



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**İNSAN KEMERİN PROTEİNİNE ÖZGÜ DNA APTAMERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP FEYZA TETİK

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2026

10769956

T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**İNSAN KEMERİN PROTEİNİNE ÖZGÜ DNA APTAMERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP FEYZA TETİK

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2026

10769956

## BEYAN

İnsan Kemerin Proteinine Özgü DNA Aptameri Geliştirilmesi başlıklı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, [Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine](#) uygun olarak tezimi hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez olarak sunulmadığını, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

**Zeynep Feyza Tetik**

**.././2026**

**İmza:**

## ÖNSÖZ

“İnsan Kemerin Proteinine Özgü DNA Aptameri Geliştirilmesi” başlıklı yüksek lisans tezimin çalışmaları boyunca bana sadece bir danışman değil, aynı zamanda bir mentor olan kıymetli hocam Prof. Dr. Cihan DARCAN'a özel bir teşekkürü borç bilirim. Çalışmanın her evresinde sunduğu ufuk açıcı fikirler ve yönlendirmeler, konuya farklı bir bakış açısıyla yaklaşmamı sağlamıştır. Kendisinin bilime olan tutkusunun, bu tezin kalitesini doğrudan artırdığına inanıyorum. Kendisinin akademik rehberliğine ve her zaman hissettirdiği güvene en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı bilgi ve tecrübeleriyle destekleyen, tezimin zenginleşmesini sağlayan hocalarım başta Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN olmak üzere, Doç. Dr. Samet ŞAHİN, Öğr. Gör. Dr. Netice KÜÇÜK ve laboratuvarında desteklerini esirgemeyen Şevval KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini bir an bile eksiltmeyen, varlıklarını ve tecrübelerini hep hissettiğim, her anımda yanımda olup motive eden başta Dr. Duygu BEKİRCAN ESKİ olmak üzere, Doç. Dr. Ardahan ESKİ, Öğr. Gör. Dr. Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN, Arş. Gör. Fırat Yavuz ÖZTÜRK, saymadığım tüm ekip arkadaşlarım ve laboratuvar arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında destekçilerim olan, iyi bir insan olmamı sağlayan ve beni sevgileriyle bu günlere getiren, annem Sebahat TETİK ve babam Mustafa TETİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez, bana duydukları güvenin ve emeklerinin küçük bir karşılığıdır. Bana karşı her zaman kucak dolu sevgileri olan, yüzümü güldüren, hayatımı neşelendiren kardeşlerim Öznur ve Salih Berk'e kucak dolusu teşekkür ederim.

**Zeynep Feyza TETİK**

**2026**

## ÖZET

### İNSAN KEMERİN PROTEİNİNE ÖZGÜ DNA APTAMERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Kemerin, adipositlerden salınan ve glikoz metabolizması, inflamasyon ve enerji dengesi üzerinde düzenleyici rol oynayan bir adipokin proteindir. Kemerin, biyolojik aktivite açısından birbirinden farklı izoformlara sahiptir; ancak mevcut immünolojik analiz yöntemlerinden olan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), bu izoformları birbirinden ayırt edememektedir. Özellikle biyolojik aktivitesi yüksek olduğu bildirilen kemerin-S157 izoformu için tanıma elemanlarının bulunmaması, kemerinin fizyolojik süreçlerdeki ve patolojik mekanizmalardaki özgül rollerinin tam olarak aydınlatılmasını zorlaştıran temel bir sınırlılık teşkil etmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, literatürde ilk kez, kemerin-S157 izoformu için tek zincirli DNA (ssDNA) aptamerlerinin seçilmesi ve karakterize edilmesidir. Aptamerler, hedef molekülleri yüksek özgüllükle tanıyabilen sentetik nükleik asit dizileridir ve bu özgüllük ancak hedefe karşı seçici bir eleme süreci ile sağlanabilmektedir. Çalışma kapsamında, sistematik zenginleştirme süreci için hedef proteine bağlanabilen dizilerin sistematik olarak zenginleştirilmesine olanak tanıyan Manyetik Boncuk (MB) tabanlı SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) metodolojisi uygulanmıştır.

SELEX sürecinde kemerin-S157 proteini, Ni-NTA kaplı manyetik boncuklar üzerine immobilize edilmiş ve yaklaşık  $10^{15}$  farklı dizi içeren rastgele bir ssDNA kütüphanesi ile etkileştirilmiştir. Ardışık seçim döngüleri boyunca bağlanma süresi ve hedef protein miktarı kademeli olarak azaltılarak, yalnızca yüksek afiniteli dizilerin seçilmesi amaçlanmıştır. SELEX süreci sonunda elde edilen zenginleşmiş aptamer havuzu Sanger dizileme yöntemi ile analiz edilmiş ve beş farklı aday aptamer dizisi tanımlanmıştır.

Elde edilen aday aptamerlerin ikincil yapı kararlılıkları Mfold algoritması ile tahmin edilmiş; bağlanma kinetikleri ve afiniteleri ise floresan izoterm deneyleri aracılığıyla değerlendirilmiştir. Hesaplanan dissosiyasyon sabitlerine göre Apt-C3 (124.1 nM), Apt-C4 (224.7 nM) ve Apt-C5 (288.3 nM) en uygun adaylar olarak belirlenmiştir. Bu adaylar arasında Apt-C4 dizisi, daha düşük serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) ve daha yüksek erime sıcaklığı ( $T_m$ ) göstermesi nedeniyle yapısal açıdan en kararlı aptamer olarak öne çıkmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması, kemerin-S157 izoformu için ilk ssDNA aptamerlerinin seçimini ve temel karakterizasyonunu gerçekleştirerek, kemerin-S157'nin tanınmasına yönelik ileri çalışmalara bilimsel bir temel sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer, SELEX, Kemerin, Biyosensör

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF DNA APTAMER SPECIFIC TO HUMAN CHEMERIN PROTEIN

Chemerin is an adipokine secreted by adipocytes that plays a pivotal regulatory role in glucose metabolism, inflammation, and energy homeostasis. It exists in multiple isoforms with distinct biological activities; however, conventional immunological assays, such as the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), are inherently limited by their inability to distinguish between these variants. The absence of recognition elements specific to the highly active chemerin-S157 isoform represents a significant analytical bottleneck, hindering a comprehensive understanding of chemerin's specific roles in physiological processes and pathological mechanisms.

The objective of this thesis is to bridge this gap by selecting and characterizing the first single-stranded DNA (ssDNA) aptamers specific to the chemerin-S157 isoform. Aptamers are synthetic nucleic acid sequences capable of recognizing target molecules with high specificity—a property achieved through a rigorous and selective enrichment process. To this end, a Magnetic Bead (MB)-based SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) methodology was employed to facilitate the systematic isolation of sequences with high binding affinity.

During the SELEX process, the chemerin-S157 protein was immobilized onto Ni-NTA-coated magnetic beads and incubated with a random ssDNA library containing approximately  $10^{15}$  unique sequences. Selection pressure was incrementally increased across successive cycles by reducing both the protein concentration and incubation duration to ensure the sequestration of only the highest-affinity binders. Following the enrichment, the resulting aptamer pool was analyzed using Sanger sequencing, which led to the identification of five primary candidate sequences.

The secondary structure stabilities of these candidates were predicted via the Mfold algorithm, while their binding kinetics and affinities were quantitatively evaluated through fluorescence isotherm experiments. Based on the calculated dissociation constants, Apt-C3 (Kd: 124.1 nM), Apt-C4 (Kd: 224.7 nM), and Apt-C5 (Kd: 288.3 nM) were determined to be the most viable candidates. Among these, Apt-C4 stood out as the most structurally robust aptamer due to its lower Gibbs free energy change ( $\Delta G$ ) and higher melting temperature ( $T_m$ ).

In conclusion, this study establishes a scientific foundation for the selective detection of chemerin-S157 by providing the first characterized ssDNA aptamers for this isoform. These findings provide a critical framework for the development of future diagnostic platforms and isoform-specific biosensors.

**Keywords:** Aptamer, SELEX, Chemerin, Biosensor

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ .....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. Kemokinler.....	4
2.2. Kemerin .....	6
2.2.1. Kemerin Reseptörleri .....	9
2.2.2. CMKLR1 (ChemR23) (Chem1) Reseptörü .....	10
2.2.3. GPR1 (Chem2) Reseptörü.....	10
2.2.4. CCRL2 Reseptörü.....	11
2.3. Kemerin Proteininin Fizyolojik Rolü .....	12
2.3.1. Lipit Metabolizması, Obezite ve Tip 2 Diyabet (T2D) .....	12
2.3.2. İnflamasyon .....	14
2.3.3. Bağışıklık .....	16
2.3.4. Kanser .....	18
2.3.5. Üreme Fonksiyonları .....	20
2.4. Kemerinin İnsan Serum Sıvısındaki Tespit Seviyeleri.....	22
2.5. Kemerin Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler .....	26
2.5.1. ELISA Yöntemi ile Kemerin Tespiti.....	26
2.5.2. Kütle Spektrometresi ile Kemerin Tespiti.....	30
2.5.3. Elektrokimyasal İmpedimetrik Biyosensör ile Kemerin Tespiti .....	31
2.6. Aptamer ve Üstel Zenginleştirme Yoluyla Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) .....	31
2.6.1 Aptamer Terimi ve Aptamer Kütüphanesi .....	31
2.6.2. Farklı SELEX Yöntemleriyle Aptamer Seçimi.....	33
2.6.3. Aptamer Teknolojisinin Kullanım Alanları .....	36
3. ÇALIŞMANIN AMACI.....	38
4. MATERYAL METOT.....	39

4.1. Kemerin Proteinin Temini ve Aptamer Seçilimi İçin Gerekli Olan SELEX Kitinin Temini.....	39
4.2. Kemerin Proteininin Manyetik Boncuklara İmmobilizasyonu.....	40
4.3. Seyreltilmiş Sığır Serum Albümin (BSA) Standartlarının Hazırlanması .....	41
4.3.1. BSA Grafiğinin Çıkarılması .....	42
4.4. SELEX.....	43
4.4.1. SELEX Turları ve PZR Koşulları.....	43
4.5. Kemerine Yüksek Afinite Gösteren Aptamer Dizilerinin Belirlenmesi .....	46
4.5.1. Klonlama.....	46
4.5.2. Transformasyon .....	47
4.5.3. Ligasyon Ürünü İçeren Hücrelerin (Rekombinantların) Doğrulanması ....	48
4.5.4.Sanger Sekanslama .....	49
4.5.5. Aptamerlerin Bağlanma Afinitelerinin Hesaplanması.....	49
4.6. Aptamer–Protein Etkileşimlerinin HADDOCK ile Modellenmesi ve Yorumlanması .....	49
5. SONUÇLAR .....	51
5.1. Kemerinin Manyetik Boncuklara Bağlanma Aktivitesinin Ölçümü .....	51
5.1.1. Micro BCA Protein Assay Kit ile Ölçüm.....	51
5.1.2. FT-IR ile Ölçüm .....	52
5.2. SELEX Döngüleri Sonucu Aptamer Seçimi.....	53
5.3. Klonlama Sonuçları.....	55
5.4. Klonlama Sonucu PZR Ürünü İçeren Plazmitlerin Doğrulanması.....	56
5.5. Sekanslanan Aptamer Dizilerinin Biyoinformatik Analizi.....	57
5.5.1. MFold Analizi.....	57
5.5.2. Clustal Omega Analizi.....	60
5.5.3. Aptamerlerin Bağlanma Afinitelerinin Belirlenmesi .....	60
5.6. Aptamer–Protein Etkileşimlerinin HADDOCK ile Modellenmesi ve Analizi .....	63
5.6.1. Arayüz Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme .....	65
5.6.2. Temel Bileşenler Analizi (PCA).....	66
5.6.3. Yakın Temas ve Etkileşim Mesafesi Karşılaştırması .....	67
5.6.4. Jaccard İndeksi ile Aptamer-Protein Etkileşim Bölgelerinin Karşılaştırılması .....	69
5.6.5. Aptamer Adaylarının Amino asit Rezidü Etkileşim Profilleri.....	70
6. TARTIŞMA .....	74
7. ÖNERİLER .....	81
KAYNAKÇA.....	82

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kemokinlerin 4 alt grubunun şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2. Kemerinin NMR yapısı.....	7
Şekil 2.3. Kemerinin farklı enzimlerle işlenerek farklı formlarda üretilmesi .....	8
Şekil 2.4. Kemerinden türetilen C-terminal peptitleri .....	9
Şekil 2.5. Üç kemerin reseptörünün şematik gösterimi ve aşağı yönlü sinyal yolları	12
Şekil 2.6. Kemerinin inflamasyonla ilişkili hücresel yolları .....	16
Şekil 2.7. Farklı tür adipokinlerin over folikülünde adipokin ekspresyonu.....	21
Şekil 2.8. Dokular üzerindeki TIG2 geninin ekspresyonu şematik olarak gösterimi ...	22
Şekil 2.9. Yapı oluşumuna bağlı olarak bir hedef proteine aptamer bağlanmasının .....	32
şematik gösterimi .....	32
Şekil 4.1. Manyetik boncuğa bağlı Kemerinin manyetik stantta toplanması.....	41
Şekil 4.2. Bank40 Kütüphanesi ve Primer Dizileri .....	43
Şekil 4.3. Manyetik stantta bulunan boncuk+protein+aptamer temsili şeması.....	44
Şekil 5.1. Nanodrop ölçümleri sonucu elde edilen BSA standart grafiği .....	51
Şekil 5.2. Ni-NTA manyetik boncuklar ve Kemerin bağlı Ni-NTA manyetik boncukların	53
ATR FT-IR sonuçları .....	53
Şekil 5.3. 1-13 arası SELEX turlarında yapılan PZR döngülerinin %1'lik agaroz jel	55
görüntüsü.....	55
Şekil 5.4. Transformasyon sonrası Amp+ LB besiyerinde PZR ürününü içeren koloniler	55
.....	55
Şekil 5.5. Plazmid izolasyonu .....	56
Şekil 5.6. SELEX turlarındaki PZR ürününü içeren (aptamer) plazmitlerin PZR ile	57
doğrulanması .....	57
Şekil 5.7. 5 farklı aptamer dizisine uygulanan çoklu hizalama sonuçları .....	60

<b>Şekil 5.8.</b> Farklı FAM derişimleriyle oluşturulan standart grafiği.....	<b>61</b>
<b>Şekil 5.9.</b> Üç farklı aptamerin yapıları .....	<b>61</b>
<b>Şekil 5.10.</b> Üç farklı aptamerin bağlanma izotermi .....	<b>62</b>
<b>Şekil 5.11.</b> HADDOCK ile modellenen aptamer-protein komplekslerinin yapısal gösterimi .....	<b>64</b>
<b>Şekil 5.12.</b> Aptamer-protein arayüz özelliklerinin PCA biplot gösterimi.....	<b>67</b>
<b>Şekil 5.13.</b> Etkileşim çifti sayısı ile yakın temas sayısı arasındaki ilişki .....	<b>68</b>
<b>Şekil 5.14.</b> Aptamer-protein kompleksleri arasında bağlanma bölgesi benzerlik matrisi .	<b>70</b>
<b>Şekil 5.15.</b> Aptamer-protein komplekslerinde arayüz amino asit rezidü dağılımharitası..	<b>71</b>

## TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
<b>Tablo 2.1.</b> FF'deki adipokin ve sitokinlerin konsantrasyonları .....	21
<b>Tablo 2.2.</b> Bireylerin beden kitle indeksine göre biyokimyasal analizleri .....	24
<b>Tablo 2.3.</b> Çalışılan kadınların biyokimyasal analizleri ve Kemerin düzeyleri .....	25
<b>Tablo 2.4.</b> Kemerin seviyelerinin ölçüldüğü çalışmalarda kullanılan ELISA kitlerinin ölçüm aralığı ve duyarlılığı .....	29
<b>Tablo 4.1.</b> Seyreltilmiş Albumin (BSA) Standartlarının Hazırlanması .....	42
<b>Tablo 4.2.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları .....	45
<b>Tablo 4.3.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri .....	45
<b>Tablo 4.4.</b> PZR Koşulları .....	48
<b>Tablo 5.1.</b> Nanodrop ölçümünde elde edilen ortalama sonuçlar .....	51
<b>Tablo 5.2.</b> Kemerinin Boncukla İnkübasyon Öncesi ve Sonrası Miktarları .....	52
<b>Tablo 5.3.</b> SELEX turları boyunca değişen koşullar .....	54
<b>Tablo 5.4.</b> SELEX ile Kemerin Proteinine Özgü Seçilen Aptamer Dizileri .....	57
<b>Tablo 5.5.</b> Mfold analizi sonucu elde edilen katlanmış aptamerlerin yapısı ve termodinamikleri .....	58
<b>Tablo 5.6.</b> Aptamerlerin katlanma yapısına katılan loop ve heliks yapılarının termodinamikleri .....	59
<b>Tablo 5.7.</b> Aptamerlerin hibridizasyon değerleri .....	59
<b>Tablo 5.8.</b> Aptamerlerin Kd değerleri .....	63
<b>Tablo 5.9.</b> HADDOCK ile modellenen aptamer-protein kompleksi arayüz metrikleri	65

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

**bp:** Baz Çifti (Base pair)

**BSA:** Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin)

**CCRL2:** CC Motif Reseptör Benzeri 2

**CMKLR1:** Kemokin Benzeri Reseptör 1 (ChemR23)

**$\Delta G$ :** Serbest Enerji Değişimi (Delta G)

**dsDNA:** Çift Zincirli DNA (double-stranded DNA)

**ELISA:** Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

**FAM:** Fluorescein (Fluoresan Etiketi)

**FT-IR:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

**GPR1:** G Protein-Bağlı Reseptör 1 (Chem2)

**Kd:** Dissosiyasyon Sabiti (Dissociation Constant)

**Kemerin:** Chemokine-like Receptor 1 ligandı (TIG2/RARRES2)

**MB:** Manyetik Boncuk (Magnetic Bead)

**Ni-NTA:** Nikel Yüklü Nitrilotriasetik Asit

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

**SELEX:** Üstel Zenginleştirme Yoluyla Ligandların Sistemik Evrimi (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)

**ssDNA/RNA:** Tek Zincirli DNA/RNA (single-stranded DNA/RNA)

**T2D:** Tip 2 Diyabet (Type 2 Diabetes)

**T<sub>m</sub>:** Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)

## 1.GİRİŞ

Günümüzde pek çok hastalığın tanısı için, kolay ve erişilebilir yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle metabolik, hormonal, otoimmün, kanser ve kalıtsal tabanlı hastalıklar, kandan alınan küçük bir örnekle tayin edilebilir hale gelmiştir (Gubala vd., 2012). Kan örneğinde bulunan bazı protein, peptit ve sinyal moleküllerinin, hastalığa dair bir belirteç olması, kolaylığın ana sebebidir. Örnek olarak, gittikçe yaygınlaşan bir hastalık olan diyabetin tanısı için kan örneğiyle bağlantılı birçok kit geliştirilmiştir (Alix-Panabières ve Pantel, 2021; Waly vd., 2026). Sadece tanı değil, tedavi süreci ile ilgili olarak da günlük kullanıma olanak sağlayan kitler geliştirilmiştir. Geçmişten günümüze kadar antikor tabanlı tanı kitleri oldukça yaygın olarak kullanılmıştır. Antikorlar, biyolojik bir hedef molekülü tespit etmek için antikorların antijenlerine özgüllüğünü kullanan bir biyosensör bileşeni olarak kullanılabilir. Antikor tabanlı biyosensörler, hastalık teşhisi, ilaç geliştirme ve biyolojik araştırmalar gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Kumar vd., 2024). Antikorlar, moleküler tanımlama için geniş bir uygulama alanı olan, en çok bilinen moleküller olarak otuz yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Bu sebeple de çalışmalarda kullanılması daha güvenli görülmektedir (Jayasena vd., 1999). Günümüzde gelişen teknolojiyle beraber antikorların kullanım alanlarına alternatif olarak aptamerler ortaya çıkmıştır.

