilebilir. Bu sonuç 12-mer lineer kütüphane ile elde ettiğimiz peptid dizisinin, farklı hedef molekülleri tanınmasından dolayı ortaya çıkmaktadır.

Literatür bilgilerine bakıldığında 12 aminoasitten oluşan bu peptidin farklı hedef moleküllere karşı gerçekleştirilen phage display çalışmalarında da bulunduğu görülmüştür. Bunlardan biri karbon nanotüp çalışmalarında yer almaktadır. Tek katmanlı karbon nano tüpler metalik, elektriksel ve yapısal özellikleriyle biyoteknoloji ve tıp alanındaki uygulamalarda kullanılmaktadır. Nanoteknolojik araştırmalarda biosensör olarak kullanılmaları ve yüzeyi tanıyan peptidin varlığını belirlemek için 12-mer lineer peptid kütüphanesi kullanılarak yapılan çalışmada, tek katmanlı karbon nanotüp ile en iyi moleksel etkileşim gösteren peptid dizisi LLADTTHHRPWT olarak gösterilmiştir (Su 2007). şekil 5.7’de peptidin yapısı ve karbon nano tüp ile etkileşimi yer almaktadır (Su 2006).



şekil 5.7 LLADTTHHRPWT peptidin yapısı ve karbon nanotüp yüzeyine adsorpsiyonu (Su 2006)

Bir diğer çalışma ise; otoantikorlarla tiroid bezi TSH reseptörlerinin aşırı stimulasyonuna bağlı tirotoksikoz ile sonuçlanan ve otoimmün bir hastalık olan Grave’s hastalığında yapılan bir çalışmadır (Na 2003). Bu çalışmada tiroid stimüle eden

antikorların tanımlanmasına yönelik 12-mer lineer peptid kütüphanesi ile peptid display çalışılmıştır. Sonuçlara bakıldığında elde edilen peptid dizisi içinde 12 aminoasitten oluşan LLADTTHHRPWT dizinin varlığı görülmüştür (Na 2003).

Son olarak anjiogenez ile yapılan çalışmada uygulanan peptid display yönteminde 12-mer lineer kütüphane kullanılmış ve endotel ile etkileşimde anjiogenez üzerinde etkili olan peptidin varlığı araştırılmıştır. Burada elde edilen peptid dizileri içerisinde 12 aminoasitten oluşan LLADTTHHRPWT peptid dizisi yer almaktadır (Hardy 2007).

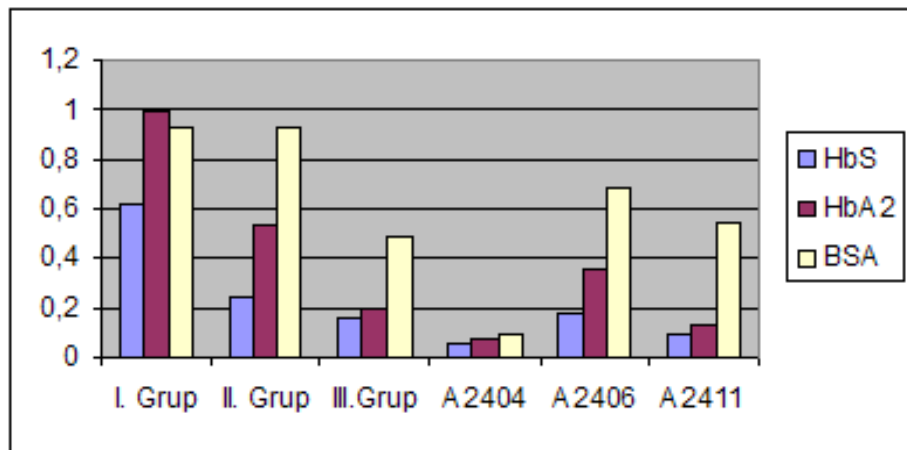
Yapılan çalışmalar ve çalışmamız değerlendirildiğinde birbirinden bağımsız dört çalışma karşımıza çıkmaktadır. Karbon nano tüpler yapısal olarak silindirik yapıda peptid bağlama özelliği gösteren metalik yüzeylerdir. Diğer çalışmaların konusu ise tiroid stimüle hormon ve endotel hücreleridir. Bizim çalışmamızda dört alt birimden oluşan tetramerik bir protein olan hemoglobin yer almaktadır. Yapı ve işlevleri birbirinden farklı olan bu moleküller LLADTTHHRPWT aminoasit dizisini içeren peptid ile etkileşime girmektedir. Buradaki temel soru, bu çalışmalarda ilgili peptidin etkileşime girdiği hedef mimotopların evrensel ortak özelliğinin nedeninin ne olduğu noktasında ortaya çıkmaktadır.