Aptamerler, hedef moleküllere yüksek afinite ve özgüllükle bağlanabilen, tek zincirli DNA veya RNA yapısında sentetik tanıma elemanlarıdır (Ellington ve Szostak, 1990). Küçük moleküler boyutları sayesinde hedefe daha etkin erişim sağlayabilmeleri, yüzey yoğunluğunun daha kontrollü biçimde ayarlanabilmesi (Liss vd., 2002) ve kütle taşınım sınırlamalarının azalması (Tombelli vd., 2005), aptamerleri özellikle duyarlılık gerektiren analitik uygulamalar için avantajlı kılmaktadır. Antikorların aksine, aptamerlerin küçük boyutu, biyosensör yüzeyindeki yoğun bir reseptör tabakasında immobilizasyonlarını sağlar. Bu, biyosensörün tespit menziline genişletmeye, biyosensör yanıtını ve hedef bağlanma kapasitesini arttırmaktadır İmmünosensörlerde yaygın olarak kullanılan antikorlara kıyasla birçok önemli avantaja sahiptir. Aptamerlerin antikorlara karşı başlıca avantajları, gelişmiş stabiliteleri, çok yönlü tasarımları ve yeniden kullanılabilir biyosensörler için yeniden üretebilme yetenekleridir. Aptasensörlerin raf ömrü, immünosensörlere kıyasla önemli ölçüde daha uzundur; Aptasensörlerin hassasiyet kaybı olmadan birkaç hafta boyunca saklanabileceği kuru koşullarda gösterilmiştir. Buna karşılık, immünosensörlerin depolanması genellikle birkaç günle, buzdolabında ve ıslak koşullarda sınırlıdır. Aptamerler tamamen in vitro yöntemlerle üretildikleri için hayvan kullanımına gerek duyulmaz; bu durum hem etik hem de

maliyet açısından önemli üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca yüksek kimyasal ve termal kararlılıkları, uzun raf ömürleri ve denatürasyondan sonra yeniden fonksiyon kazanabilmeleri, antikora kıyasla operasyonel esneklik sunmaktadır (Arshavsky-Graham vd., 2022). Belirtilen tüm bu avantajlar göz önüne alındığında, aptamerlerin klinik tanı alanında antikora karşı güçlü bir alternatif oluşturduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, insan kemerin proteinine yüksek afinite gösteren tek zincirli DNA aptameri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kemokinler (Kemotaktik Sitokinler), bağışıklık hücrelerinin, özellikle lökositlerin göçünü, aktivasyonunu ve doku içindeki konumlanmasını düzenleyen, küçük sinyal proteinleridir. Kemokinleri diğer kemotaktik ajanlardan (hücrelerin belirli bir kimyasal gradyan boyunca yönlü hareketini indükleyen moleküller) ayıran temel fark, bunların özgül G-proteini kenetli reseptörler (GPCR) aracılığıyla sinyal iletmesi ve yapılarındaki korunmuş sistein kalıntılarına göre sınıflandırılmalarıdır (Griffith vd., 2014). Kemerin başta olgunlaşmamış plazmasitoid ve miyeloid dendritik hücreler olmak üzere, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler gibi çeşitli lökositler için güçlü bir kemoatraktan olarak işlev görmektedir (Wittamer vd., 2003; Zabel vd., 2005). Bu kemotaktik etkisinin yanı sıra, hücrel farklılaşma süreçlerinde ve sistemik enerji metabolizmasının düzenlenmesinde de aktif rol oynadığı bilinmektedir (Goralski vd., 2007). Kemerin, başlangıçta bir kemotaktik ajan olarak tanımlanmış olmasına rağmen, Yoshimura & Oppenheim tarafından yapılan bir çalışma, kemerin proteolizinin, ChemR23 reseptörü üzerinden sinyal veren ve pikomolar düzeyde inflamasyonu baskılayan güçlü bir antiinflamatuvar peptid oluşturduğunu göstermektedir (Yoshimura & Oppenheim, 2008). Kemerin, inflamasyon, adipogenez, anjiyogenez ve enerji metabolizmasında da rol oynayan bir faktör olduğu ayrıca, çeşitli hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir (Bondue vd., 2011). Ancak farklı doku spesifikliği nedeniyle kemerin, inflamatuvar bağırsak hastalığı, hepatit, özofagus kanseri ve mide kanseri gibi durumlarda hastalığın gelişimini teşvik edebilirken, alerjik pnömoni ve meme kanseri gibi durumlarda ilerlemeyi engelleyebilir. Bu durum, proteinin işlevlerinin karmaşıklığını yansıtmaktadır (Yue vd., 2023).

Son zamanlarda birçok hastalıkta ekspresyon düzeylerinin değişmesi nedeniyle kemerin proteininin tespiti ve seviyelerinin izlenmesi önem kazanmıştır. Özellikle tüm dünyanın mücadele verdiği obezite ve buna bağlı olarak da gelişebilen Tip 2 diyabet durumlarında, kemerin seviyeleri oldukça belirgin bir farklılık göstermektedir (Bozaoglu vd., 2007). Kemerinin sahip olduğu farklı izoformlar, kemerin tespiti açısından zorluk oluşturmaktadır. Bu izoformlar arasında birden fazla aktif formun bulunması da kemerin

hangi formunun tespit edileceği konusunda soru işaretleri barındırmaktadır (Schultz vd., 2013). Halihazırda bulunan tespit yöntemleri kromatografik yöntemle entegre kütle spektrometrisi (Chang vd., 2016; Huang vd., 2020) ve enzim bağlı immünosorbent testleri (ELISA) ile sınırlı kalmıştır (Zhao vd., 2022).

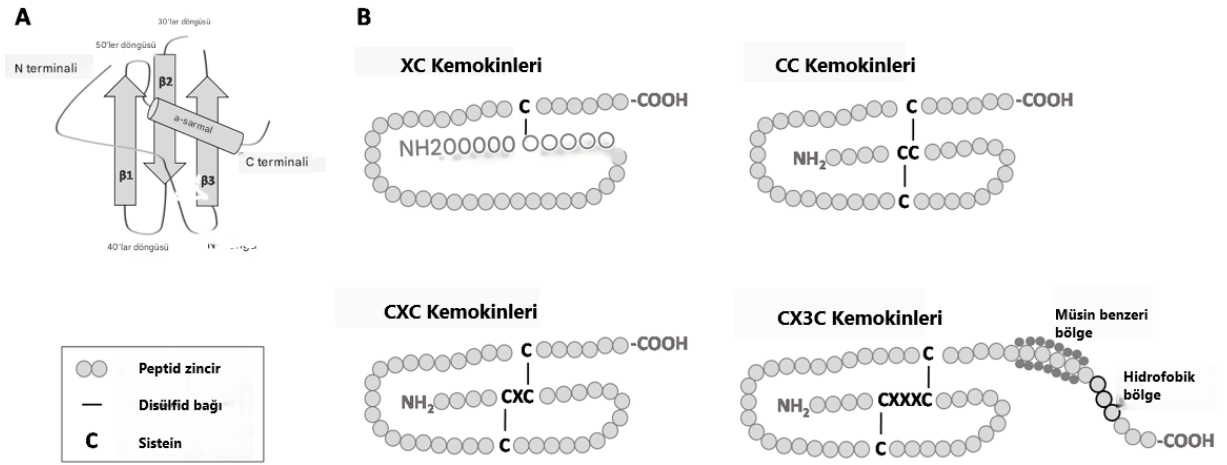
Craig Tuerk ve Larry Gold, T4 DNA polimeraz proteinine bağlanan RNA ligandlarını seçmek için kullanılan zenginleştirme sürecini tanımlamış ve bu yöntemle SELEX ismini vermişlerdir. Bu çalışma, rastgele dizilerin sistematik bir evrim süreciyle nasıl hedefe özgül hale getirilebileceğini kanıtlamıştır (Tuerk ve Gold., 1990). Andrew Ellington ve Jack Szostak, çeşitli organik boya moleküllerine bağlanan RNA dizilerini izole etmişlerdir. Bu çalışmada, Latince *aptus* (uygun/uyumlu) ve Yunanca *meros* (parça) kelimelerinden türetilen aptamer terimi ilk kez kullanılmıştır (Ellington ve Szostak., 1990). Kemerin molekülüne özgü aptamerlerin geliştirilmesine yönelik SELEX tabanlı herhangi bir çalışma literatürde bildirilmemiştir. Buna bağlı olarak da kemerin için aptamer tabanlı bir biyosensör bulunmamaktadır. Bu tezin konusu olan kemerine özgü aptamer seçimi ve SELEX sonrası geliştirilmesi, kemerin proteininin serumdaki tespiti ve terapötik olarak hedeflenmesi açısından ilk adımı oluşturmaktadır. Hastalıklarda kemerinin sahip olduğu ikili rolün anlaşılması ve kanda bulunan düzeylerinin tespitini kolaylaştırmak adına, kemerine özgü aptamer seçilmesi önemli olduğundan kemerine özgü aptamer geliştirilmesi, bu tezin ana konusunu teşkil etmektedir. Bu aptamer, ilerleyen aşamalarda geliştirilecek biyosensör sistemlerinin temel bileşeni olacak ve kemerinin hızlı ve özgül tespiti için yeni bir alternatif yöntem sunacaktır.

## 2.LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Kemokinler

Kemokinler, hücrel göçü kontrol eden küçük proteinlerdir. Memelilerde yaklaşık 50 üyeden oluşan geniş bir kemokin ailesi tanımlanmıştır (Laing & Secombes, 2004). Kemokinler yapısal olarak birbirleri ile ilişkilidir ve çoğu N-terminalinde dört değişmez sistein kalıntısı içerir. Bu sisteinlerin ilk ikisinin düzenlenmesine bağlı olarak kemokinler dört aileye ayrılır; CXC ( $\alpha$ ), CC ( $\beta$ ), XC( $\gamma$ ) ve CX3C ( $\delta$ ). CXC, CC ve CX3C kemokinleri, dört korunmuş sisteine sahiptir. XC kemokinleri ise tipik kemokin yapısının birinci ve üçüncü sisteinlerini içermez. Küçük bir CC kemokin alt grubu ise altı sisteine sahiptir. CXC ve CX3C kemokinleri, ilk iki sistein kalıntısı arasında bir amino asit bulunması durumunda CXC, ilk iki sistein kalıntısı arasında üç amino asit bulunması durumunda ise CX3C olarak sınıflandırılır. Ayrıca CX3C, mukin-benzeri bir sap aracılığıyla membrana bağlı olan tek kemokindir (Bazan vd., 1997). CC kemokinlerinde ise ilk iki sistein bitişiktir (Murphy vd., 2000) (Şekil 2.1). Geleneksel kemokin sınıflandırması temelde sistein motiflerinin dizilimini baz alsa da; kemerin, bu yapısal şablonlara tam uyum sağlamayan ancak fonksiyonel olarak güçlü kemotaktik özellikler sergileyen atipik bir örnektir. Sistein yerleşimi açısından klasik ailelerden ayrılmasına rağmen, lökosit migrasyonunu indüklemeye kabiliyeti ve GPCR reseptörleri üzerinden işlev görmesi nedeniyle, kemerinin fonksiyonel anlamda bu ailenin bir üyesi olarak tanımlanmasını sağlamaktadır (Wittamer vd., 2003; Zabel vd., 2005). Düzenlenme sonucu oluşan üç boyutlu yapı, reseptörlere bağlanma açısından özgünlük oluşturur. Kemokinler, pro-peptitler olarak üretilmektedir. Salgılanma sırasında parçalanarak G-protein-bağlantılı reseptörleri (GPZR) aktive eder ve bu şekilde işlev gören aktif olgun bir protein oluşturulur (Zlotnik vd., 2000; Murphy vd., 2000). Kemokinlerin biyolojik etkileri, GPZR süper ailesinin bir alt grubunu temsil eden yedi transmembran domainine sahip reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörlerin çoğu kromozom 2 ve 3 üzerinde yer alır (Zlotnik vd., 2000). Reseptörlerin N-terminalleri genellikle asidik özellik taşır ve sıklıkla, kemokin ligandlarının afinitesini ve etkinliğini modüle ettiği ve hatta seçicilikte rol oynadığı gösterilmiş olan tirozin kalıntıları içerir. Bu kalıntılar, translasyon sonrası sülfatlanır (Ludeman ve Stone, 2013). Reseptörlerin C-terminalleri ise, ligand bağlanmasıyla birlikte fosforilasyona katılan çok sayıda serin ve treonin kalıntısı içerir (Busillo vd., 2010). Kemokinler, enfeksiyon veya yaralanma bölgelerine hücre göçünü indükleyen geniş ve çok işlevli bir sitokin ailesidir. İşlevsel olarak kemokinler iki ana kategoriye ayrılır. Bazıları homeostatik olup sürekli olarak üretilir ve salgılanır. Bu kemokinler genellikle lenfosit

trafiğinde, bağışıklık gözetiminde ve lenfatik sistemde lenfositlerin antijenle lokalizasyonunda rol oynar. Diğer kemokinler ise yalnızca enfeksiyon sırasında veya pro-enflamatuar bir uyarana yanıt olarak üretilir. Beyaz kan hücrelerinin (lökositlerin) yaralanmış veya enfekte olmuş bölgeye göçünü teşvik eder. Bu tür inflamatuvar kemokinler, hücreleri aktive ederek bağışıklık yanıtını artırabilir ve yara iyileşme sürecini başlatabilir (Laing ve Secombes, 2004). Kemokinler, özellikle lökositlerin göçünü uyarma yetenekleriyle bilinir. Bu nedenle, kemokinler bağışıklık sisteminin gelişiminde ve homeostazında merkezi bir rol oynar. Koruyucu ya da yıkıcı tüm bağışıklık ve inflamatuvar yanıt süreçlerine dahil olurlar (Hughes ve Nibbs, 2018). Klasik kemokinlerin homeostatik ve inflamatuvar rolleriyle paralel olarak kemerin de plazmasitoid dendritik hücreler (pDC), makrofajlar ve doğal öldürücü hücrelerin inflamasyon bölgelerine göçünü kontrol ederek bağışıklık yanıtının koordinasyonunda görev alır (Wittamer vd., 2003; Zabel vd., 2005). Kemerin/CMKLR1 yolu, hem bağışıklık sistemi gözetiminde hem de obezite gibi düşük dereceli kronik inflamasyon durumlarında lökosit trafiğini düzenleyen kritik bir sinyal yolunu temsil eder (Bondue vd., 2011).

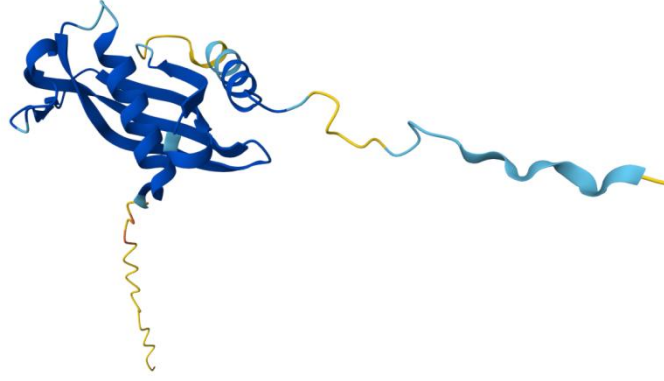


**Şekil 2.1.** Kemokinlerin 4 alt grubunun şematik gösterimi. A: Kemokinlerin genel yapısı. B: Kemokin alt gruplarında sistein motiflerinin şematik gösterimi (Viciano, 2019: 23).

## 2.2. Kemerin

Kemerin proteini ilk olarak 1997 yılında, tazarotenle indüklenen gen-2 (*TIG2*) geni tarafından kodlanan bir protein olarak tanımlanmıştır (Nagpal vd., 1997). *TIG2*, şimdiye kadar dizilenen tüm tetrapodlarda bulunmuştur. Bu gen, 6 ekzon içerir ve bunlardan 5'i protein dizisi kodlar. İntron ve ekzon düzeni ile kodlanan protein dizileri korunmuştur (Zhao vd., 2022). Bu da kemerinin tetrapod biyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. İnsanlarda, *TIG2* lokusu 7. kromozomun antisens ipliğinde bulunurken, farelerde bu gen 6. kromozomda yer almaktadır. Tazaroten, retinoid yapılı bir ilaç olup retinoik asit reseptörlerine bağlanarak hücre yenilenmesini teşvik eder. *TIG2*'nin, retinoidlere bağımlı bir şekilde deri tabakalarında ve psoriatik lezyonların (sedef hastalığı) epidermisinde indüklendiği gösterilmiştir. Buna karşılık, *TIG2* ifadesi, keratinosit ve fibroblastların iki boyutlu kültürlerinde tespit edilememiştir. Dolayısıyla *TIG2*, yalnızca psoriatik lezyonlarda (sedef hastalığında görülen iltihaplı deri lezyonları) oluşan üç boyutlu doku yapısı sırasında retinoidler aracılığıyla indüklenebilen spesifik bir retinoid yanıtı gen olarak ilk kez tanımlanmıştır (Nagpal vd., 1997). *TIG2* geni ayrıca retinoik asit reseptörü yanıtlayıcı 2 (*RARRES2*) ve kemerin olarak da isimlendirilir. Fakat kemerin yalnızca deri tabakalarında işlev görmez. Son yıllarda yapılan birçok çalışma, kemerinin başta beyaz yağ dokusu olmak üzere karaciğer, böbrek, pankreas, akciğer, yumurtalık, hipofiz ve plasenta gibi çeşitli dokularda eksprese edilen bir protein olduğunu göstermiştir (Çelik ve Söğüt., 2019). Ayrıca ters farmakoloji taraması kullanılarak, insan hemofiltratından oluşturulan bir peptit kütüphanesi ile *TIG2*, Kemokin benzeri reseptör 1 (CMKLR1)'in doğal ligandı olarak izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Meder vd., 2003). G protein bağlı bir reseptör olan CMKLR1 reseptörü daha sonra Kemerin reseptör 23 (ChemR23) olarak adlandırılmıştır (Wittamer vd., 2003).

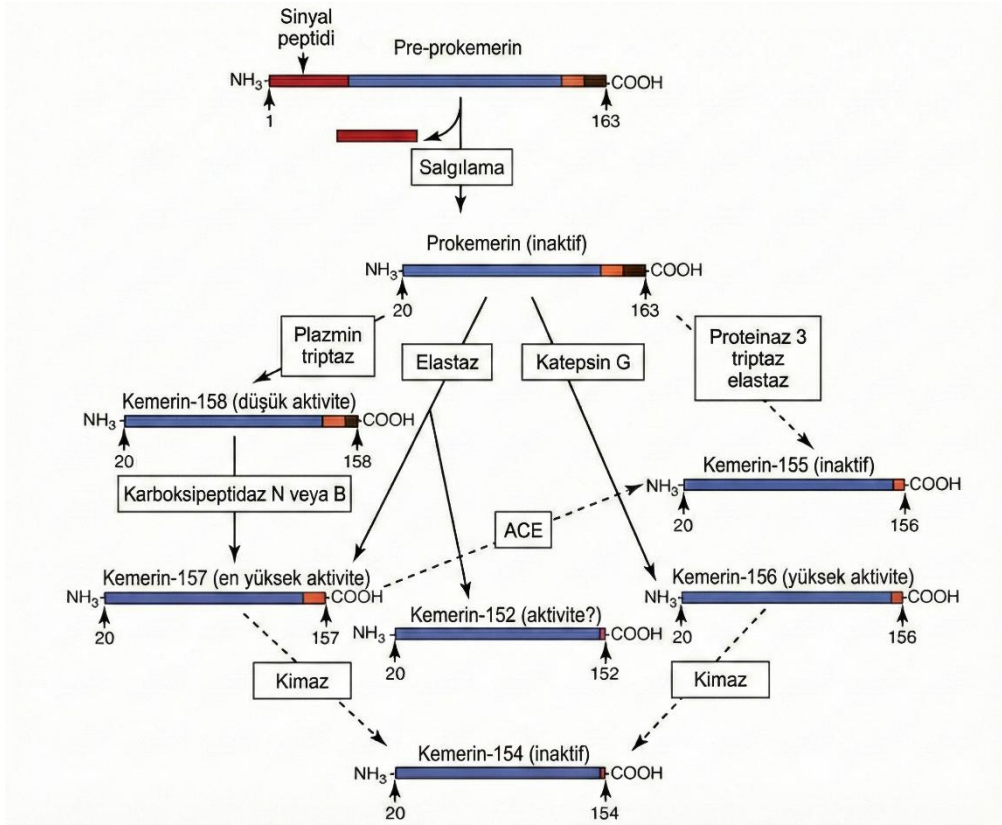
*TIG2* geni, 163 amino asitlik (16 kDa) bir Pre-prokemerin (Şekil 2.2) kodlar ve proteoliz yoluyla N-terminal sinyal peptidinin (20 amino asit) çıkarılması sonucu Prokemerin (amino asit 21-163) haline gelir. Bu form, inaktif form olduğu için biyolojik aktivitesi oldukça düşüktür fakat bazal durumda bulunan protein izoformudur (Şekil 2.3) (Lavis, Bondue ve Cardozo, 2024; Zabel vd., 2005). Sinyal peptidinin kesilmesi, inaktif öncül protein olan kemerin-S163'ün hücre dışı ortamda serbest bırakılmasına yol açar.



Şekil 2.2. Pro-kemerinin 3 Boyutlu modeli. (Jumper vd., 2021)

Öncül protein, aktif kemerin oluşturmak için farklı yerlerde daha fazla hücre dışı C-terminal kesimlere ihtiyaç duyar. C-terminalden 6-7 amino asitlik bir kısmın proteolitik olarak çıkarılmasıyla olgun kemerin (kemerin21-157 ve kemerin21-156) formuna dönüşür ve bu form kemotaktik aktivite kazanır (Liu vd., 2024). Örneğin, plazmin, elastaz ve katepsin G gibi proteazlar, kemerini aktive eder ve çeşitli izoformlar üretir: kemerin-K158, -S157 ve -F156. Aktif kemerinin kimaz tarafından daha fazla parçalanmasıyla kemerin-F154 oluşur ve bu işlem kemerinin aktivitesini sonlandırır (Şekil 2.3) (Mattern vd., 2014). Böylece, farklı serin ve sistein proteazlar tarafından işlenen birçok Kemerin izoformu tanımlanmıştır, ancak bu farklı formların rolleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu tez çalışmasında, yüksek aktiviteye sahip olan kemerin E21-S157 (Kemerin-S157) izoformu deneysel amaçla kullanılmıştır. Elastaz, katepsin L ve K, prokemerini C terminalinden 6 amino asit keserek Kemerin -S157 izoformunu oluşturur. Ayrıca yapılan çalışmada S157 formunun *Enterobacteriaceae*'ye karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği gösterilmiştir (Kulig vd., 2011). Kemerin-S157 formu, insan vücudunda serum sıvısında bulunan nötrofil, makrofaj ve plazmositoid dendritik hücreler için ligand olarak bulunur. Bunun dışında deri ve karaciğer hücrelerinde de S157 formu bulunmaktadır. İlginç bir şekilde, C-terminal kesilme derecesi, kemerinin izole edildiği yere bağlı olarak değişir. Örneğin, insan yumurtalık sıvısından elde edilen kemerin altı, serumdan elde edilen sekiz ve hemofiltrat sıvısından elde edilen dokuz C-terminal amino asitten yoksundur. Bu bulgular, birçok enzimin kemerini aktif bir forma işleyebileceğine dair gözlemlerle uyumludur (Wittamer vd., 2003; Meder vd., 2003). *In vitro* çalışmalar, katepsin G'nin Prokemerinden yedi C-terminal amino asidi, elastazın altı, sekiz veya on bir, plazminin beş ve triptazın beş veya sekiz amino asidi kesebildiğini göstermiştir (Şekil 2.3) (Ernst ve Sinal, 2010). Bazı durumlarda, Kemerinin tamamen aktif hale gelmesi

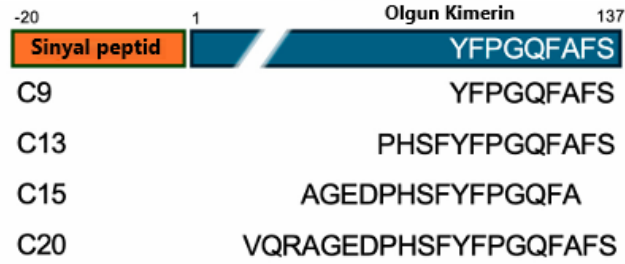
için birden fazla kesilme gereklidir. Örneğin, triptazın 158. amino asitte yaptığı bir ilk kesim, çok düşük aktiviteye sahip bir Kemerin üretir. Ancak bu ürün, karboksipeptidaz N veya B tarafından yapılan ikinci bir kesim için bir substrat haline gelir ve biyolojik olarak aktif Kemerini oluşturur (Şekil 2.3) (Ernst ve Sinal, 2010).



Şekil 2.3. Kemerinin farklı enzimlerle işlenerek farklı formlarda üretilmesi. (Ernst ve Sinal, 2010).

Kemerinden türeyen bir dizi sentetik peptit de tanımlanmıştır (Şekil 2.4). Bu peptitler arasında, kemerinin C-terminal nonapeptidi; Y<sup>129</sup>FPGQFAFS<sup>137</sup> (C9), olgun kemerinin biyolojik aktivitesinin tamamını gösterir ve genellikle hücre temelli çalışmalarda kemerinin yerine geçen bir ligand olarak kullanılır. C9, CMKLR1 ve G protein-bağlı reseptör 1 (GPR1) üzerine bağlanarak çeşitli tepkiler oluşturur (Barnea vd., 2007; Wittamer vd., 2004). C9 peptidi, kltrin-bağımsız bir mekanizma yoluyla CMKLR1'in internalizasyonunu (hücre içine alınmasını) indüklediği gösterilmiştir (Zhou vd., 2014). Daha uzun yarı ömrü sayesinde, kimyasal olarak modifiye edilmiş C9 peptidi, CMKLR1'in canlı organizmalarda izlenebilmesi amacıyla tasarlanmış bir hedefleme molekülü olarak geliştirilmiştir (Mannes vd., 2023).

C9'un, iskemik inme sırasında nöronal piroptozu (inflamatuvar etkili hücre ölümü) azalttığı bulunmuştur. Bu da C9'un inflamasyon üzerindeki daha karmaşık düzenleyici bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Liu vd., 2024). Kemerinin C-terminal 13-peptidi olan C13 ( $P^{125}HSFYFPGQFAFS^{137}$ ), C9'dan biraz daha uzundur ve hem CMKLR1 hem de GPR1'i aktive edebilir. Kemerinden türetilen bir diğer sentetik peptit olan C15 ( $A^{121}GEDPHSFYFPGQFA^{135}$ ), C9 peptidinin son iki amino asidini içermez, ancak CMKLR1'i aktive etme ve anti-inflamatuvar etkiler gösterme yeteneğini korur (Cash vd., 2010). Kemerinin C-terminal 20 amino asidini kapsayan C20 peptidi ( $V^{118}QRAGEDPHSFYFPGQFAFS^{137}$ ), CMKLR1 reseptörünü aktive edebilen fonksiyonel bir ligandır. Bu peptit, kemotaksis aktivitesi bakımından tam uzunluktaki kemerin proteinine benzer özellikler gösterse de biyolojik etkinliği nispeten daha düşüktür (Li vd., 2014). Bu biyolojik olarak aktif insan kemerin türevli sentetik peptitler, Kemerinin C-terminal bölgesinin reseptör aracılı işlevler üzerindeki önemini vurgulamaktadır. Örneğin, sadece 2 amino asidin çıkarılması (C15 durumunda) bile belirgin bir şekilde anti-inflamatuvar etki oluşturabilmektedir.



**Şekil 2.4.** Kemerinden türetilen C-terminal peptitleri. N-terminal sinyal peptidi (amino asit -21'den -1'e kadar) turuncu ile işaretlenmiştir. Kemerinin olgun formu (amino asit 1-137), mavi ile işaretlenmiştir. Kemerine ait C-terminal peptitler listelenmiştir (Liu vd., 2024).

### 2.2.1. Kemerin Reseptörleri

Kemerin, biyolojik işlevlerini, GPZR reseptörleri olan CMKLR1, GPR1 ve CC motif reseptör benzeri 2 (CCRL2) ile bağlanarak gerçekleştirir. Bu reseptörlerden CMKLR1 ve GPR1, kemerinin sinyal iletiminde kullanılan reseptörleri olarak doğrulanmışken, CCRL2, transmembran sinyalizasyonu olmaksızın bir Kemerin bağlayıcı protein olarak işlev görmektedir (Liu vd., 2024).

### 2.2.2. CMKLR1 (ChemR23) (Chem1) Reseptörü

CMKLR1, başlangıçta orphan (doğal ligandı henüz tanımlanmamış) bir GPZR olarak tanımlanmıştır ve Kemerinin bildirilen ilk reseptörüdür (Wittamer vd., 2003). CMKLR1 ekspresyonu hematopoetik dokular (Gantz vd., 1996), adipositler (Goralski vd., 2007), endotel hücreleri (Kaur vd., 2010) ve vasküler düz kas hücrelerinde (Ho vd., 2010) doğrulanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan kemerinS157 ve kemerinF156, CMKLR1 reseptörüne yüksek afinite gösterirken, prokemerin, kemerinK158 ve kemerinF154 gibi diğer izoformlar çok daha düşük bir afiniteye sahiptir (Mattern vd., 2014). CMKLR1, kemerinden türetilen ve benzer aktiviteye sahip en kısa peptit olan C9' a da yanıt verir (Wittamer vd., 2004). CMKLR1'in kemerin ve türevleri tarafından aktive edilmesi, adenil siklaz (AC) inhibisyonuna yol açar ve hücre içindeki döngüsel AMP (cAMP) seviyesini düşürür. CMKLR1'in Kemerin ve C9 ile aktivasyonu ayrıca kalsiyum mobilizasyonuna, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) fosforilasyonuna ve RhoA aktivasyonuna yol açar. Bunun yanı sıra, CMKLR1, aktivasyonu takiben reseptörün desensitizasyonu (aşırı uyarılma sonucu duyarsızlaşma) ve internalizasyonu (içselleştirme) için  $\beta$ -arrestin'i de aktive edebilir (Şekil 2.5) (Liu vd., 2024). Kemerinin CMKLR1'e bağlanması, bağışıklık hücrelerinin kemotaksisi ve adiposit farklılaşmasının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işlevi yönlendirir (Wittamer vd., 2003). Özellikle, CMKLR1'in dendritik hücreler (DC'ler) ve makrofajlardaki ekspresyonu, bu hücrelerdeki işlevlerini vurgular. Kemerin, pro-inflamatuar bir kemotaktik madde olarak, inflammatuar sinyallere yanıt olarak DC'lerin ve makrofajların CMKLR1 aracılığıyla göçünü sağlar (Kennedy ve Davenport, 2018). Bağışıklık sisteminin dışında, CMKLR1 ve kemerin, yağ dokularında yüksek düzeyde eksprese edilir. Kemerin ile CMKLR1 aktivasyonu, adipogenez, insülin sinyalleşmesi ve adiposit metabolizmasını düzenler (Goralski ve Sinal, 2009). Kemerin ve CMKLR1'in endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerindeki ekspresyonu göz önüne alındığında, kemerin-CMKLR1 etkileşiminin kardiyovasküler sistemdeki rolü ortaya çıkarılmıştır (Bozaoglu vd., 2010). Yayımlanmış sonuçlar, Kemerinin CMKLR1 aracılığıyla anjiyogenezi teşvik ettiğini ve bunun kanser ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Treeck vd., 2019).

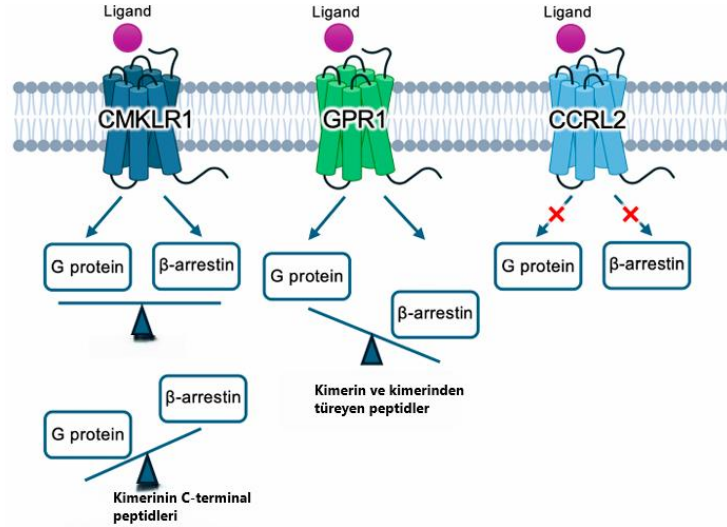
### 2.2.3. GPR1 (Chem2) Reseptörü

GPR1, gen klonlama çalışmaları sırasında orphan bir reseptör olarak sınıflandırılmış; ancak daha sonra kemerini bağlayan bir reseptör olduğu belirlenmiştir (Marchese vd., 1994). GPR1'in, CMKLR1 ile %70'ten fazla dizi benzerliği vardır ve kemerinden türetilmiş C9 peptidini bir ligand olarak tanır (Rourke vd., 2014). Tango™ GPZR testi (Life Technologies)

kullanılarak ligand bağlanması ölçüldüğü bir çalışmada, GPR1 için EC50 değeri 0.24 nM, CMKLR1 için ise 3 nM olarak belirlenmiştir. Bu sonuç kemerin GPR1'i aktive etme kapasitesinin CMKLR1'den daha yüksek olduğunu gösterir (Barnea vd., 2007). C9, GPR1'e nanomolar düzeyde yüksek bir afiniteyle bağlanır. Olgun kemerin ve C13 peptidi, GPR1 aracılığıyla nanomolar düzeyde güçlü bir şekilde  $\beta$ -arrestini aktive eder (Barnea vd., 2007).  $\beta$ -arrestin ise hücrede, reseptör internalizasyonu ve desensitizasyonu sağlar (Şekil 2.5). GPR1'in glikoz regülasyonu, kardiyovasküler hastalıklar ve steroid hormon sentezi gibi süreçlerde rol oynadığı düşünülmektedir (Liu vd., 2024). CMKLR1'den farklı olarak, GPR1, kemerinin damar daraltıcı etkisinde yer almaz (Kennedy vd., 2016).