5.4 Display Yöntemlerinde BSA Problemi

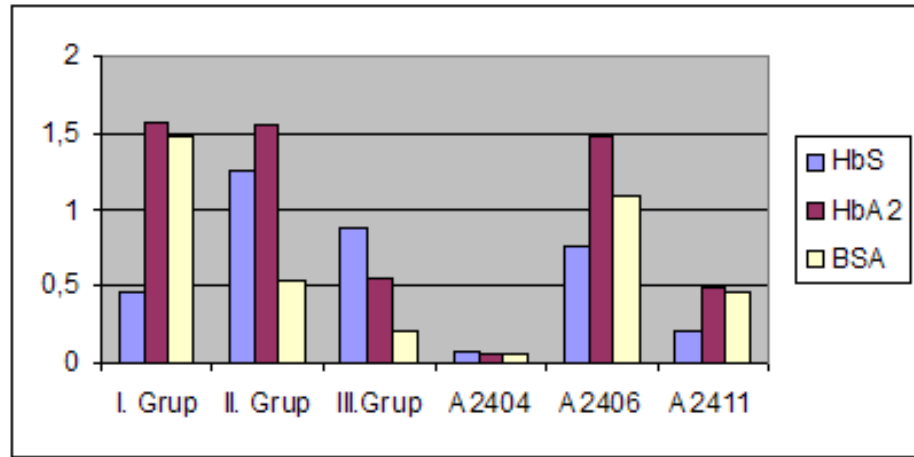
Phage display yönteminde hedef molekülün immün tüpe adborbe edilmesinden sonra % 5'lik BSA ile bloklama yapılmaktadır. Bu bloklama işlemindeki temel amaç immüno tüp üzerindeki hedef içermeyen alanların kapatılmasıdır. Daha sonra faj kütüphanesi ile hedef molekül karşılaştırılmaktadır. Sonuçlarımız doğrultusunda faj kütüphanesinin BSA molekülü ile etkileşimin daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre elde edilen klonların hedef molekül olan HbA₂'den çok kaplamada kullanılan BSA moleküne daha etkin olarak bağlandıkları gözlenmiştir. BSA molekülünün de bir protein olması ve faj kütüphanesi ile etkileşime girmesi phage display yöntemi ile yapılan çalışmalarda önemli bir sorun oluşturmaktadır (Arap 2005). Bunun için yöntem üzerinde değişikliğe gidilip ya da BSA ile ilgili problemleri ortadan kaldırmak için farklı biopanning uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Kromatopanning yaklaşımı buna örnek verilebilmektedir. Noppe ve ark. bu yaklaşımla biopanning işlemlerini kolonda gerçekleştirerek BSA'nın kullanımını ortadan kaldırmışlardır. Kolonda kalan hedef

molekül peptid kütüphanesi ile kolonda karşılaştırılmakta ve yıkama işlemleriyle hedef moleküle bağlanmayan fajlar kolondan uzaklaştırılmaktadır. Uygun tamponla yıkama işleminde ise faj ve hedef molekül elde edilip petriye ekim yapıldıktan sonra faj plakları toplanmaktadır. Faj eliza ile faj ve hedef molekül etkileşimi test edilmektedir. Böylelikle biopanning işleminde faj BSA'yı görmeyip sadece hedef molekül ile karşılaşmaktadır (Noppe 2009). Bu yaklaşımın tetramerik protein olan hemoglobin molekülü üzerindeki başarısı bilinmemektedir.

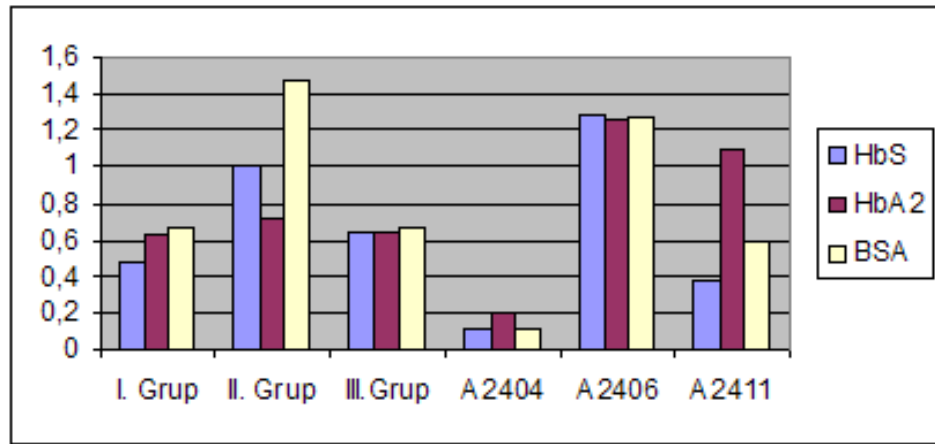
Gerek 12-mer lineer gerekse 7-mer siklik kütüphane ile yapılan biopanning işlemlerinde faj eliza reaksiyonlarında elde edilen sonuçlarda hedef molekül ile etkileşimde BSA'nın etken olduğu ve hedef moleküle olan ilgisi etkilendiği açıktır. Bu sonuç ardışık olarak üç gün tekrarlanan faj eliza reaksiyonları ile saptanmıştır. Bu ardışık ölçümlerde eliza kuyuları her defasında hedef molekül ile yeniden kaplanmıştır. İlk gün alınan sonuçlarda birinci grup olarak adlandırılan faj klonlarının hedef molekül HbA₂'ye ilgisi BSA'ya ve HbS'e olan ilgisinden daha fazladır (Şekil 5.8). Birinci grup hariç diğer tüm klonların ilginliklerinin BSA'ya yönelik olduğu görülmektedir. İkinci gün ölçümlerinde ise faj eliza sonuçları farklılık göstermiş ve ikinci grup hariç diğer tüm grupların ilginlikleri hedef molekül HbA₂'ye yönelik olmuştur (Şekil 5.9). Üçüncü gün ölçümlerinde ise molekül etkileşimler değişiklik göstererek ilk ve ikinci gün ölçümlerinden farklılık ortaya koymuştur (Şekil 5.10). Bu sonuçlara farklı konformasyonel yapılanmaların varlığı yanıt olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 5.8 Faj Eliza sonuçları (Birinci gün)