#### **2.2.4. CCRL2 Reseptörü**

CCRL2, kemerin ile etkileşime giren ancak sinyal iletmeyen bir diğer reseptördür (Zabel vd., 2008). CMKLR1 ve GPR1'in aksine CCRL2, kemerin ve onun peptit türevlerine bağlandığında hücre zarından geçen bir sinyal iletimi başlatmaz (Şekil 2.5). Bunun yerine CCRL2, kemeri bağlayan ancak hücre içi sinyal iletimine aracılık etmeyen düzenleyici bir reseptör olarak tanımlanmıştır. Böylece dokulardaki kemerin seviyelerini düzenler. Atipik bir kemokin reseptörü olarak kabul edilen CCRL2; monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller, T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri ve CD34+ kemik iliği öncül hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilir (Yoshimura ve Oppenheim, 2011).



**Şekil 2.5.** Üç kemerin reseptörünün şematik gösterimi ve aşağı yönlü sinyal yolları. Kemerinin CMKLR1'e bağlanması, G proteini ve  $\beta$ -arrestin sinyal yollarının dengeli bir şekilde aktive olmasına neden olur. Kemerin, CMKLR1 aracılığıyla G proteine bağımlı sinyallemeyi tetikler. GPR1, kemerin ve C9 peptidi tarafından aktive edilir ve  $\beta$ -arrestin ağırlıklı bir sinyal yanıtı üretir. Kemerin CCRL2'ye bağlanır, ancak aşağı yönlü bir sinyal yolunu indüklemeyiz (Liu vd., 2024).

## 2.3. Kemerin Proteininin Fizyolojik Rolü

### 2.3.1. Lipit Metabolizması, Obezite ve Tip 2 Diyabet (T2D)

Obezite, aşırı yağ dokusunun birikmesiyle karakterize edilen ve değiştirilebilir (örneğin; diyet, davranış, çevre) ve değiştirilemez (genetik) faktörlerin etkileşimi sonucu gelişen bir durumdur. Obezite ve T2D, salgın seviyelere ulaşmış olup, gelişmiş ülkelerin yıllık sağlık harcamalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Obezitenin T2D diyabet gelişimi için birincil risk faktörü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (American Diabetes Association, 2026). Obezite ve T2D arasındaki nedensel bağlantıya katkıda bulunduğu düşünülen iki önemli faktör, kronik inflamasyon ve adipoz doku kaynaklı sinyal moleküllerinin (adipokinler) salgılanmasındaki değişikliklerdir. Günümüzde beyaz yağ dokusunun yalnızca uzun vadeli bir enerji deposu olmadığı, aynı zamanda birçok biyoaktif molekül salgılayan aktif bir endokrin organ olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Bu moleküller, topluca adipokinler olarak adlandırılmaktadır (Poulos vd., 2010). Adipokinler, yağ dokusunun gelişimi ve işlevinin önemli düzenleyicileridir. Çeşitli dokularda glikoz metabolizması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve sistemik düzeyde genel enerji dengesini etkiler (Ouchi vd., 2011). Kemerin proteini, bağışıklık hücreleri için bir kemotaktik ajan olup adaptif ve doğuştan gelen bağışıklıkta rol oynar (Rourke vd., 2013).

Kemerin ayrıca anjiyogenez, adipogenez ve enerji metabolizmasını düzenleyen bir adipokin olup, bu proteinin çok yönlü işlevlerini göstermektedir (Buechler vd., 2019). Kemerin seviyelerinin obezite ile ilişkili fenotiplerle, örneğin insülin direnci, vücut kitle indeksi (BMI) ve serum trigliseritleri ile pozitif ilişki göstermesi, bu adipokinin metabolik hastalıklardaki işlevini gündeme getirmektedir (Rourke vd., 2013). Pek çok adipokinin dolaşımdaki seviyelerinin yağ kütlesiyle birlikte değiştiği bilinmektedir ve bunun, obeziteyle sıklıkla birlikte görülen ve nihayetinde T2D'nin gelişimine yol açan olumsuz metabolik değişikliklere katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Sell ve Eckel, 2009). Bu değişen adipokin seviyelerinin T2D'ye katkıda bulunmasının bir mekanizması, inflamasyon aracılığıyla gelişen insülin direncidir. Örneğin, obeziteyle ilişkili yüksek seviyelerdeki proinflamatuvar sitokinler, normal yağ dokusu fonksiyonunu bozan kronik inflamasyon durumunun gelişimine sebep olur. Yağ dokusunun fonksiyonunu kaybetmesinin insülin duyarlılığını nasıl etkilediği tam olarak anlaşılamamış olsa da çeşitli insülin sinyal yollarının (örneğin; insülin reseptörü, insülin reseptör substrat-1) serin/treonin kinazları tarafından fosforilasyonu ve bu yolların düzenlenmesi bu mekanizmaya dahil edilmiştir (Roman vd., 2012). Kemerinin serum seviyelerinin obezite, T2D ve/veya metabolik sendrom bileşenlerine sahip hastalarda arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (El-Mesallamy vd., 2011; Stejskal vd., 2008; Weigert vd., 2010; Yang vd., 2010). Dolaşımdaki kemerin seviyelerinin ayrıca tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6) ve C-reaktif protein (CRP) gibi inflamasyon belirteçleriyle doğru orantılı bir ilişki gösterdiği bildirilmiştir (Weigert vd., 2010).

Kemerin ve obezite arasındaki ilişkiyi ilk inceleyen araştırmalar, Meksikalı-Amerikalı obez ve fazla kilolu hastalarda plazma kemerin seviyelerinin, sağlıklı ve zayıf bireylerden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca kemerin seviyelerinin vücut kitle indeksi (BMI), açlık insülin seviyesi, açlık glikoz seviyesi, plazma trigliserit seviyesi ve toplam serum kolesterol seviyeleri ile pozitif ilişki gösterirken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyeleri ile negatif ilişki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Bozaoglu vd., 2007). Yağ kitlesi ile kemerin seviyelerinin ilişkilendirildiği bir diğer çalışmada ise, kalorik kısıtlama veya bariatrik cerrahi gibi kilo verme yöntemlerinden geçen hastaların, kilo verme müdahalesi geçirmeyen obez bireylere kıyasla belirgin şekilde daha düşük serum kemerin seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Chakaroun vd., 2012; Ress vd., 2010; Sell vd., 2010). İnsülin direnci, T2D ve visseral yağlanma görülen polikistik over sendromlu (PCOS) bireylerde deri altı ve karın içi yağ dokularında kemerin seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Tan vd., 2009). Bu çalışmalarla doğru orantılı olarak 2023 yılında yapılan bir çalışmada, obezite ve

T2D gibi metabolik hastalıkları olan hastalarda serum kemerin düzeylerinin, egzersiz seansları ile azaldığı gösterilmiştir (Ashtary-Larky vd., 2023). Obezite durumunda görülen kemik erimesi ve kırılma üzerine kemerin etkileri de ortaya konmuştur. Yapılan araştırma, T2D farelerinin süngerimsi kemiklerinde kemik mikroyapısının ve kemik kütlesinin egzersize bağlı iyileşmelerinde azalmış kemerin seviyesinin rolünü göstermiştir (Yu vd., 2025). Gebeliğe bağlı olarak gelişen diyabet durumunda (GDM), benzer olarak kemerin seviyelerinde artış gözlenmektedir (Okten ve Bildacı, 2020). Bunun sonucunda da GDM için belirteçlerden biri olabilmektedir. Obez yabancı tip farelerde, orta yoğunlukta aerobik egzersizin serum Kemerin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı, insülin salınımını sağlayan glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) sekresyonunu arttırdığı ve glikoz toleransını, pankreas  $\beta$  hücre yapısını, fonksiyonunu ve apoptozu iyileştirdiği de gösterilmiştir (Zhang vd., 2025). Literatürdeki çalışmalar, obezite ile serum kemerin seviyeleri arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Fakat dolaşımdaki kemerin seviyelerinin artmasının, yağ dokusu artışıyla mı sınırlı olduğu, yoksa inflamasyon ve/veya insülin direncindeki değişimlerle de bağlantılı mı olduğu kesin olarak belirlenememiştir (Lehrke,2009; Sell vd., 2009).

### 2.3.2. İnflamasyon

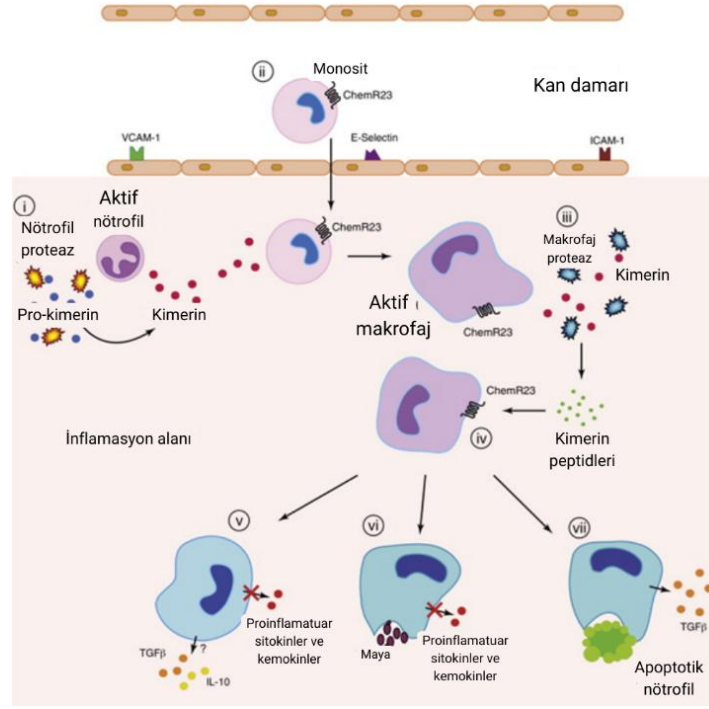
Kemerin, adiposit dokudan salgılanan bir adipokin olmasının yanı sıra, makrofajlar ve plazmasitoid dendritik hücreler üzerinde bulunan CMKLR1'e bağlanan ve kemotaksisi teşvik eden proinflamatuvar bir proteindir (Yoshimura ve Oppenheim, 2008). Kemerin ile inflamasyon arasındaki bağlantıya dair ilk bulgular, Wittamer ve grubu tarafından rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada, romatoid artrit hastalarının sinovyal sıvısında ve yumurtalık kanseri olan hastaların asit sıvısında yüksek kemerin konsantrasyonları tespit edilmiştir (Wittamer vd., 2003). Aynı zamanda, CMKLR1 reseptörünün makrofajlar ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerde eksprese edildiğini ve bu hücreler üzerinde kemotaktik bir etki yarattığı gösterilmiştir (Wittamer vd., 2003). Bir diğer çalışmada, plazma kemerin seviyelerinin romatoid artrit hastalığının hastalık aktivite düzeyi ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemiş ve kemerin romatoid artritte bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. İlginç bir şekilde, araştırmacılar kemerin konsantrasyonu ile vücut kitle indeksi arasında bir korelasyon tespit etmiş ve obezite ile ilişkili sistemik inflamasyonun, artan yağ dokusundan ziyade, Kemerin seviyelerinin yükselmesine neden olabileceğini öne sürmüşlerdir (Zheng vd., 2014). Herenius ve arkadaşları ise serum Kemerin konsantrasyonu ile BMI arasında hiçbir ilişki bulamamış, ancak romatoid artrit aktivite seviyeleri ile kemerin

seviyeleri arasında pozitif korelasyon rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, CRP ve IL-6 gibi inflamatuvar belirteçlerin seviyeleriyle birlikte hem hastalık aktivite seviyelerinin hem de kemerin seviyelerinin TNF- $\alpha$  antikoru olan adalimumab ile 16 haftalık tedavi sonrası azaldığı gösterilmiştir (Herenius vd., 2013). Kemerinin olgunlaşma aşamalarında bahsedilen ve Kemerini C-terminalinden kesen katepsin G, elastaz ve triptazın inflamasyonla ilişkili çeşitli proteazlar oldukları da bilinmektedir (Gibson vd., 1999).

Tüm bu veriler, kemerinin proinflamatuvar (iltihap artırıcı) işlevinin güçlü bir şekilde kanıtlandığını ortaya koymaktadır. Çoğu çalışma Kemerinin proinflamatuvar bir rol oynadığını gösterse de antiinflamatuvar etkilere sahip olabileceğini öne süren veriler de vardır. Farelerde inflamasyon modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, kemerin 140–154 peptidinin karın içine enjeksiyonunun, CMKLR1'e bağlı bir mekanizma ile nötrofil ve monosit göçünü azaltarak zymosan ile indüklenen peritonite (karın içi enfeksiyonu) karşı fareleri koruduğu gösterilmiştir (Cash vd., 2008). Kemerini, adipositokin olarak tanımlayan bir çalışmada, vasküler endotel hücrelerde kemerinin antiinflamatuvar etkiler yarattığı gösterilmiştir. Çalışmada, insan göbek kordonu ve endotel hücrelerinin Kemerin (300 ng/mL, 20 dk) ile muamelesi, Akt (Ser473) ve endotel nitrik oksit (NO) sentaz (eNOS) (Ser1177) fosforilasyonunu indüklemiştir. Bu fosforilasyon aşamaları nitrik oksit üretimini artırarak monositlerin, TNF- $\alpha$  ile uyarılmış endotel hücrelere yapışmasını engeller. Bu sayede endotel hücrelerde inflamasyon etkisi azalır (Yamawaki vd., 2012). Endotel hücreleri hedef alan başka bir çalışmada, *Treponema pallidum* ile yapılan in vitro etkiden sonra endotel hücrelerde kemerin seviyesinin arttığı gözlenmiştir. *T. pallidum*, treponemal hastalıklar denilen frengi, benek hastalığı, frambezi ve ekvator frengisi gibi hastalıklara neden olan spiroket türü bir bakteridir. Tp0965 (*T. pallidum* membran proteini) tarafından indüklenen kemerin, THP-1 türevli makrofajların endotel hücrelere göçünü teşvik etmiş ve bu süreç Kemerin/ChemR23 yolu üzerinden gerçekleşmiştir. Bu bulgular, Tp0965 tarafından indüklenen kemerinin endotel disfonksiyondaki rolünü vurgulamakta ve bu mekanizmanın frengi hastalığının vasküler inflamasyonunun immünopatogenezine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Diğer bir çalışmada, inflamasyon esnasına kemerinin antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özellikler gösteren daha kısa peptitlere dönüştürüldüğü gözlenmiştir. Kemerinden türetilen C15 peptidi, ChemR23 reseptörü aracılığıyla inflamasyonu sonlandırmak için makrofaj aktivasyonunu baskılamış ve apoptotik hücrelerin temizlenmesine aracılık etmiştir (Şekil 2.6) (Cash vd., 2014). Bu nedenle, kemerinin inflamasyonun

başlamasında kritik bir rolü olsa da bazı durumlarda antiinflamatuvar bir etken olarak da rolü bulunmaktadır.



**Şekil 2.6.** Kemerinin inflamasyonla ilişkili hüresel yolları. i) Prokemerin, inflamasyon bölgesinde nötrofillerin degranülasyonu ile salınan proteolitik enzimler tarafından parçalanarak güçlü bir kemotaktik protein olan aktif kemerine dönüşür. ii) Kemerin, dolaşımdaki monositler ve doku makrofajları üzerindeki ChemR23 reseptörüne bağlanarak bu hücreleri inflamasyon bölgesine çeker. iii) Aktive olan makrofajlar, patojenleri yok etmek ve sindirmek için proteolitik enzimler salgılar. Ancak, aynı zamanda kemerini de parçalayarak; iv) ChemR23 ile etkileşime girmek üzere, aktive olmuş monosit türevi makrofajları anti-inflamatuvar fenotipe yönlendiren güçlü anti-inflamatuvar peptitleri oluştururlar. v) Makrofajlar tarafından proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonu baskılanır ve IL-10 ve TGF- $\beta$  dahil olmak üzere antiinflamatuvar ve yara onarım sitokinleri indüklenir. Kemerin peptitleri (ör. C15), inflamatuvar bölgedeki patojenlerin (vi) ve apoptotik hücrelerin (vii) etkili bir şekilde temizlenmesini teşvik eder, böylece normal doku yapısının ve fonksiyonunun restorasyonuna yardımcı olur (Cash vd., 2014).

### 2.3.3. Bağışıklık

Kemerin, bağışıklık hücrelerinin kemotaksisini indükleyen bir proteindir. Kemerin reseptörleri monositler/makrofajlar, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK) ve dentritik hücreler gibi farklı bağışıklık hücrelerinde bulunur. Kemerinin, CXCL8 (IL-8) ile karşılaştırıldığında, NK hücrelerinin göçünü indüklemek için yaklaşık 20 kat daha güçlü bir etki gösterdiği kanıtlanmıştır, oysa IL-8, insanlardaki en güçlü kemotaktik faktörlerden biridir (Parolini vd., 2007). *In vivo* çalışmalar, NK hücrelerinin aktivasyonunun, yalnızca kısa süreli hücre uyarımı sırasında CMKLR1 ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu ortaya

koymuştur. Parolini ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmaya göre, NK hücreleri uzun süre uyarıldığında CMKLR1'in kaybolduğu ve Kemerin/CMKLR1 sinyalinin, NK hücrelerinin enfeksiyon/iltihap sürecinin erken aşamalarında sadece hücrelerin çekilmesinde rol oynadığını öne sürmüştür (Parolini vd., 2007). Kemerinin immüno-regülatör rolü yalnızca NK hücreleriyle sınırlı değildir, aynı zamanda NK hücreleri ve DC'lerin Liken planus hastalığının inflamatuvar sürecindeki etkileşimlerinde de önemli olabilmektedir (Parolini vd., 2007). Liken planus, genellikle cilt, ağız içi, genital bölgeler ve tırnaklarda ortaya çıkan, iltihaplı ve kaşıntılı bir deri hastalığıdır. Hastalık, bağışıklık sisteminin cildin veya mukoza zarlarının sağlıklı hücrelerine karşı anormal bir şekilde tepki vermesi sonucu gelişir. Hem NK hücreleri hem de DC'lerin CMKLR1 ekspresyonu gösterilmiş ve her iki bağışıklık hücre tipinin aktif liken planus'ta ko-lokalizasyonu gözlemlenmiştir. Dahası, kemerin ekspresyonu, aktif liken planus dokularında kan damarlarını kaplayan endotelial hücrelerde gösterilmiştir, bu da kemerinin cilt iltihaplanması sırasında NK hücreleri ve DC'lerin çekilmesindeki potansiyel rolüne işaret etmektedir. Sadece CMKLR1'in değil, aynı zamanda CCRL2'nin de iltihaplanma sırasında bağışıklık hücrelerinin toplanmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Del prete ve ekibi, akut inflamasyon süresince periton bölgesine yönlendirilen nötrofillerde CCRL2 ekspresyonunun arttığını bildirmiştir (Del Prete vd., 2019). Ek olarak, lipopolisakkarit (LPS) ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tarafından aktive edilen kemik iliği kaynaklı makrofajlar (BMM'ler) kullanılarak yapılan *ex vitro* çalışmalar, tedavi edilmemiş BMM'lere göre daha yüksek CCRL2 ekspresyonu ortaya koymuştur. Ayrıca, bağışıklık hücrelerinin ötesinde, Maheshwari vd., bağırsak epitelyal hücrelerinin kemerin üretme kapasitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Maheshwari vd., 2009). Örneğin, bu hücreler, fetal bağırsakta 10 ile 14 hafta arasında kemerin ekspresyonunu artırmışlardır. Ayrıca, Maheshwari ve arkadaşları mikro-kemotaksis deneyiyle fetal bağırsakta artmış kemotaktik aktivite olduğunu göstermiştir. Bu aktivitenin, fetüsün anne karnındaki gelişim süresini ifade eden gestasyonel yaşla ilişkili olduğu bulunmuş ve anti-kemerin antikor uygulaması ile bu aktivite baskılanmıştır (Maheshwari vd., 2009). Kemerin ayrıca, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık arasında bir bağlantı olarak işlev gören bir kemoatraktan faktördür.

#### 2.3.4. Kanser

Kemerinin kanser üzerindeki etkisi tartışmalıdır, çünkü hem anti-tümöral hem de tümör teşvik edici etkiler gösterebilir. Bu etkiler, doğuştan gelen bağışıklık savunmalarını harekete geçirme veya endotelial anjiyogenezin aktivasyonu gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Treeck vd., 2019). Kemerin; reseptörleri CMKLR1, GPR1 ve CCRL2 aracılığıyla immün hücre göçünü teşvik eden önemli bir kemotaktik faktördür ve bu sayede tümör büyümesini baskılar. Anti-tümöral etkili bağışıklık hücreleri, tümörlerin büyümesini yavaşlatabilir. Bağışıklık sistemini uyaran dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve sitotoksik T hücreleri bu savunmada önemli rol oynar. Öte yandan, kanser hücreleri, immüno-supresif düzenleyici T hücreleri (Treg) veya miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreleri (MDSC) tümör bölgesine çekerek bağışıklık tepkisinden kaçabilir ve sitotoksik anti-tümör yanıtları baskılayabilir. Tümör ilerlemesini belirleyen temel faktör, pro-tümöral ve anti-tümöral lökositler arasındaki dengedir (Galon vd., 2013). Kemerinin plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDC) göçünü teşvik ettiği gösterilmiştir (Wittamer vd., 2005). Bu dendritik hücre alt grubu, Tip I interferonlar (IFN) üretir ve doğuştan gelen (innate) ve kazanılmış (adaptive) bağışıklık yanıtlarında ve kanserde önemli bir role sahiptir. Kansere bağlamında, pDC'lerin azalmış veya tamamen kaybolmuş IFN üretimi sergilediği ve immüno-supresif tümör mikroçevresinin oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Mitchell vd., 2018).

Kemerinin VEGF'yi (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) yukarı regülasyonunu tetiklemesi, bu adipokinin tümör büyümesini destekleyebilecek bir anjiyogenez aktivasyonu mekanizmasını ortaya çıkarmaktadır. Anjiyogenez, tümör büyümesinde kritik bir rol oynar, çünkü katı (solid) kanserler, yeterli bir kan kaynağı olmadan belirli bir boyutun ötesine geçemez. VEGF, anjiyogenezin anahtar faktörlerinden biri olarak kabul edilir ve endotelial hücrelerin göçünü ve mitozunu aktive eder, ayrıca matris metalloproteinaz (MMP)- hücre hareketini sağlar- ekspresyonunu artırır (Ferrara, 2004; Rundhaug, 2005). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kemerinin endotelial hücrelerde bulunan CMKLR1'e bağlanarak güçlü bir anjiyogenik etkiye sahip olduğu ve doza bağlı olarak MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Kaur vd., 2010). Bu bulgular, kemerinin anjiyogenez üzerindeki etkisini doğrulayan başka bir çalışma ile desteklenmiş ve hatta kemerinin, VEGF ile benzer düzeyde kan damarlarının oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Bozaoglu vd., 2010).

Meme kanseri dokusunda kemerin ekspresyonuna ilişkin yapılan 53 hastayı içeren küçük bir çalışmada (Li vd., 2018), kötü huylu (malign) dokuda kemerin ekspresyonunun, normal meme dokusuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca,

kemerin ekspresyonunun metastatik lenf düğümlerinde, primer tümöre kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Küçük hasta grubuna dayanan bu çalışmaya karşılık olarak, 3951 meme kanseri hastasını içeren ve kamuya açık DNA mikrodizi verilerinin meta-analizinde, kemerin ekspresyonunun meme kanseri dokusunda, normal meme dokusuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlenmiştir (Györffy vd., 2010). Fakat yapılan son çalışmalar kemerinin, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok tümörde, normal dokulara kıyasla düşük seviyelerde eksprese edildiğini göstermiştir. Meme kanseri modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, kemotaktik proteinlerin aşırı ekspresyonu, tümör mikroçevresinde (TME) doğal öldürücü hücreler ve T hücrelerinin önemli ölçüde toplanmasına neden olarak tümör büyümesini baskıladığı bulunmuştur (Li vd., 2018). Buna ek olarak, kemerinin, transformasyon büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) varlığında, meme kanseri hücrelerinin canlılığını ve invazivliğini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Kolorektal kanser ile bağlantısına bakıldığında, kemotaktik protein konsantrasyonu ile kolorektal kanser gelişme riski arasındaki ilişki doğrusaldır (Yagi vd., 2020). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hastaların kemerin seviyeleri, TNM (tümör- lenf düğümleri- metastaz) tümör evrelemesine paralel olarak kademeli şekilde artmaktadır (Xu vd., 2017). Mevcut bilgilere göre, kemotaktik proteinler, CHEMR23'ü aktive ederek anjiyogenezi ve tümör mikroçevresinin oluşumunu düzenler. CHEMR23'ün konsantrasyonu, MMP-9 ve damar hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ekspresyonu ile önemli ölçüde pozitif korelasyon göstermektedir. CHEMR23 aktivitesinin, kolorektal kanserde MMP-9'un etkisi aracılığıyla anjiyogenezi sürecinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kiczmer vd., 2020).

ELISA kullanılarak yapılan analizlerde, mide kanseri hastalarında serum kemerin seviyelerinin sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu artış, klinik olarak ileri evre mide kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd., 2014). Ek olarak, yüksek plazma kemerin seviyelerinin, mide kanserinde kötü uzun dönem prognoz ve düşük hayatta kalma oranları ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular nedeniyle, kemerinin mide kanserinde diğer yollarla nasıl etkileşime girdiği ve bağlı reseptörlerin rolü henüz belirlenmemiş olsa da kemerinin mide kanseri sağkalımı için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir (J. Zhang vd., 2014).

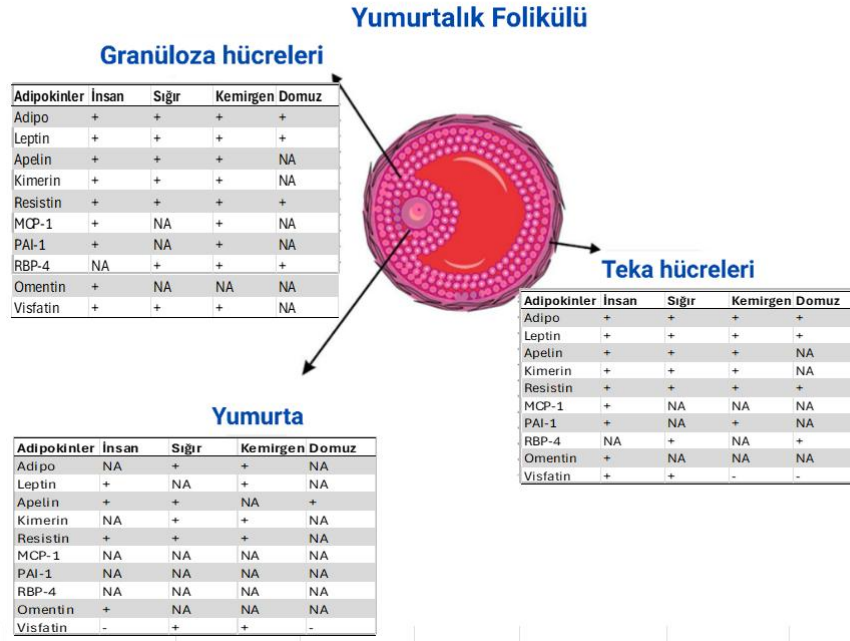
Kemerin ve ChemR23 ekspresyon seviyeleri, ağız yassı hücreli karsinom hücrelerinin *in vitro* göçünü, invazyonunu ve proliferasyonunu teşvik edebilmektedir. *TIG2* genini hedefleyen kısa saç tokası RNA'ların (ShRNAs), kemotaktik proteinlerin ekspresyonunu

azaltabildiği ve ağız yassı hücreli karsinom hücrelerinin metastazını ve proliferasyonunu *in vitro* ve *in vivo* olarak inhibe edebildiği gösterilmiştir (Goralski ve Sinal, 2009). Ayrıca, ağız yassı hücreli karsinom hastalarının serum ve tükürüklerinde kemotaktik protein ve MMP-9 seviyelerinin, ağız premalign lezyonları (OPMLS) ve normal kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu, OPMLS'nin tükürük tanı markörü, ağız yassı hücreli karsinomunun erken tespiti ve OPMLS'nin erken kanserleşme tespiti için kullanılabileceğini önermektedir (Ghallab ve Shaker, 2017).

Akciğerin küçük hücreli olmayan kanseri (NSCLC) olan hastaların kanındaki kemerin seviyesi sağlıklı insanlardan daha yüksektir. Bu yüksek kemerin seviyeleri, kanserin TNM evresi, lenf bezi metastazı ve uzak metastaz ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Kemerin, akciğer ve göğüs ana arterindeki kas hücrelerinin migrasyonunu artırır. Bu hareket endotelin-1 adlı bir madde ile daha da artar. Endotelin-1 tedavisiyle, bazı hücrelerin kemerini algılayan reseptörlerinin sayısı artar ve bu hücreler apoptoz dirençli hale gelirler (Hanthazi vd., 2020). CCRL2, kemerin ile bağlanarak bazı beyaz kan hücrelerinin (makrofajlar ve NK hücreleri gibi) kanserli alana doğru hareketini sağlar. CCRL2 geni nakavt fare modellerinde, kanserin daha hızlı yayıldığı ve tümörlerin büyüdüğü gözlenmiştir. Ayrıca CCRL2'nin, akciğerlerdeki kanser hücrelerine karşı etki gösterdiği ve klinik prognozla ilişkilendirildiği bulunmuştur (Del Prete vd., 2019).

### 2.3.5. Üreme Fonksiyonları

Yumurtalık rezervi bir kadının üreme potansiyelini belirler. Düşük yumurtalık rezervinin (DOR) etiyolojik ve patolojik mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır ve şu anda DOR için güvenilir bir tedavi mevcut değildir. Foliküler sıvıdaki (FF) adipokinler ve sitokinler, foliküler gelişim ve olgunlaşmada çok önemli roller oynar. *In vitro* fertilizasyon (IVF) geçiren DOR'lu kadınların bireysel foliküllerinden FF'deki adipokinlerin ve sitokin konsantrasyonları incelenmiştir (X. Li vd., 2025). Son zamanlarda, adipokinlerin yumurtalık fonksiyonunun sürdürülmesinde ve yumurtalık folikülü gelişiminin desteklenmesindeki rolüne artan bir ilgi gösterilmiştir. Leptin, adiponektin, kemerin, resistin, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve visfatin gibi farklı adipokinler FF'de rol oynar (Şekil 2.7) (Nikanfar vd., 2021). Normal yumurtalık rezervli (NOR) ve DOR'lu hastaların ilk FF'sindeki adipokinler ve sitokin konsantrasyonları Tablo 2.1'de verilmiş olup, TNF- $\alpha$ , IL-6, visfatin, MCP-1, IL-12 ve Kemerin foliküler seviyeleri NOR'lu kadınlarda DOR'lu kadınlara göre anlamlı derecede düşük olmuştur. NOR'lu kadınlar ile DOR'lu kadınlar arasında resistin veya leptin açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

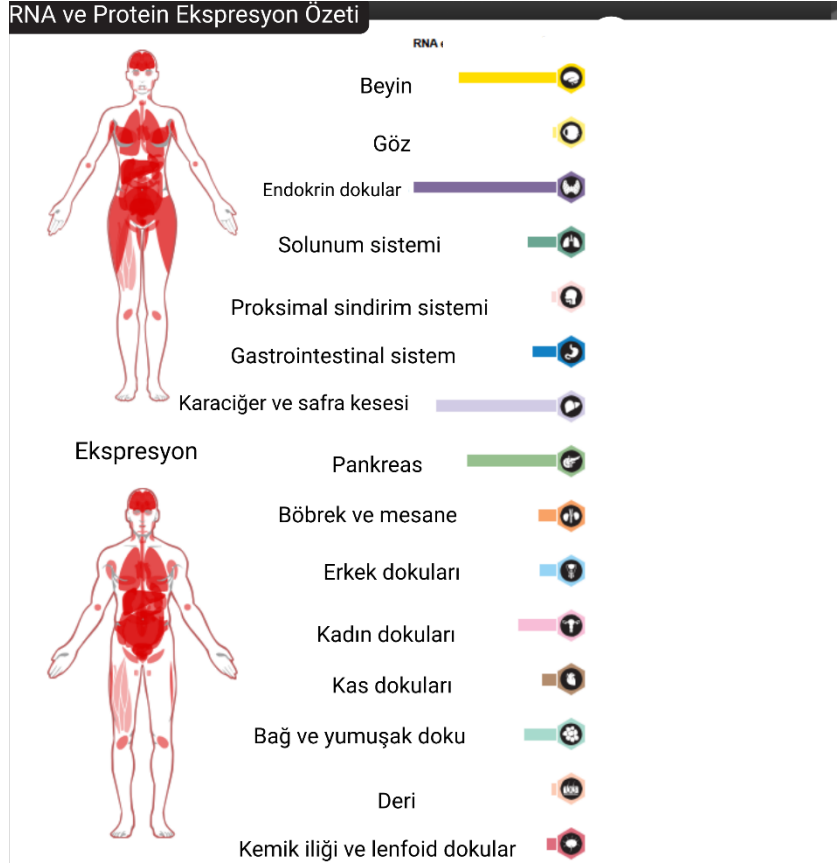


**Şekil 2.7.** Farklı tür adipokinlerin yumurtalık folikülünde adipokin ekspresyonu. NA: mevcut değil (Nikanfar vd., 2021).

**Tablo 2.1.** FF'deki adipokin ve sitokinlerin konsantrasyonları (X. Li vd., 2025).

	<b>DOR grubu</b>	<b>NOR Grubu</b>
Birey sayısı	42	73
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	3.71 $\pm$ 2.29	2.79 $\pm$ 0.87
IL-6 (pg/mL)	3.77 $\pm$ 2.47	2.81 $\pm$ 0.94
Visfatin 1 (pg/mL)	4210.87 $\pm$ 2650.43	3368.38 $\pm$ 1319.68
MCP-1 (pg/mL)	23.06 $\pm$ 16.28	25.11 $\pm$ 8.85
Resistin (pg/mL)	669.68 $\pm$ 416.31	885.55 $\pm$ 627.59
IL-12 (pg/mL)	46.84 $\pm$ 34.80	34.00 $\pm$ 12.82
Leptin (pg/mL)	1368,79 $\pm$ 1110. 02	1395.42 $\pm$ 779.41
<b>Kemerin (pg/mL)</b>	1647.03 $\pm$ 965.00	1310.75 $\pm$ 353.84

Kemerinin insan vücudunda önemli rolleri olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmış olup en etkili görevlerinin lipid metabolizmasında ve bağışıklık yanıtlarında olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte birçok dokuda eksprese edildiği de bilinmektedir. Dokular üzerindeki *TIG2* geninin ekspresyonu şematik olarak Şekil 2.8’de gösterilmiştir (Uhlén vd., 2015).