Şekil 5.9 Faj Eliza sonuçları (İkinci gün)



Şekil 5.10 Faj Eliza sonuçları (Üçüncü gün)

6. SONUÇ

Biyosensörler; genel anlamda, algılayıcı ve sinyal dönüştürücü olmak üzere iki farklı bileşenden oluşmaktadır. *Display* yöntemleri ile elde edilen peptid ve protein algılayıcılar çeşitli biyosensör uygulamalarında, molekülse algılayıcı bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu molekülse algılayıcıların hedeflerine olan ilginkleri molekülse konformasyon uyumuna dayanmaktadır. Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değışiklikler proteinin yapı ve işlevine yansımaktadır. Elektroforetik ve kromatografik yöntemlerle anormal hemoglobinlerin davranış değışikliğı, DNA dizi analizi ile farklılığa neden olan gense özelliğ saptanıp anormal hemoglobin kimliklendirilmesi, popülasyon ve premarital taramalarda zaman almaktadır. Yapay peptid kütüphaneleri kullanılarak anormal hemoglobin molekülünü algılayan özgün klonların seçilmesi ve DNA dizilerinin belirlenmesi ile molekülse etkileşim çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünölmüştür. SPR biyosensörlerinde kullanılabilme özelliğı taşıyan bu klonlar hemoglobinlerin yeni nesil biyosensörler ile taranması, premarital tanı çalışmalarında hızlı, güvenilir ve ucuz bir yaklaşım olanağı sunabilecektir. Bu tez çalışmasındaki amaç, yapay peptid kütüphaneleri kullanılarak, insan hemoglobinlerini algılayan yapay peptid moleküllerinin elde edilmesi ve geliştirilmesindeki sorunların irdelenmesi olarak tanımlanmıştır. Bu kapsamda 12-mer lineer ve 7-mer siklik yapay peptid kütüphanelerinden elde edilen veriler ve olası çalışma yaklaşımları alt başlıklar altında irdelenmektedir.

HbA₂ molekülüne yönelik 12-mer lineer kütüphane ile yapılan çalışmalarda, beş faj klonunun (TA2403, TA2404, TA2405, TA2406, TA2604) hedef molekül olan HbA₂ ile etkileşimlerinin daha fazla olduğı, HbS molekülüne yönelik 7-mer siklik kütüphane ile yapılan çalışmalarda ise dört faj klonunun (B1411, B1412, B1413 ve B1416) HbS molekülü ile etkileşimlerinin daha fazla olduğı saptanmıştır.

12-mer lineer kütüphane ile elde edilen tüm klonların peptid içeriğinin hidrofobisite özelliğı incelenmiş ve dördüncü, yedinci, sekizinci, ve dokuzuncu pozisyonlarda yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerlerinin negatif, 7-mer siklik kütüphane ile elde edilen klonlarda ise birinci, altıncı ve yedinci pozisyonlarda yer alan aminoasitlerin hidrofobisite değerlerinin negatif olduğı saptanmıştır. İçerdikleri ortak dizilerine göre

gruplanan peptidlerin toplam hidrofobisite değerlerinin negatif olduğu belirlenmiştir. Gruplar içerisinde -30.9 toplam hidrofobisite değeri ile birinci grup en yüksek değere sahiptir. İkinci grup -24.8, üçüncü, dördüncü ve altıncı grup -14.7, beşinci grup -19.5, yedinci grup -15.8, sekizinci grup ise -11.4 toplam hidrofobisite değerine sahiptir. Elde edilen klonlardan sadece beş tanesine ait hidrofobisite değeri pozitiftir. Bunlar A2406, A2411, TA2403, TA2413 ve TA2417 olarak adlandırılan faj klonlarıdır. Siklik kütüphane ile belirlenen peptid dizilerinde toplam hidrofobisite değeri negatiftir ve sadece B1417 klonu 1.5 değerinde pozitif hidrofobisiteye sahiptir. Negatif hidrofobisitenin sıklıkla bulunduğu bu peptid dizilerinin varlığı göz önünde bulundurularak hemoglobin tetrameri ile etkileştiğini düşündüğümüz peptide ait özelliklerden biri de negatif hidrofobisiteye sahip olmasıdır. Genelde 12-mer'lik kütüphaneden elde edilen klonların negatif hidrofobisiteye sahip olmaları göreceli olarak daha lineer bir konformasyon ortaya koyduklarını düşündürmektedir. Bu bakış açısı altında, peptidin yapısal ve işlevsel özellikleri daha ayrıntılı incelecek olursa protein - protein etkileşim çalışmalarında elde edilecek verilerin önemli bilimsel katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir.

Elde edilen hidrofobisite değerleri arasında yapılan karşılaştırmada birinci grup için, içinde yer alan klonların sahip olduğu -30.9 hidrofobisite oranı göz önünde bulundurulduğunda bu klonların göreceli olarak hidrofilik özellikleri en yüksek klonlar olduğu görülmektedir. Bu da göreceli olarak daha lineer bir yapıyı işaret etmektedir. Gruplara özgü hidrofobisite değerleri incelendiğinde; grup I > grup II > grup V > grup VII > TA2404 > grup III, IV ve VI > grup VIII > TA2416 > A2404 > TA2405 > TA2411 > TA2413 > A2406 > TA2417 sonucuna ulaşılmaktadır. Artan hidrofobisite değerlerine göre, peptid iç bölgesel hidrofobik özellik göstererek lineer yapıdan uzaklaşıp, kendi içinde katlanmalara doğru yönelmektedir. Gruplar içerisinde yer alan aynı diziye sahip klonların faj eliza sonuçlarında, hedef molekül ile etkileşiminde farklılık görülmektedir. Örnek olarak; TA2604 ve TA2616 faj klonları aynı peptid dizisine sahip olmalarına rağmen hedef molekül olan HbA₂'ye karşı ilginliklerinde değişiklik gözlenmektedir. Elde edilen bu sonuç, hedefin farklı konformasyonlar ortaya koyduğuna işaret etmektedir.

Siklik kütüphane ile elde edilen peptidlerin hidrofobisite değerleri incelendiğinde ise, BS1410 > BS14109 > B1416 > B1412 > B1413 > B1411 > B1417 sonucuna

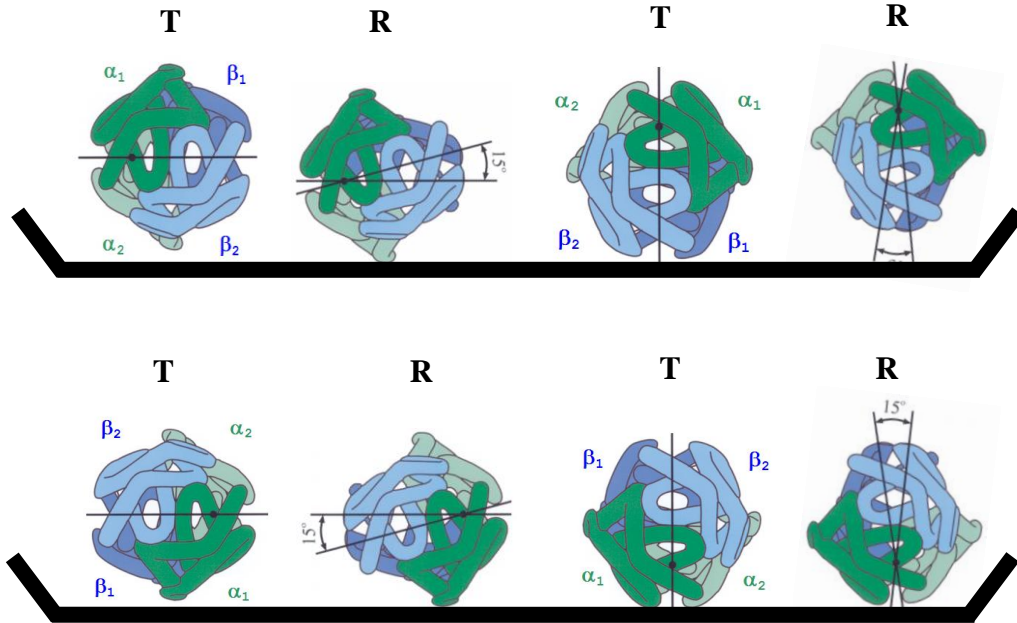
ulaşmaktadır. Aminoasit özellikleri ve hidrofobisite değeri farklı olan bu peptidlerden sadece BS1409 ve BS1410 klonları hedef moleküle karşı aynı oranda ilginlik göstermektedir. Bu doğrultuda yapay peptidlerin 12-mer ve 7-mer'lik içerikleri ve hidrofobisite özellikleri dikkate alındığında; elde edilen sonuçlar hedef moleküldeki konformasyonel farklılıkları işaret etmektedir.

HbA₂ molekülüne yönelik uygulanan farklı biopanning işlemlerinde sıklıkla karşılaşılan peptid dizisi LLADTTHHRPWT olarak belirlenmiştir. Bu peptid dizisini içeren üç grup bulunmaktadır. Bu grupların toplam hidrofobisite değeri -14.7 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu peptid, literatürde nanoteknolojik araştırmalarda ve biyosensörde kullanılma potansiyeli olan ve tek katmanlı karbon nanotüp ile en iyi molekülse etkileşim gösteren peptid dizisi olarak gösterilmektedir. Elde edilen bu dizinin HbA₂ ve tek katmanlı karbon nanotüp ile ortak etkileşim özelliğinin nedenselliği bilinmemektedir.

Gerek 12-mer lineer gerekse 7-mer siklik kütüphane ile yapılan biopanning işlemlerinde faj eliza reaksiyonlarında elde edilen sonuçlarda hedef molekül ile etkileşimde BSA'nın etken olduğu ve hedef moleküle olan ilginliğini etkilediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar üç gün ardışık olarak tekrarlanan faj eliza reaksiyonlarında saptanmış olup reaksiyon içerisinde birinci grup, ikinci grup, üçüncü grup, A2404, A2406 ve A2411 faj klonları yer almıştır. A2406 ve A2411 faj klonları hariç diğer tüm klonların toplam hidrofobisite değeri negatiftir. Hedef moleküle karşı elde edilen ilginlik değerlerindeki değişiklik, farklı konformasyonel yapıların varlığını yanıt olarak ortaya çıkartmaktadır. BSA'nın biopanningler üzerindeki etkisini kesin ve açık bir şekilde ortaya koymak için BSA içermeyen farklı biopanning yöntemleri denenerek elde edilen sonuçların tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