Şekil 2.8. Dokular üzerindeki *TIG2* geninin ekspresyonu şematik olarak gösterimi (Tissue expression of RARRES2 - Summary - The Human Protein Atlas, 2025).

## 2.4. Kemerinin İnsan Serum Sıvısındaki Tespit Seviyeleri

Kemerin, salgılanan bir protein olduğundan, genel olarak serum sıvısındaki seviyeleri ölçülmektedir. Serum sıvısındaki kemerin seviyeleri, bireylerin sağlık durumlarına ve mevcut hastalıklarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Sağlıklı bireylerdeki spesifik kemerin konsantrasyonları literatürde net bir şekilde belirtilmemiştir. Genel olarak hastalık durumlarındaki seviyeleri üzerinde durulmuştur. Kemerin, insülin duyarlılığı ve salgılanmasını düzenleyen bir adipokindir. Uzun süreli hiperinsülinemi ile sistemik kemerin artışının ilişkili olduğu gösterilmiştir (Goralski vd., 2007). Kemerin, fazla kilolu/obez

bireylerde normal kilolu bireylere göre daha yüksektir ve toplam kolesterol ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bauer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 66 sağlıklı, diyabeti olmayan bireyler, Regensburg Üniversitesi Hastanesi'nde gerçekleştirilen çalışmaya katılmış ve farklı metabolik gruplardaki hastaların kemerin düzeyleri ölçülmüştür. Ölçülen kemerin formu araştırmada belirtilmemiştir. Fakat serum sıvısında aktif form bulunduğu için birtakım C terminal kesimlerine maruz kalan kemerin formu olduğu düşünülmektedir. Bireyler beden kitle indeksine göre, normal kilolu (NK: 18,5–24,9 kg/m<sup>2</sup>), fazla kilolu (FK: 25–29,9 kg/m<sup>2</sup>) ve obez ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) olarak üç gruba ayrılmışlardır. Bu 3 gruptaki kemerin seviyeleri Tablo 2.2'de ng/mL cinsinden verilmiş olup 0-2 saat arasındaki değerleri gösterilmiştir (Bauer vd., 2012) (Tablo 2.2). Romatoid artrit hastalarının serum sıvılarında da kemerin düzeyleri değişkenlik göstermektedir. Orta veya yüksek şiddette hastalığa sahip olan bireylerde kemerin düzeyleri yaklaşık olarak 86,16 ng/mL iken düşük şiddette hastalığa sahip olan bireylerde kemerin düzeyleri 73,50 ng/mL olarak gösterilmiştir (Gonzalez-Ponce vd., 2021). Meme kanserine sahip olan bireylerdeki kemerin düzeylerini araştıran bir makalede, serum sıvısındaki ortalama kemerin miktarı 257,3 ng/mL olarak ölçülmüştür (Akın vd., 2017). Tip 2 diyabet hastalarında serum kemerin düzeylerinin retinopati ile ilişkisini gösteren bir çalışmada, Tip 2 diyabet hastalığına sahip bireylerdeki serum Kemerin seviyeleri 0,53 ng/mL iken diyabete bağlı retinopati gösteren hastaların serum Kemerin seviyeleri 1,13 ng/mL olarak ölçülmüştür (Duran vd., 2023).

**Tablo 2.2.** Bireylerin beden kitle indeksine göre biyokimyasal analizleri ve Kemerin düzeyleri. BMI, Vücut Kitle İndeksi; CRP, C-reaktif protein; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; NW, normal kilolu kontrol grubu; OW, aşırı kilolu kontrol grubu; WHR, bel-kalça oranı. P-değerleri: 1 NW vs. OW, 2 NW vs. obez, 3 OW vs. obez (Bauer et al., 2012).

	<b>NW (Normal kilolu kontroller)</b>	<b>OW (Fazla kilolu kontroller)</b>	<b>Obez</b>
Sayı	24	32	10
Kadın/Erkek	13/11	23/9	6/4
Yaş	25 (18-33)	26,5 (18-49)	30 (22-45)
Vücut Kitle İndeksi	23 (21-24)	26,8 (25-29)	32,3 (30-38)
WHR	0,87 (0,75-0,94)	0,87 (0,78-1,0)	0,90 (0,8-1,0)
Deri Kıvrım Kalınlığı (mm)	10 (2-22)	20 (4-40)	27 (3-44)
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	120 (98-165)	120 (97-148)	136 (110-163)
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	70 (54-90)	70 (49-100)	88 (69-103)
Glikoz (mM), 0 saat	4,6 (3,2-5,6)	4,7 (4,2-5,8)	5,1 (4,4-6,1)
Glikoz (mM), 1 saat	5,5 (3,5-8,9)	5,3 (3,4-12,0)	7,6 (4,8-11,3)
Glikoz (mM), 2 saat	4,5 (3,6-7,2)	5,2 (4,0-7,4)	6,4 (5,1-7,2)
İnsülin (mU/L), 0 saat	6,2 (2,5-10,5)	8,0 (3,4-16,5)	12,3 (6,9-21,4)
İnsülin (mU/L), 1 saat	42,1 (11,9-95,1)	39,3 (8,2-157)	117,6 (41,3-120)
İnsülin (mU/L), 2 saat	23,1 (3,5-62,9)	29,1 (7,7-79)	70 (15,6-193,1)
Kolesterol	5,2 (3,2-7,1)	5,2 (3,3-7,3)	4,8 (4,1-6,7)
HDL (mM)	1,8 (1,0-2,9)	1,5 (1,1-2,9)	1,3 (1,0-1,7)
LDL (mM)	2,6 (1,1-4,0)	3,1 (1,7-5,0)	3,1 (1,9-5,0)
Trigliseridler (mM)	0,9 (0,3-2,4)	1,0 (0,5-4,8)	1,3 (0,8-2,1)
CRP (mg/L)	0,8 (0-6,8)	1,3 (0-19,8)	3,7 (1,4-7,1)
Kemerin (ng/mL), 0 saat	169 (70-476)	220 (98-355)	242 (188-377)
Kemerin (ng/mL), 1 saat	160 (25-400)	222 (57-405)	241 (181-344)
Kemerin (ng/mL), 2 saat	176 (63-424)	219 (77-357)	229 (147-421)

Gebelik sırasında maternal metabolizmada önemli değişiklikler ve insülin direncinde bir artış vardır, bu da yağlanmada bir artışla aynı zamana denk gelir. Kemerin, hamilelik sırasında metabolik düzenlemede önemli bir rol oynayabilir. Garces ve arkadaşları, 20 gebenin erken, orta ve geç dönem boyunca (10-14., 23-26. ve 34-37. haftalar arasında) serum kemerin düzeylerini analiz etmiş ve 20 gebe olmayan kadın kontrol grubu ile karşılaştırılarak bir çalışma yapmıştır. Gebeliğin erken döneminde, serum kemerin seviyeleri gebe olmayan kadınlara kıyasla biraz azalmıştır. Gebeliğin ilk haftalarında, kemerin gebelik sırasında en düşük seviyelerine ulaşmış, ancak daha sonra hamilelik ilerledikçe artmıştır. Serum kemerin düzeyleri geç gebelik sırasında erken ve orta gebelik ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksektir (Tablo 2.3). Geç gebelikte serum kemerin düzeyleri gebe olmayan gruba göre artmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Garces vd., 2013). Dolaşımdaki kemerin seviyeleri hamilelik ilerledikçe önemli ölçüde artar ve proinflatuar bir durumu desteklediği bilinen diğer faktörlere ve adipokinlere benzer bir profil gösterir.

**Tablo 2.3.** Çalışılan kadınların biyokimyasal analizleri ve kemerin düzeyleri (Garces vd., 2013).

Özellikler	Gebe Olmayan (n=20)	Erken Gebelik (n=20)	Orta Gebelik (n=20)	Geç Gebelik (n=19)
İnsülin uU/mL	8,4 ±2,4	7,3 ±2,9	11,7 ±6,2	10,7 ±5,3
Glikoz mg/dl	81 ±7,2	87,7 ±8,0	80,4 ±10,0	79,8 ±9,1
Toplam kolesterol mg/dl	183,6 ±35,3	203,5 ±40,6	277,1 ±51,8	322,8 ±82,2
HDL md/mL	66,5 ±11,3	87,2 ±17,5	85,9 ±21,8	81,5 ±28,4
LDL md/mL	95,4 ±30,0	86,7 ±30,6	144,1 ±48,8	168,6 ±48,4
Trigliseridler md/ml	108,4 ±37,1	147,8 ±52,2	230,4 ±89,1	292,8 ±90,3
Kemerin ng/mL	277,4 ±36,3	246,6 ±38,9	249,3 ±42,7	307,5 ±56,4
Adiponektin ng/mL	60,47 ±25,95	64,86 ±20,71	56,60 ±22,40	51,59 ±11,81

## 2.5. Kemerin Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler

### 2.5.1. ELISA Yöntemi ile Kemerin Tespiti

ELISA, antijen ve antikor arasındaki bağlanmayı tespit etmek ve ölçmek için kullanılan yaygın bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, özellikle proteinlerin, hormonların, virüslerin, bakteri antijenlerinin ve diğer moleküllerin miktarını ölçmek için kullanılır. Gonzalez ve arkadaşları serum kemerin seviyelerini ölçmek amacıyla ELISA testini kullanmışlardır. Kemerin ELISA testi için hem monoklonal yakalama hem de poliklonal tespit antikoru, rekombinant insan kemerinin 21-157 izoformuna karşı üretilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan test, prokemerin, aktif kemerin ve muhtemelen bazı proteolitik olarak işlenmiş kısa formları ölçmektedir. Kemerin ELISA testi için iç ve dış deneme varyans katsayıları sırasıyla %2,7 ve %9,3'tür (Gonzalez-Ponce vd., 2021). İç deneme varyans katsayısının %2,7 olması testin veya ölçümün tekrarı yapıldığında, elde edilen sonuçları arasındaki varyasyonun oldukça düşük olduğunu gösterir. Bu durumda, testin sonuçları birbirine oldukça yakın ve tutarlı olacaktır ve aynı örnek birden fazla kez test edildiğinde, bu testlerin sonuçları çok büyük bir fark göstermeyecektir. %2,7'lik düşük iç deneme varyans katsayısı testin yüksek tekrarlanabilirliğini kanıtlarken; %9,3'lük dış deneme varyansı, farklı deneysel koşullar altındaki uygulamalarda değişkenliğin bir miktar arttığına işaret etmektedir. Bu sonuçlar, Kemerin tespiti için daha kesin sonuçlar veren bir ölçüm tekniğinin eksik olduğunu göstermektedir.

Garces ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti ile ölçüm yapılmış ve ölçümün genel duyarlılığı gösterilmiştir. Kemerin için tespit sınırının 15.6 pg/mL, iç test varyansının (intra-assay) %4 ila %6 arasında, dış test varyansının (inter-assay) %8 ila %10 arasında ve tespit aralığının 31.25 pg/mL ile 2000 pg/mL arasında olduğu belirtilmiştir (Garces vd., 2013). Dış test varyansının yüksek olması, farklı koşullardaki tutarsızlığı desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmada da spesifik olarak kemerinin hangi izoformunun tespit edildiği belirtilmemiştir. Benzer şekilde Bauer ve arkadaşları, yüksek insülin salgılanması durumunda, kemerin seviyelerinde artış gözlemlemiştir. Bu artış ELISA ile ölçülmüş ve ölçüm duyarlılığı  $\mu\text{g/mL}$  olarak gösterilmiştir. ELISA sonrası miktarlar, Western Blot sistemi üzerinden gösterilmiştir (Bauer vd., 2012). Fakat ölçüm duyarlılığının az olması, daha düşük seviyelerdeki kemerin miktarının saptanmasında sıkıntı yaratmaktadır. Kemerinin insülin direnci ve obeziteyle ilişkisini konu eden bir diğer çalışmada da kemerin tespiti ELISA ile yapılmış ve ölçümler sonucu yaklaşık 300 ng/mL kemerin tespit sınırına

ulaşmıştır (El-Mesallamy vd., 2011). Yine bu çalışmada kemerinin hangi izoformunun tespit edildiği belirtilmemiştir.

2016 yılına ait bir çalışmada da obeziteye sahip bireylerin kan örnekleri alınarak ELISA ile kemerin tayini yapılmış, çalışma sonuçlarına göre üç adet kemerin formu tespit edilmiştir. Çalışma, bu 3 form arasından kemerin K158 formunu ana form olarak belirlemiştir. Diğer iki form ise asıl aktif olarak bulunan kemerin A156 ve S157 formlarıdır. Ana form olarak belirlenen K158 formu, diğerlerine göre daha düşük aktivite göstermektedir. Tespit edilen formun yüksek aktivite gösteriyor olması da oldukça önemlidir. Fakat burada ana form olarak K158 formu üzerinde durulmuştur. ELISA sonuçlarının desteklenmesi için sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi çalışmaları da yapılmıştır (Chang vd., 2016). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Biovendor Human Chemerin ELISA kiti kullanılarak Kemerin tespiti yapılmıştır. Bu tespit için analiz yöntemi üründe belirtilen şekildedir, özetle, 60 dakikalık kemerin içeren solüsyon ile inkübasyonun ardından yıkama işlemi yapılır ve biotin ile işaretlenmiş poliklonal anti-insan kemerin antikoru eklenerek, yakalanan kemerin ile 60 dakika daha inkübe edilir. Sonrasında tekrar yıkama yapılır, streptavidin-HRP konjugatı eklenir ve 30 dakikalık inkübasyonun ardından son bir yıkama işlemi uygulanır. Kalan konjugat, tetrametilbenzidin (TMB) içeren substrat çözeltisiyle reaksiyona girer. Reaksiyon, asidik bir çözeltinin eklenmesiyle durdurulur ve oluşan sarı rengin absorbansı (optik yoğunluğu) ölçülür. Bu absorbans değeri, örnekteki kemerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Standart eğri, standartlardaki kemerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerinin grafiğe dökülmesiyle oluşturulur. Bilinmeyen örneklerin kemerin düzeyleri bu eğri kullanılarak hesaplanmaktadır (Ghallab ve Shaker, 2017). Bu işlem özel olarak kemerin miktarını ng/mL olarak ölçüyor olsa da işlemin en az 3,5 saat sürmesi bir dezavantaj yaratmaktadır. Ayrıca kit üzerinde hangi kemerin formunun tespit edildiği belirtilmemiştir. Bahsedilen kit aktif olarak bulunan her formu tespit edebilse de hastalıklarla ilişkili formların özel olarak tespit edilmesi oldukça önemlidir. Çünkü kemerin düzeyleri hastalık belirteci olarak güçlü bir potansiyel olarak görülmektedir. Bu durumda da hangi hastalıkta hangi formun aktif olarak bulunduğu net olarak bilinmelidir.

2015 yılında yapılan bir çalışmada, kemerin ve kemerin reseptörünün protein ekspresyonlarını incelemek için, yumurtalık endometriotik kistik duvar ve eutopik endometriyal dokular kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Kemerin için 200 µg protein 15% sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) üzerinde yürütülmüştür. Son olarak, elde edilen görüntüler yazılım

kullanılarak analiz edilmiş ve proteinlerin miktarları hesaplanmıştır (Jin vd., 2015). Sonuç olarak ELISA ve devamında gelen Western Blot teknikleri ile yapılan çalışmalar son derece yaygın olsa da hem süre hem de miktar tayininin hassaslığı bakımından bazı dezavantajlar bulundurmaktadır. Çoğunlukla ELISA ile yapılan çalışmaların desteklenmesi için devamında kütle spektrometresi gibi daha spesifik ve süreci uzun olan yöntemler de yapılmaktadır (Höpfinger vd., 2024). Kemerin tespiti için kullanılan ELISA tabanlı özel kitler de son zamanlarda yaygınlaşmasına rağmen kemerinin hangi formuna özgü olduğu net olarak belirtilmemiştir. Hazır olarak sunulan bu kitler, daha çok herhangi bir örnekteki aktif kemerin miktarını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Spesifikliğin az olması, kemerinin belirteç olarak kullanılması durumunda sıkıntı yaratacaktır. Kemerinin her formuna özgü bir tayin yönteminin olması hastalık belirteci olarak kullanımına da olanak sağlayacaktır. Kemerin seviyelerinin ölçüldüğü çalışmalarda kullanılan ELISA kitlerinin ölçüm aralığı ve duyarlılığı Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.4.** Kemerin seviyelerinin ölçüldüğü çalışmalarda kullanılan ELISA kitlerinin ölçüm aralığı ve duyarlılığı.