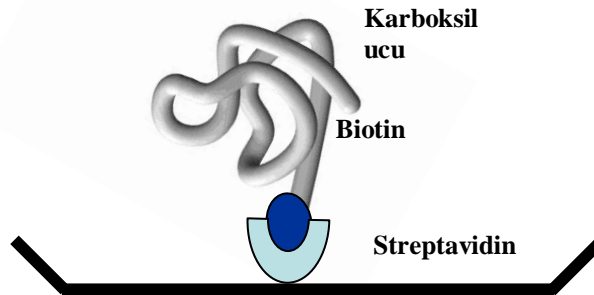
Tetramerik bir yapı olan hemoglobin molekülünün deoksi ve oksid formlarına geçiş özelliği, kaplamalardaki immobilizasyonunda farklı konformasyonların varlığını düşündürmektedir. Hemoglobin molekülünün yüzeye adsorbe olmasında, içinde bulunduğu ortam koşullarına göre aldığı konformasyonel özellik, yapılan çalışmalarda önem kazanmaktadır (Şekil 6.1). Peptid kütüphaneleri kullanılarak elde edilecek verilerin belirli bir standart içerisinde gerçekleştirilmesi için hemoglobin molekülünün

her biopanning işleminde aynı konformasyonda ve özellikle olması sonuçları daha verimli hale getirebilecektir.



Şekil 6.1 Tetramerik proteinin (Hemoglobin) yüzey ile olan farklı etkileşimi

Bir diğer yaklaşım ise tetramerik hemoglobin molekülünü monomerik düzeyde çalışmaktır. Bu bağlamda hedef globin alt birimi (β , δ , α globin) tetramerik yapıdan uzaklaştırılıp, elde edildikten sonra faj kütüphanesi ile doğrudan ortam içerisinde karşılaştırıldıktan sonra, faj ve monomerik protein kompleksinin izlenebilmesi daha yararlı olabilecektir. Bu tür bir yaklaşım için, ilgili alt birim proteinin amino ucundan biotin ile işaretlenip faj kütüphanesi ile karşılaştırıldıktan sonra, faj - protein kompleksi streptavidin kaplı manyetik boncuklar ile bağlanmayan fajlardan ayrılabilir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2 Proteinin yüzeye adsorbsiyonu

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda karşımıza çıkan bir diğer sonuç ise, molekül sel algılayıcı olarak kullanılan peptid kütüphanesinin küçük olmasıdır. Bu bağlamda 16-mer, 22-mer gibi daha büyük yapay peptid kütüphanelerinin kullanımının daha verimli sonuçlara yönlendirebileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde; daha sonra yapılabilecek geliştirme çalışmalarında, peptid içeriklerindeki hidrofobisiteye bağlı biçimde değişiklikler yapılması ve hedef molekülün sürekli biçimde sabit konformasyonda tutulması ve kullanılan kütüphanesinin 16-mer, 22-mer gibi daha büyük peptid kütüphanesinin kullanımı olmak üzere üç ana başlıkta toplayabilecek deneyleri kapsmalıdır. Bu şekilde geliştirilecek yeni peptidlerin hedeflerini daha iyi algılayabilme özelliklerinin incelenebileceği öngörülmektedir. Bu bağlamdaki çalışmalarda AFM, SPR gibi yaklaşımların kullanılması, peptid hedef molekül arasındaki bağlanma kinetikleri, bağlanma ve ayrılmada rol oynayan gerilme kuvvetleri gibi biyofiziksel özellikler ile desteklenmesi önem taşımaktadır. Bu şekilde geliştirilmiş ve biyofiziksel özellikleri iyi tanımlanmış peptidlerin molekül sel algılamaya ve benzeri nanoteknolojik çalışmalara değerli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ackers, G. K., Holt J. M. (2006) Asymmetric cooperativity in a symmetric tetramer: human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 28;281(17):11441-11443.
- Akar, E., Akar, N. (2007) A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Haematol.*, 24: 143-145.
- Alves, I. D., Park, C. K., Hruby, V. J. (2005) Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 6 (4): 293-312.
- Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K., Cumano, A. (1988) Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *Embo. J.*, 7:1995–2001.
- Altay, Ç. (2002) Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Haematol.*, 19 (1): 63-74.
- Antonini, E., Brunori, M. (1970) Hemoglobin. *Annu. Rev. Biochem.*, 39: 977-1042.
- Arap, M. A. (2005) Phage display technology- Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28;1: 1-9
- Atalay, E., Çirakoğlu, B., Erdoğan, G., Bermek, E., Aksoy, M. (1990) Prenatal Diagnosis of a β -globin gene IVS 1/nt110 mutation in chorionic villus from a mosaic triple-X mother with high HbA₂. *Prenatal Diagnosis*, 10: 343-344
- Atalay, E. Ö., Erdağ, B., Çirakoğlu, B. (1999) The Use of Polypeptide Probes Selected From Artificial Peptide Libraries for the Recognition and Differentiation of DNA Sequences. *Turkish Journal of Medical Sciences.*, 29:349–354
- Atalay, E. Ö., Koyuncu, H., Turgut, B., Atalay, A., Yıldız, S., Bahadır, A., Köseleler, A. (2005) High Incidence of Hb-D Los Angeles[β 121(GH4) Glu→Gln] in Denizli province, Aegean Region of Turkey. *Hemoglobin*, 29 (4): 307- 310.
- Atalay, E. Ö., Üstel, E., Yıldız, S., Atalay, A. (2006) SPR (Surface Plasmon Resonance) based molecular detection of Hb S (beta 6, GAG->GTG) at gene level. *Hemoglobin*, 30 (3): 1-7.
- Atalay, A., Koyuncu, H., Köseleler, A., Özkan, A., Atalay, E. O. (2007) Hb Beograd [β 121(GH4)Glu->Val, GAA->GTA] in the Turkish population. *Hemoglobin*, 31 (4): 491-493.
- Atalay, E. Ö., Atalay, A., Koyuncu, H., Öztürk, O., Köseleler, A., Özkan, A., Demirtepe, S. (2008) Rare Hemoglobin Variant Hb Yaizu Observed in Turkey, *Med. Princ. Pract.*, 17 (4): 321-324.
- Azzazy, H. M., Highsmith, W. E Jr. (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.*, 35 (6): 425-445.

- Baca, M., Presta, L. G., O'Connor, S. J., Wells, J. A. (1997) Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.*, 18;272 (16):10678-10684.
- Bahadır, A., Köseleler, A., Atalay, A., Koyuncu, H., Akar, E., Akar, N., Atalay, E. Ö. (2009) Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln] and Hb Beograd [β 121(GH4)Glu>Val]: implications for their laboratory diagnosis and genetic origins. *Turk. J. Hematol.*, 26 (1): 17-20.
- Baines, I. C., Colas, P. (2006) Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov. Today*, 11 (7-8): 334-341.
- Bajrovic, K., Erdağ, B., Atalay, E., Çirakoğlu, B. (2001) Full resistance to tobacco mosaic virus infection conferred by the transgenic expression of a recombinant antibody in tobacco. *J. Biotechnol. Biotech. Equip.*, 15(1): 21-27.
- Barbas, CF 3rd., Kang, A. S., Lerner, R. A., Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (18): 7978-7982.
- Barkhordarian, H., Emadi, S., Schulz, P., Sierks, M. R. (2006) Isolating recombinant antibodies against specific protein morphologies using atomic force microscopy and phage display technologies. *Protein Eng. Des. Sel.*, 19 (11): 497-502.
- Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J. H., Anderluh, G. (2006) Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids*, 141 (1-2): 169-178
- Bettati, S., Mozzarelli, A., Perutz, M. F. (1998) Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. *J. Mol. Biol.*, 281 (4): 581-585.
- Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouet, J., Derbin, C., Perret, G., and Mazie, J. C. (2000) Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J.*, 19, 1525–1533
- Clark BE, Thein SL. (2004) Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin.Lab. Haem*, 26: 159- 176.
- Clément, G., Bisoffi, M., Finger, A. N., Wetterwald, A., Thalmann, G. N., Cecchini M. G. (2003) Peptabodies as tools to test ligands isolated from phage-displayed peptide libraries. *J. Immunol. Methods*, 276 (1-2): 135-141.
- Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W., Dower, W. J. (1990) Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 (16): 6378-6382.
- Daugherty, P. S. (2007) Protein engineering with bacterial display. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17 (4): 474-480.
- Erdağ, B., Atalay, E., Çirakoğlu, B. (2000) Production of recombinant antibody against potato virus Y by using phage display technology. *J. Biotechnol. Biotech. Equip.*, 14(1): 18-24.

- Fadiel, A., Naftolin, F. (2003) Microarray applications and challenges: A vast array of possibilities. *Int. Arch. Biosci.*, 1111-1121.
- Fan, X., Venegas, R., Fey, R., van der Heyde, H., Bernard, M. A., Lazarides, E., Woods, C. M. (2007) An in vivo approach to structure activity relationship analysis of peptide ligands. *Pharm. Res.*, 24 (5): 868-879.
- Feriotto, G., Breveglieri, G., Finotti, A., Gardenghi, S., Gambari, R. (2004) Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Lab. Invest.*, 84 (6): 796-803.
- Filpula, D. (2007) Antibody engineering and modification technologies. *Biomol. Eng.*, 24 (2): 201-215.
- Fischer, R., Fotin-Mleczek, M., Hufnagel, H., Brock, R. (2005) Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem*, 6 (12): 2126-2142.
- Foglieni, B., Cremonesi, L., Travi, M., Ravani, A., Giambona, A., Rosatelli, M. C., Perra, C., Fortina, P., Ferrari, M. (2004) β -Thalassemia microelectronic chip: A fast and accurate method for mutation detection. *Clin. Chem.*, 50 (1): 73-79.
- Forget, B. G., Nathan, D. G. (1975) Thalassemia. *Annu. Rev. Med.*, 26: 345-351.
- Fronticelli, C., Bobofchak, K. M., Karavitis, M., Sana, M. T., Brinigar, W. S. (2002) Introduction of a new regulatory mechanism into human hemoglobin. *Biophys. Chem.*, 98 (1-2): 115-126.
- Fuh, G., Pisabarro, M. T., Li, Y., Quan, C., Lasky, LA., Sidhu, S. S. (2000) Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J. Biol. Chem.*, 275 (28): 21486-21491.
- Giardina, B., Messina, I., Scatena, R., Castagnola, M. (1995) The multiple functions of hemoglobin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30 (3): 165-196.
- Hamby, C. V., Llibre, M., Utpat, S., Wormser, G. P. (2005) Use of Peptide library screening to detect a previously unknown linear diagnostic epitope: proof of principle by use of lyme disease sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12 (7): 801-807.
- Hardison, R. (1998) Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.*, 201 (8):1099-1117.
- Hardy, B., Raiter, A., Weiss, C., Kaplan, B., Tenenbaum, A., Battler, A. (2007) Angiogenesis induced by novel peptides selected from a phage display library by screening human vascular endothelial cells under different physiological conditions. *Peptides*, 28 (3): 691-701.