Kullanılan ELISA Kiti	ELISA Kiti Ölçüm Aralığı	ELISA Kiti Duyarlılığı	Kemerinin İzole Edildiği Kaynak	Referans
R&D Systems Human Chemerin Quantikine ELISA (Solid Phase Sandwich ELISA)	78,0 - 5000 pg/mL	7,8 pg/mL	İnsan Serum Sıvısı	Balcerska vd., 2024 Bauer vd., 2012 Bozaoglu vd., 2010 Gonzalez-Ponce vd., 2021 Herenius vd., 2013 Jin vd., 2015 Weigert vd., 2010 Wolk vd., 2023
R&D Systems Luminex Technology	1,56-200 ng/mL	0,3 ng/mL	İnsan Foliküler Sıvısı	Li vd., 2025
BioVendor Chemerin Human ELISA (Sandwich ELISA, Biotin-labelled antibody)	0,25–8 ng/mL	0,1 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Chakaroun vd., 2012 El-Messalamyvd., 2011 Ghallab ve Shaker, 2017 Kozłowska vd., 2021 Ress vd., 2010 Sell vd., 2010
Aviscera Bioscience High Sensitivity Chemerin (Human) ELISA Kit	15,6-500 pg/mL	7 pg/mL	İnsan Serum Sıvısı	Garces vd., 2013
Millipore Human Chemerin ELISA Kit	20-100 ng/mL	1,56 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Wang vd., 2014 Xu vd., 2017
USCN (Cloud-Clone Corp.) ELISA Kit for Chemerin	0,78-50ng/mL	0,32 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Yagi vd., 2019
abcam Human Chemerin ELISA Kit	0,51 - 50 ng/mL	< 0,5 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Abdullateef vd., 2024 Leniz vd., 2023 Mir vd., 2022
RayBioTech Human Chemerin ELISA Kit	0,5 - 50 ng/mL	0,5 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Jose vd., 2016 Manco vd., 2017
FineTest Human CHEM(Chemerin) ELISA Kit	0,156-10ng/mL	0,094ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Mohammed vd., 2024 Sochal vd., 2021
Elabscience Human CHEM(Chemerin) ELISA Kit	0,16-10 ng/mL	0,1 ng/mL	İnsan Serum Sıvısı	Ali vd., 2020 Mermutoglu ve Tekin, 2023 Tariq vd., 2022 Yücel ve Özcan, 2025

## 2.5.2. Kütle Spektrometresi ile Kemerin Tespiti

Kütle spektrometresi (MS), moleküllerin kütlelerini ve yapısını belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir. Bu yöntem, bir örneği iyonlaştırarak iyonlar haline getirir ve bu iyonları kütlelerine göre ayırarak analiz eder. Chang ve arkadaşlarının obezitedeki kemerin aktivasyonunu araştırdıkları bir çalışmada farklı bir durum gözlemişlerdir. Safılaştırılmış örneklerin kütle spektrometresi, yalnızca obezite hastalarının plazmasında bulunan C-terminali kesilmiş kemerin formlarında anlamlı bir artış olduğunu belirlemiştir. Bu, belirtilen formların in vivo proteoliz yoluyla üretildiğini göstermektedir. Yani, obezite hastalarının plazmasında, zayıf kontrollerle karşılaştırıldığında kemerin S163'ün daha fazla aktive edilip proteolitik olarak parçalandığına dair bir kanıt vardır (Chang vd., 2016). Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu zaman-uçuş (MALDI-TOF) kütle spektrometresi, farklı kesim enzimleriyle oluşan kemerin peptitlerinin analizi için kullanılmıştır (Kulig vd., 2011). Bu çalışmada, kemerinin insan sistein katepsinleri tarafından nasıl düzenlendiğini ve kemerinin kemoatraktan ve antibakteriyel aktivitelerinin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Katepsin K ve L tarafından kesilen kemerin, kütle spektrometresi ile tayin edilmiş ve elde edilen peptitlerin insan kanından elde edilen pDC'lerin göçünü tetiklediği ayrıca antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada kütle spektrometresi ile tayin edilen kemerin peptitleri S157 ve A155'tir (Kulig vd., 2011).

Kemerinin serin proteazlar tarafından aktive edilerek bağışıklık sistemine ait hücrelerin hasarlı dokuya yönlendirilmesini sağladığı ise başka bir çalışmada gösterilmiştir. Burada her bir kesim sonucu oluşan 8-20 amino asit uzunluğundaki peptitler kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır (Zabel vd., 2005). Benzer şekilde 2005 yılındaki bir çalışmada da farklı kesim enzimleri sonucu oluşan kemerin peptitleri ve prokemerin tayini kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Serin proteazlarla işlenen prokemerinin, aktif olarak kemerin1-156 ve kemerin1-157 oluşturduğu gösterilmiştir (Wittamer vd., 2005).

Kemerin izoformlarının karakterizasyonu ve kantifikasyonu için Sıvı Kromatografi / Çoklu Tepki İzleme- Kütle Spektrometresi (LC/MRM-MS) tabanlı yeni bir hedefli proteomik yaklaşım 2020 yılındaki bir çalışmada bildirilmiştir. Bu yöntemi ayıran üç özellik vardır. İlk olarak, izoform-spesifik benzersiz peptitler tripsin sindirimi ile elde edilir ve UniProt/BLAST veri tabanına karşı arama yapılarak doğrulanır. İkinci olarak, karakterizasyon ve mutlak kantifikasyon sağlamak için hem nitelikleştirici hem de kantifikasyon iyonları aynı anda izlenir. Son olarak, immünoafinite kolonları kullanarak immünokitleme, izlenebilirlik için az düzeyde Kemerin izoformunun zenginleştirilmesi sağlanır. İnsan serum sıvısından elde edilen

sonuçlarda; kemerin-153Q 3.51 ng/mL, kemerin-154F 9,72ng/mL, kemerin-155A 8.55 ng/mL, kemerin-156F 60,14 ng/mL, kemerin-157S 90,71 ng/mL, kemerin-158K 20,26 ng/mL olarak bulunmuştur (Huang vd., 2020). Fakat sonuçlar ELISA ile karşılaştırıldığında, ELISA sonuçlarının her bir izoform için çok daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir.

### **2.5.3. Elektrokimyasal İmpedimetrik Biyosensör ile Kemerin Tespiti**

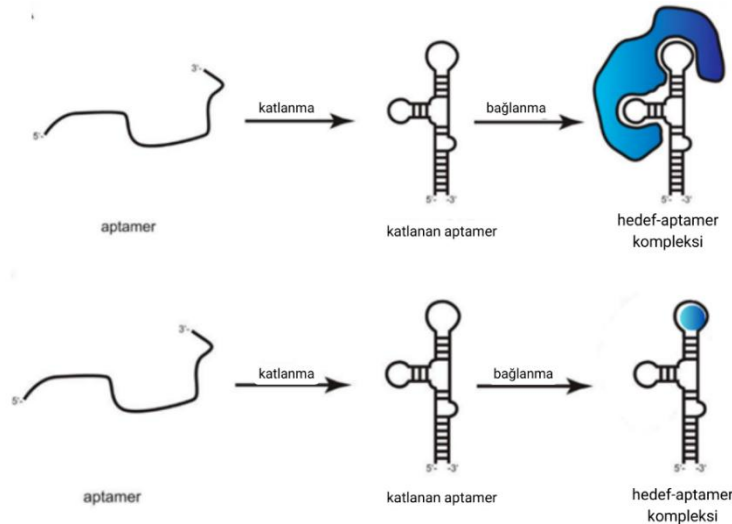
Literatürde yer alan en güncel çalışmalardan biri olan 2025 araştırmasında, kemerin analizi için üç boyutlu baskı teknolojisi ile üretilmiş yenilikçi bir impedimetrik platform sunulmuştur. Yapılan çalışmada, fiziksel buhar biriktirme (PVD) yöntemiyle altın kaplanmış polilaktik asit (PLA) elektrot yüzeyleri, anti-kemerin antikorlarıyla modifiye edilerek, biyosensör üretiminde maliyeti minimize eden ancak analitik hassasiyeti de arttıran bir metodoloji geliştirilmiştir. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) tabanlı gerçekleştirilen ölçümler sonucunda elde edilen 0,0068 ng/mL'lik LOD değeri, bu platformun klinik örneklerde eser miktardaki kemerin tespiti için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, biyosensör dünyasında tek kullanımlık (disposable) ve özelleştirilebilir elektrot tasarımlarının, geleneksel laboratuvar yöntemlerine karşı bir alternatif oluşturabileceğini metodolojik olarak doğrulamaktadır (Yücel ve Özcan, 2025).

## **2.6. Aptamer ve Üstel Zenginleştirme Yoluyla Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX)**

### **2.6.1 Aptamer Terimi ve Aptamer Kütüphanesi**

Yapısal olarak, bir aptamer genellikle 20–80 nükleotidden oluşan kısa tek zincirli bir oligonükleotid dizisidir (ssDNA veya RNA). Aptamer terimi ilk defa 1990 yılında Andy Ellington ve Jack W. Szostak tarafından kullanılmıştır (Ellington ve Szostak, 1990). Aptamerler; proteinler, peptitler, karbonhidratlar, küçük moleküller, toksinler ve hatta canlı hücreler dahil olmak üzere belirli bir hedefe seçici olarak bağlanabilen kısa, tek sarmallı DNA veya RNA (ssDNA veya ssRNA) molekülleridir. Ellington ve Szostak tarafından, ilk aptamer bir RNA molekülü olarak geliştirilmiştir. Geliştirilen bu RNA dizileri, latince *aptus* (uyum sağlamak) kelimesinden türetilerek aptamer olarak adlandırılmıştır. Aptamerlerin tanımlanması, SELEX olarak da adlandırılan bir *in vitro* seçim süreci ile sağlanır (Ellington ve Szostak, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Bu yöntem ilk olarak 1990 yılında Tuerk ve Gold ile Ellington ve Szostak tarafından rapor edilmiştir. O zamandan beri birçok hedef moleküle özgü aptamer geliştirilmiştir. Aptamerler, tek sarmallı ilmekler oluşturma eğilimleri nedeniyle

çeşitli şekiller alırlar ve hedefleri ile oluşturdukları zayıf etkileşimler ile hidrojen bağları sayesinde hedeflerine yüksek seçicilik ve özgüllükle bağlanmaktadır. Yani hedef moleküle yüksek afinite gösterirler. Aptamer bağlanması; birincil yapıdan ziyade üçüncül yapı tarafından belirlenir (Wolter ve Mayer, 2017). Hedefi tanıma ve bağlanma, 3 boyutlu şeklin yanı sıra hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ile baz dizilişlerine de bağlıdır. Aslında aptamerler, hedeflerine uydukları için bağlanmaktadır (Şekil 2.9). Aptamerler ve antikolar, hedef moleküllere son derece yüksek özgüllük ve bağlanma afinitesi göstermeleri açısından oldukça benzerdir. Son on yılda 2.000’den fazla aptamer üretilmiştir (Wolter ve Mayer, 2017). Aptamerler, antikolarla kıyasla bazı avantajlara sahiptir. Örneğin, hedef olan moleküle karşı yüksek bir seçiciliğe sahiptirler, yani belirli bir aptamer, hedef moleküle karşı son derece özgüdür. Ayrıca, antikolarla kıyasla daha küçük yapıları sayesinde hücre içi hedeflere ulaşabilirler. Bunun yanı sıra, aptamer seçimi SELEX döngüleri sayesinde kısa sürmektedir. Ayrıca üretim serileri bazında düşük değişkenlik göstermesi ve büyük ölçekli üretimlerinin kolay olması gibi avantajları da bulunmaktadır (Song vd., 2012). Bu özellikler, aptamerleri terapötik uygulamalarda antikoların yerine geçebilecek güçlü adaylar haline getirmektedir. Aptamerlerin antikolarla göre birçok avantajına rağmen, hala ele alınması gereken bazı zorluklar bulunmaktadır. Bunlar arasında özgül kütüphanelerin tasarımı ve aptamerlerin stabilitesi, ayrıca seçim koşullarının optimize edilmesi yer almaktadır. Buna ek olarak, aptamerler *in vitro* ortamda geliştirilmektedir ve antikolarla karşılaşılan bazı etik kaygılardan bağımsızdır.



**Şekil 2.9.** Yapı oluşumuna bağlı olarak bir hedef proteine aptamer bağlanmasının şematik gösterimi. Bağlanma koşullarının ayarlanmasından sonra aptamer, hedef molekül (örneğin bir protein) ile etkileşime girdiği 3 boyutlu bir yapıya katlanır ve bu da kararlı bir hedef-aptamer kompleksi ile sonuçlanır (Wolter ve Mayer, 2017).

Aptamer seçimi, SELEX (Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi) teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilir. SELEX, temel olarak kütüphane seçimi, inkübasyon, bağlanma, yıkama ve amplifikasyon gibi birkaç adımdan oluşur. Hedef molekül seçilmeden önce, yaklaşık  $10^{12}$ - $10^{16}$  diziden oluşan bir oligonükleotid kütüphanesi sentezlenir. Bu kütüphanede, merkezde değişken diziler, uçlarda primer bağlanması ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için sabit diziler bulunur. Hedef moleküller bu kütüphane ile inkübe edilir. Ardından, bağlanan diziler uygun yöntemlerle bağlanmayanlardan ayrılır. Bağlanan diziler PZR ile çoğaltılır ve sonraki seçim döngüsü için bir havuz oluşturulur. Her döngüyle birlikte, havuz spesifik dizilerle giderek daha fazla zenginleşir. Bu zenginleştirilmiş diziler sekanslanır, bağlanma afiniteleri doğrulanır ve değerlendirilir.

## **2.6.2. Farklı SELEX Yöntemleriyle Aptamer Seçimi**

### **2.6.2.1. Negatif SELEX**

Belirli bir hedef madde için aptamer elde etmek amacıyla, hedef molekül genellikle manyetik boncuklar gibi katı faz desteklerine immobilize edilir. Ancak, manyetik boncukların yüzeyine özgül olmayan bağlanma, yanlış pozitif sonuçlara yol açarak nihai sonuçlarda sapmalara neden olabilir. Ellington ve Szostak, bu hataları en aza indirmek için 1992 yılında Negatif-SELEX yöntemini tanıtmıştır (Ellington vd., 1992). Bu yöntemde, hedef moleküle inkübasyon yapılmadan önce, manyetik boncuklar yalnızca kütüphane ile inkübe edilir, böylece özgül olmayan bağlanmalar belirlenir. Daha sonra bu boncuklar atılır. Negatif-SELEX ile elde edilen aptamerler, negatif seçim uygulanmadan üretilenlere kıyasla yaklaşık 10 kat daha yüksek afinite gösterir (Zhuo vd., 2017).

### **2.6.2.2. Karşıt SELEX**

Karşıt-SELEX, prosedür ve amaç açısından Negatif-SELEX yöntemine benzer, ancak temel farkı, karşıt-SELEX'in inkübasyon için benzer hedef molekülleri kullanmasıdır. 1994 yılında Jenison ve ekibi tarafından tanıtılan karşıt-SELEX, aptamerlerin özgüllüğünü artırmak amacıyla geliştirilmiştir (Robert vd., 1994). Geleneksel SELEX'e kıyasla, karşıt-SELEX, hedefe yapısal olarak benzer moleküllerin hedef olarak kullanıldığı ek bir adım ekleyerek, özgül olmayan oligonükleotidleri (aptamer) ayırt etmeyi sağlar. Bu yöntem, daha spesifik aptamerler elde etmek için diğer modifiye SELEX yöntemlerine de entegre edilmiştir. Negatif-SELEX ve Karşıt-SELEX arasındaki temel fark, inkübasyonda kullanılan hedeflerin farklı olmasıdır (Zhuo vd., 2017).

### **2.6.2.3. Toggle-SELEX**

Bu yöntem, bir hedefe bağlanan tüm molekülleri taramak için birden fazla pozitif hedef kullanır ve seçim süreci boyunca hedef koşullarının dinamik olarak değiştirilmesine olanak tanır. Genellikle tümör hücrelerini hedefleyen aptamerlerin seçilmesinde kullanılır. Tümör hücrelerinin yüzey epitoplari sürekli olarak mutasyona uğradığından ve ilaç direncine yol açtığından, tedavinin bu mutasyonlara rağmen etkili kalmasını sağlamak için Toggle-SELEX kullanılır (Dua vd., 2018). Bu yöntem, antikoagulan aptamerlerin seçilmesi için kullanılmıştır (White vd., 2001) ve ayrıca çeşitli Gram-negatif bakterilere karşı aptamerler elde etmek için de uygulanmıştır (Shin vd., 2019).

### **2.6.2.4. Capture-SELEX**

Bu yöntem, kütüphaneyi katı fazda immobilize etmek için kullanılır. Genellikle küçük molekül aptamerlerini izole etmek amacıyla kullanılır. İşlemdede, oligonükleotid kütüphane katı faz desteklerine bağlanır ve ısıtma-soğutma işlemleriyle bağlanma kolaylaştırılır (Lyu vd., 2021). Daha sonra streptavidin kaplı manyetik boncuklar eklenerek biyotinlenmiş oligonükleotid dizileri bağlanır ve manyetik boncuk-oligonükleotid kompleksi oluşturulur. Spesifik aptamerler, yıkama ve elüsyon işlemleriyle elde edilir. 2012 yılında Regina ve ekibi, Capture-SELEX yöntemini kullanarak aminoglikozid antibiyotik olan kanamisin A için aptamerler seçmiştir (Stoltenburg vd., 2012). Benzer şekilde, 2017'de Georges ve ekibi, penisilin G için aptamerler seçmiştir (Paniel vd., 2017).

### **2.6.2.5. Hücre SELEX (Cell SELEX)**

Bu yöntem, canlı hücreleri hedef olarak kullanarak, hücre yüzey reseptörlerine bağlanan veya belirli hücre popülasyonlarını tanıyan aptamerleri belirlemeye yönelik bir tekniktir. Cell-SELEX, in vitro SELEX'e kıyasla klinik uygulamalara daha uygundur, çünkü hücre yüzeylerindeki doğal yapılara dayanır (Choi vd., 2023). Ayrıca, geniş bir hedef yelpazesine yönelik aptamerleri belirleyebilir, bu da klinik hastalıkların anlaşılması ve tedavisi açısından büyük önem taşır. 2003 yılında Daniels ve ekibi, glioblastoma türevli U251 hücre hattını kullanarak tenascin-C için aptamerler seçmiştir (Daniels vd., 2003). Ayrıca, glioma hücrelerini hedefleyen aptamerler de geliştirilmiştir (Lin vd., 2021).