- Hartwell, S. K., Srisawang, B., Kongtawelert, P., Christian, D., Grudpan, K. (2005) Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*, 65: 1149-1161.
- Henry, R. E., Bettati, S., Hofrichter, J., Eaton, E. W. (2002) A tertiary two state allosteric model for hemoglobin. *Biophys. Chem.*, 98 (1-2): 149-164
- Ho, P. J. (1999) The regulation of β -globin gene expression and β -thalassemia. *Pathology*, 31: 315-324.
- Ho, P.J., Thein, S. L. (2000) Gene regulation and deregulation: a β -globin perspective. *Blood*, 14: 78-93.
- Homola, J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (3): 528-539.
- Hoogenboom, H. R., Chames, P. (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today*, 21 (8): 371-378.
- Huens, E. R. (1970) Diseases due to abnormalities of hemoglobin structure. *Annu. Rev. Med.*, 21: 157-178.
- Huisman, T. H. J., Carver, M. F. H. and Efremov, G. P. (1996). A syllabus of human hemoglobin variants. The Sick Cell Anemia Foundation in Augusta, GA, USA, *Globin Gene Server*. <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/variants/> (12-09-2009).
- Inagaki, K., Inagaki, J., Dumoulin, A., Padovan, J. C., Chait, B. T., Popowicz, A., Manning, L. R., Manning, J. M. (2000) Expression and properties of recombinant HbA2 (α 2 δ 2) and hybrids containing delta-beta sequences. *J. Protein Chem.*, 19 (8): 649-662.
- Innis, A. C., Anand, P. A., Sowdhamini, R. (2004) Prediction of functional sites in proteins using conserved functional group analysis. *J. Mol. Biol.*, 337: 1053-1068
- Itano, H. A. (1956) The hemoglobins. *Annu. Rev. Biochem.*, 25: 331-348.
- Jain, K. K. (2005) Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta.*, 358 (1-2): 37-54.
- Kang, A., Jones, T. M., Burton, D. R. (1991) Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 11120-11123.
- Kriplani, U., Kay, B. K. (2005) Selecting peptides for use in nanoscale materials using phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16 (4): 470-475.
- Köseler, A., Atalay, A., Koyuncu, H., Turgut, B., Bahadır, A., Atalay, E. Ö. (2006) Molecular identification of a rare hemoglobin variant, Hb J-Iran [β 77(EF1)His>Asp] in Denizli province of Turkey, *Turk. J. Haematol.*, 23 (3): 164-166.

- Köseler, A., Bahadır, A., Koyuncu, H., Atalay, A., Atalay, E. Ö. (2008) First observation of Hb D-Ouled Rabah [β 19(B1)Asn>Lys] in the Turkish population. *Turk. J. Haematol.*, 25 (1): 51-53.
- Köseler, A., Koyuncu, H., Öztürk, O., Bahadır, A., Demirtepe, S., Atalay, A., Atalay, E. Ö, (2009) First observation of Hb Tunis [β 124(H2) Pro>Ser] in Turkey, *Turk. J. Haematol.* (Yayınlanmak üzere kabul edildi)
- Kurnit, D. M., Hoehn H. (1979) Prenatal diagnosis of human genome variation. *Annu. Rev. Genet.*, 13: 235-258.
- Li, R., Hoess, R. H., Bennett, J. S., DeGrado, W. F. (2003) Use of phage display to probe the evolution of binding specificity and affinity in integrins. *Protein Eng.*, 16: 65–72.
- Lowman, H. B. (1997) Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26: 401-424
- Lukin, J. A., Ho, C. (2004) The structure-function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. *Chem. Rev.*, 104 (3): 1219-1230.
- Manchak, J., Anthony, K. G., Frost, L. S. (2002) Mutational analysis of F-pilin reveals domains for pilus assembly, phage infection and DNA transfer. *Mol. Microbiol.*, 43 (1): 195-205.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Lauer, J., Lawn, R. M. (1980) The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu. Rev. Genet.*, 14: 145-178.
- Manning, J. M., Dumoulin, A., Li, X., Manning, L. R. (1998) Normal and abnormal protein subunit interactions in hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, 273 (31): 19359-19362.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 222 (3): 581-597.
- Marks JD., Hoogenboom, HR., Griffiths A. D., Winter, G. (1992) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J. Biol. Chem.*, 267 (23): 16007-16010.
- Marvin, D. A., Hohn, B. (1969) Filamentous bacterial viruses. *Bacteriol. Rev.*, 33 (2): 172-209.
- Müllen, M. L., Nair, P. S., Ward, M. J., Rycroft, N. A. (2006) Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.*, 14 (3): 141-147.
- Na, H. C., Lee, H. M., Cho, Y. B., Chae, C. (2003) A method for identification of the peptides that bind to a clone of thyroid stimulating antibodies in the serum of Grave's disease patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88 (4): 1570-1576.

- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C., Markham, A. F. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, 17 (7): 2503-2516
- Noppe, W., Plieva, F., Galaev I. Y., Pottel, H., Deckmyn, H., Mattiasson, B. (2009) Chromato-panning: an efficient new mode of identifying suitable ligands from phage display libraries. *BMC Biotechnol.*, 17: 9:21.
- Oh, B. K., Kim, Y. K., Park, K. W., Lee, W. H., Choi, J. W. (2004) Surface plasmon resonance immunosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosens. Bioelectron.*, 19: 1497- 1504.
- Paschke, M. (2006) Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70 (1): 2-11.
- Palmer, T., Berks, B. C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology*, 149 (3): 547-556.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., North, A. C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 185: 416-22.
- Perutz, M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, 228 (5273): 726-739.
- Perutz, M. F. (1972) Nature of haem-haem interaction. *Nature*, 237 (5357): 495-499.
- Perutz, M. F. (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.*, 239 (6): 92-125.
- Pomponi, M., Gavuzzo, E., Bertonati, C., Derocher, A. E., Lydersen, C., Wiig, Ø., Kovacs, K. M. (2004) Hemoglobin, pH and DPG/chloride shifting. *Biochimie.*, 86 (12): 927-932.
- Rich, R. L., Myszka, D. G. (2001) BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J. Mol. Recognit.*, 14 (4): 223-228.
- Rich, R. L., Myszka, D. G. (2008) Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature.or routine biomolecular interaction analysis. *J. Mol. Recognit.*, 21(6):355-400
- Russel, M., Model, P. (1989) Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J. Virol.*, 63 (8): 3284-3295
- Schechter, A. N. (2008) Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112 (10): 3927-3938.
- Schrier, S. L. (1994) Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annu. Rev. Med.*, 45: 211-218.

- Schroeder, W. A. (1963) The Hemoglobins. *Annu. Rev. Biochem.*, 32: 301-320.
- Sheedy, C., MacKenzie, C. R., Hall, J. C. (2007) Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnol. Adv.*, 25 (4): 333-352.
- Seydel, Ş. G. Hemoglobinopatilerin Mikroarray yöntemi ile belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Adana. 2007
- Sidhu, S. S. (2000) Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11 (6): 610-616.
- Sidhu, S. S. (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.*, 18 (2): 57-63.
- Shikama, K., Matsuoka, A. (2003) Human haemoglobin: A new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha\beta$ contacts. *Eur. J. Biochem.*, 270: 4041-4051.
- Smith, G. P., Petrenko, V. A. (1997) Phage Display. *Chem. Rev.*, 97 (2): 391-410.
- Spritz, R. A., Forget, B. G. (1983) The thalassemias: molecular mechanisms of human genetic disease. *Am. J. Hum. Gene.*, 35 (3): 333-361.
- Storti-Melo, L. M., Mangonaro, P. H., Valencio, C. R., Traina Junior, C., Domingos, C. R. (2009) Three-dimensional visualization of human hemoglobin phenotypes with HPLC. *Genet. Mol. Res.*, 8 (1): 354-363.
- Su, Z., Leung, T., Honek, J. (2006) Conformational selectivity of peptides for single walled carbon nanotube. *J. Phys. Chem. B.*, 110 (47): 23623-23627.
- Su, Z., Mui, K., Daub, E., Leung, T., Honek, J. (2007) Single walled carbon nanotube binding peptides: Probing tryptophan's importance by unnatural amino acid substitution. *J. Phys. Chem. B.*, 111 (51): 14411-14417.
- Tuzmen, S., Schechter, A. N. (2001) Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. *Blood*, 15 (1): 19-29.
- Vasudevan, G., McDonald, J. M. (1998) Analysis of the global architecture of hemoglobin A₂ by heme binding studies and molecular modeling. *J. Protein Chem.*, 17 (4): 319-327.
- Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A., Eaton, W. A. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 (40): 14414-14419.
- Vostiar, I., Tkac, J., Mandenius, C. F. (2003) Monitoring of the heat-shock response in *Escherichia coli* using an optical biosensor. *Anal. Biochem.*, 322: 156- 163.
- Wada, Y. (2002). Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 781: 291-301.

- Wajcman, H., Prehu, C., Michau, J. B., Prome, D., Riou, J., Godart, C., Mathis, M., Hurtrel, D., Galacteros, F. (2001) Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. *Hemoglobin*, 25 (2): 169- 181.
- Wajcman, H., Kiger, L., Marden, M. C. (2009) Structure and function evolution in the superfamily of globins. *C. R. Biol.*, 332 (2-3): 273-282.
- Walker JM, Rapley R. (2000) Molecular biology and Biotechnology. **The Royal Society of Chemistry**, England, s 155- 157.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B. (1976) Molecular genetics of human hemoglobin. *Annu. Rev. Genet.*, 10: 157-178.
- Weatherall, D. J. (2000) Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *BMJ*, 321 (7269): 1117-11720.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization.*, 79 (8): 704-712.
- Yıldız, S., Atalay, A., Bağcı, H., Atalay, E. Ö. (2005). Beta- thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk. J. Haematol.*, 22(1): 19-23.
- Yonetani, T., Tsuneshige, A. (2003) The global allostery model of hemoglobin: an allosteric mechanism involving homotropic and heterotropic interactions. *C. R. Biol.*, 326 (6): 523-532.

ÖZGEÇMİŞ

Aylin KÖSELER, 1976 yılında Bursa'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Bursa'da tamamladı. 1995-1999 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans programını, 2000-2003 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı yüksek lisans eğitimini bitirdi. 2005 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.