### **2.6.2.6. Kapiler Elektroforez-SELEX (CE-SELEX)**

Bu yöntem, iyonları elektroforetik hareketliliklerine göre ayırarak aptamer seçimi yapar. Geleneksel SELEX'e kıyasla, daha az seçim döngüsü gerektirir (genellikle 1-4 döngü), böylece yüksek afiniteye sahip aptamerler daha hızlı elde edilir. Bu teknik, çözeltide bağlanan

DNA moleküllerini bağlanmayanlardan ayırır ve katı faz destekleri ve yıkamalarla bağlantıları ortadan kaldırır (Mosing ve Bowser, 2009). Ancak, maliyeti yüksektir ve yalnızca yüksek moleküler ağırlıklı hedeflerin seçimiyle sınırlıdır. CE-SELEX ile  $\alpha$ -fetoprotein ve GPC3 gibi proteinlere yönelik aptamerler başarıyla seçilmiştir (Dong vd., 2015). Özellikle GPC3, hepatosellüler karsinomun erken teşhisi için bir tümör biyobelirteci olarak tanımlanmıştır (Dong vd., 2018).

#### **2.6.2.7. Mikroakışkan SELEX (M-SELEX)**

Geleneksel SELEX'te birden fazla zenginleştirme döngüsü gereklidir, ancak bu süreç sırasında dizilerin kaybolması, özgül olmayan amplifikasyon ve PZR sırasında kontaminasyon gibi hatalar meydana gelebilir (Irvine vd., 1991). M-SELEX, bu sorunları çözmek için geliştirilmiş bir otomatik tekniktir. Bu yöntem, mikroölçekli seviyede yüksek özgüllüğe ve afiniteye sahip aptamerleri hızla tarar. En önemli özelliği, mikromanyetik ayırma cihazlarının verimliliğini artırmasıdır. Yapılan çalışmalar, hedef sayısını azaltmanın, aptamer havuzunda yalnızca birkaç diziyi hızla belirleyerek seçim sürecinin özgüllüğünü artırabileceğini göstermiştir (Dembowski ve Bowser, 2018).

#### **2.6.2.8. Yüksek Verimli Dizileme SELEX (HTS-SELEX)**

HTS-SELEX, klasik SELEX yönteminin bir geliştirilmiş versiyonudur. Herhangi bir seçim döngüsünde dizileme yapılmasına olanak tanır. Bu, kontaminasyonun veya seçilen dizilerin çevresel nedenlerle kaybolmasının önlenmesine yardımcı olur (Zhuo vd., 2017). HTS-SELEX, hedef moleküllerin özgüllüğünü yüksek hassasiyetle ölçebilir ve genellikle RNA bağlanma özgüllüğünü analiz etmek için kullanılır (Guenther vd., 2013). 2015 yılında Dupont ve ekibi, yüksek verimli dizileme teknolojisi kullanarak plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) için spesifik olarak 2'-floropirimidin modifiye RNA aptamerlerini seçmiş ve zenginleştirmiştir (Dupont vd., 2015).

#### **2.6.2.9. In vivo SELEX**

Geleneksel SELEX yöntemleri genellikle in vitro olarak gerçekleştirilir ve hedefler genellikle yapay olarak sentezlenir. In vitro olarak seçilen aptamerlerin in vivo ortamda etkili olmaması sorununu gidermek için, araştırmacılar in vivo SELEX yöntemini geliştirmiştir. Bu yöntem, ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılır ve hastalık modeli olarak kullanılan hayvanlarda dokulara doğrudan nüfuz edebilen aptamerlerin üretilmesine olanak tanır. Chen ve ekibi 2019 yılında, fare modelinde fosfatidilserin bağlayıcı proteinleri (PB'ler) hedefleyen aptamerleri tanımlamak için bu yöntemi kullanmıştır (Chen vd., 2019). Mi ve ekibi, canlı

tümörlere enjekte edilen aptamerleri elde etmeye yönelik ilk girişimi gerçekleştirmiştir (Mi vd., 2010). Ayrıca Cesarini ve ekibi, kan-beyin bariyerini geçebilen hedeflenmiş bir ilaç taşıma sistemi geliştirmiştir (Cesarini vd., 2020). Geniş kapsamlı deneyler, in vivo ortamda aptamer üretiminin mümkün olduğunu göstermektedir.

#### **2.6.2.10. Manyetik Boncuk (MB) Tabanlı SELEX**

Klasik olarak manyetik boncuklar (MB)'ler, hedef molekülü veya oligonükleotid kütüphanesini en uygun fonksiyonel gruplar aracılığıyla boncuk yüzeyi üzerinde hareketsiz hale getirerek aptamer seçiminde katı destek olarak kullanılır. Daha sonra, elde edilen konjuge MB'ler, MB tabanlı SELEX için DNA/RNA kütüphanesi ile veya hedef ile inkübe edilir. Hedefe karşı afinite gösteren oligonükleotid dizileri, bir manyetik alan uygulanarak etkileşime girmeyen nükleik asit ligandlarından ayrılabilir. Bu adımı takiben, boncuk yüzeyinde hedefe bağlanan afiniteye sahip diziler, PZR ile amplifikasyon için çözelti içinde olduklarından ve daha sonra yeni bir seçim turu için koşullandırıldıklarından, ayrıştırılabilir veya doğrudan kullanılabilir. Ek adımların varlığı, artan seçiciliğe sahip aptamerlerin elde edilmesine yardımcı olabilmektedir (Manea vd., 2024). Song ve arkadaşları manyetik boncuk kullanarak kanamisin A'ya (bir aminoglikozid antibiyotik) özgü aptamer geliştirmiştir (Song vd., 2011). Paniel ve ekibi ise 2017 yılında manyetik boncuk tabanlı SELEX ile penisilin G'ye özgü aptamerler seçmeyi başarmışlardır (Paniel vd., 2017).

#### **2.6.3. Aptamer Teknolojisinin Kullanım Alanları**

Aptamerler, hedef molekülleri özel olarak tanıma ve bunlara bağlanma yetenekleri nedeniyle artık çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyosensörler, patojen tespiti ve kanser teşhisi gibi alanlardaki uygulamalar da dahil olmak üzere klinik teşhis ve tedavideki uygulamaları daha sık gündeme gelmektedir. Güçlü afiniteleri ve özgüllükleri nedeniyle, aptamerler klinik teşhis ve ilgili alanlarda önemli bir potansiyele sahiptir. Ek olarak, aptamerler kolayca etiketlenmektedir. Bruno ve Kiel tanı aracı olarak ilk aptameri geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada şarbon sporlarını tespit etmek için bir aptamer kullanmışlardır (Bruno ve Kiel, 1999). Ek olarak, aptamerler hem tedavi hem de tanı için hassas tıpta önemli bir potansiyele sahiptir. Modifiye aptamerler enzimatik bozulmaya direnebilir. Bu nedenle, hedefe yönelik tedavilerde önemli roller oynamaktadır (Zhu ve Chen, 2018). Aptamer hedefli virüsler üzerinde de kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Kacharovsky ve ekibi 2021'de, koronavirüs tespiti ve tedavisi için yeni bir biyo-tanıma aracı olarak büyük potansiyel gösteren SARS-CoV-2 aptamerini başarıyla geliştirmiştir. Spikülin gibi viral

proteinleri özel olarak tanıyan aptamerler, sadece tespit hassasiyetini artırmakla kalmaz, aynı zamanda küresel pandemilere karşı mücadelede önemli bir araç sağlayan yeni antiviral terapötiklerin geliştirilmesini de kolaylaştırır (Kacherovsky vd., 2021). Bu aptamerlerin enzim aktivitesini inhibe ettiği, proteinler, RNA ve konakçı proteinler arasındaki etkileşimleri bloke ederek virüs partikül oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Şu anda, en yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlar spesifik değildir ve insan sağlığına değişen derecelerde zarar verebilir ve bu da önemli yan etkilere yol açabilir. Bununla birlikte aptamerler, ilaç dağıtım sistemleri olarak hizmet etmek için diğer ajanlarla birlikte hareket edilebilir, böylece normal hücrelere verilen hasarı azaltır ve terapötik etkinliği artırır. Çeşitli tümör hücresi aptamerleri, SELEX kullanılarak başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Örneğin, prostat spesifik membran antijenine karşı aptamerler tanımlanmıştır (Lupold vd., 2002). Ayrıca, epitel hücresi adezyon molekülü 1'i hedefleyen aptamerler de geliştirilmiştir (Y. Song vd., 2013). Bu aptamerler, kanser tespitinde çok önemli roller oynayan tümör belirteçleri olarak işlev görür.

Aptamerler, rejeneratif tıpta da büyük potansiyel göstermektedir. Kök hücre büyümesi ve farklılaşması için uygun bir ortam sağlamak üzere hücre dışı matrisi değiştirebilirler, böylece doku yenilenmesini teşvik edebilmektedirler. SELEX teknolojisinin ilerlemesiyle, nükleik asit aptamerleri artık hedef hücreleri sınıflandırmak için kullanılabilir. Düşük üretim maliyetleri, enzimatik bozulmaya karşı güçlü direnç, yüksek saflık, yüksek verimlilik ve hücreler üzerinde minimum etki ile karakterize edilirler. Günümüzde, çeşitli kök hücreler için yüksek özgüllük ve afiniteye sahip çok sayıda aptamer tanımlanmıştır. Örneğin, insan yağ dokusu kaynaklı kök hücreler için bir aptamer başarıyla seçilmiştir (de Melo vd., 2021). Yao ve ekibi 2020'de, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine (MSC'ler) özgü aptamerleri başarıyla tanımlamışlardır (Yao vd., 2020). Biyosensörlerin temel bileşenleri reseptörler ve dönüştürücülerdir. Biyolojik reseptörler tipik olarak antikorlar, hücreler, enzimler ve nükleik asitler içerir (N. Paniel vd., 2013). Biyolojik reseptörler olan nükleik asit aptamerleri tipik olarak hedef biyomolekülleri tanırlar ve onlara bağlanırlar. Daha sonra, sinyal dönüştürücü, tespit edilebilir bir sinyal üretmek için hedef madde ve biyolojik reseptör ile etkileşime girer (Han vd., 2010). Aptamerler, umut verici yeni optik ve elektriksel biyosensör türleridir Chung ve arkadaşları 2015 yılında, aptamerleri floresan nanopartiküller (A-FNP'ler) ile başarılı bir şekilde konjuge etmiş ve *Escherichia coli*'yi tespit etmiştir (Chung vd., 2015). Ayrıca, 2015 yılında Abbaspour ve arkadaşları bir elektrik sensörü kullanarak *Staphylococcus aureus*'u tespit edebilmiştir (Abbaspour vd., 2015).

### 3. ÇALIŞMANIN AMACI

Hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan yöntemlerin, kısa süreli ve kesin sonuçlar vermesi adına her geçen gün yeni çalışmalar yapılmaktadır. Biyolojik bir tanıma elemanı (örneğin enzim, antikor, DNA gibi) kimyasal bir analiti (örneğin glikoz, toksin, bakteri) algılayan ve bunu ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlar olarak tanımlanan biyosensörler, tanı ve tedavide ufuk açıcı bir yol olmaktadır. Yaptığımız çalışmada, aptamer tabanlı bir biyosensör geliştirilmesi için temel adım olan hedefe özgü aptamerin seçilmesi amaçlanmıştır. Patolojik mekanizmalardaki merkezi konumu ve biyobelirteç potansiyeli yeni nesil araştırmalarla daha net bir şekilde ortaya konan kemerin proteinine özgü aptamer geliştirilerek, insan serum sıvısındaki tespiti kolaylaştırılması ve hastalık teşhisi için bir biyobelirteç olarak kullanılması bu tezin ana amacıdır. Kemerin proteinin inaktif ve aktif formları bulunmaktadır. Aktif olarak bulunan kemerin-S157 izoformu, yapılan çalışmalarda serum sıvısında en çok bulunan ve aktivitesi yüksek olan izoformdur. Bu nedenle aptamer geliştirilmesi için hedef olarak kemerin-S157 formu seçilmiştir. Şu ana kadar yapılan araştırmalarda, kemerin-S157 proteini için geliştirilmiş bir aptamere rastlanmamıştır. Ancak, kemerin tespiti için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, ELISA testidir. Örneğin, R&D Systems tarafından sunulan Human Chemerin DuoSet ELISA kiti, insan serumunda veya plazmasında kemerin seviyelerini ölçmek için kullanılmaktadır. Fakat bu tür testler her ne kadar aktif kemerin düzeylerini ölçse de özel olarak kemerinin hangi aktif izoformu olduğunu göstermemektedir. Kemerin izoformları hastalık türüne ve doku tipine bağlı olarak değiştiği için hangi izoformun ölçüldüğü oldukça önemlidir. Ayrıca antikor tabanlı ölçüm tekniklerinin uygulanması ve geliştirilmesi de oldukça vakit almaktadır. Tez çalışmasında, aktif kemerin-S157 izoformuna yüksek afinite ile bağlanan özgün bir aptamer geliştirilmiş olup; bu aptamer, ileride tasarlanacak biyosensör sistemlerinin ana bileşeni olarak konumlandırılmıştır.

## 4. MATERYAL METOT

### 4.1. Kemerin Proteinin Temini ve Aptamer Seçilimi İçin Gerekli Olan SELEX Kitinin Temini

Kemerin proteinine özgü aptamer seçimi için yüksek aktivite gösteren aktif kemerin-S157 izoformu seçildi. Seçilen kemerin izoformu 137 amino asit uzunluğunda ve 16 kDa büyüklüğündedir (E21-S157). Kemerin-S157 izoformunun amino asit dizisi, 1 ELTEAQRRLGL QVALEEFHKH PPVQWAFQET SVESAVDTPF PAGIFVRLEF KLQQTSCRKR 61 DWKKPECKVR PNGRKRKCLA CIKLGSEDKV LGRLVHCPIE TQVLREAEEH QETQCLRVQR 121 AGEDPHSFYF PGQFAFS şeklindedir. Belirtilen amino asit dizisine sahip protein, MedChemExpress'ten C terminal ucunda 6 adet Histidin amino asiti (6xHis) ile işaretlenerek HEK293 hücre hattında ürettirildi ve temin edildi. Temin edilen protein, 50 µg liyofilize toz halde ve %95 saflıktadır.

Aptamer seçimi ve SELEX döngüleri için EurX XELEX DNA Core Kit kullanıldı. Kit içerisinde son hacmi 500 µL'ye ayarlanan 10 nmol aptamer kütüphanesi (LibraryBank 40), 10x SELEX tamponu, 5'-Bank40 primeri ve 3'-Bank40 primeri bulunmaktadır. Aptamer kütüphanesi rastgele baz dilimine sahip 40 nükleotitten oluşmaktadır. Teorik olarak tüm olası 40 baz uzunluğundaki rastgele dizileri içeren bu kütüphane  $4^{40}$  (yaklaşık  $1,2 \times 10^{24}$ ) farklı diziyi içermektedir. Her bir aptamerin (40 nükleotit) 3' ve 5' uçlarında 20 nükleotit ileri, 20 nükleotit geri primer bulunmaktadır. Rastgele nükleotid kütüphanelerinin oluşturulması açısından en verimli olanlar, 40 baz uzunluğunda olan aptamerlerdir. Daha kısa rastgele oligonükleotidler, örneğin 20 baz uzunluğunda olanlar (evrensel kütüphane boyutu:  $4^{20} \sim 1,1 \times 10^{12}$  farklı molekül) ile SELEX yapılması mümkün olsa da yapısal kısıtlamalar nedeniyle bağlanma özelliklerindeki çeşitlilik, daha uzun rastgele oligonükleotid kütüphanelerine kıyasla oldukça sınırlıdır. Rastgele 80 baz içeren oligonükleotidler (evrensel kütüphane boyutu:  $4^{80} \sim 1,1 \times 10^{48}$  farklı molekül) oldukça büyük moleküllerdir ve iyi bağlayıcı olarak tanımlanan moleküller, hedefe özgü afinitenin yanı sıra ek, özgül olmayan ya da istenmeyen bağlanma özellikleri de taşıyabilir. Bununla birlikte, 90 bazın üzerindeki rastgele dizi bölgelerine sahip oligonükleotid havuzları, zamanla birikime neden olabilen kendi kendine agregat (kümeleşme) oluşturma eğilimindedir. Bu nedenle aptamer seçimi için 40 bazlık aptamer kütüphanesi tercih edilmiştir.

## 4.2. Kemerin Proteininin Manyetik Boncuklara İmmobilizasyonu

Kemerine özgü aptamer seçimi için manyetik boncuk tabanlı SELEX sistemi kullanıldı. Manyetik boncuklar, hedef molekül olan kemerin proteinini belirli fonksiyonel gruplar sayesinde yüzeylerine sabitleyerek, aptamer seçimi sırasında katı bir faz olarak kullanıldı. Kullanılan manyetik boncuklardaki (Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads) fonksiyonel gruplar nikel yüklü nitrilotriasetik asit (Ni-NTA)'tir. Bu gruplar polihistidin etiketli (His-tag) proteinlere afinite göstererek bağlanmaktadır. Kemerinin C terminal ucunda bulunan 6x-His etiketi sayesinde Ni-NTA boncuklara bağlanmaktadır.

Kullanılan Ni-NTA manyetik boncukların hedefi bağlama kapasitesi,  $\geq 40$   $\mu\text{g}$  yeşil floresan protein (GFP)/mg boncuk olarak belirtilmiştir. Buna göre liyofilize haldeki 50  $\mu\text{g}$  kemerin proteini, 500  $\mu\text{L}$  dengeleme tamponunda (100 mM sodyum fosfat, 600 mM sodyum klorür, %0.05 Tween20, 30 mM imidazol, pH 8,0) çözülerek konsantrasyonu 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olan stok protein solüsyonu hazırlandı. Daha sonra boncuklara proteinlerin bağlanması için Ni-NTA boncuk prosedürüne uygun bir şekilde +4 °C sıcaklıkta tutulan boncuklar oda sıcaklığına alınarak hafifçe karıştırıldı. Ardından 40  $\mu\text{L}$  (0,5 mg) manyetik boncuk 1.5 mL eppendorfa alınarak üzerine 160  $\mu\text{L}$  eşitleme tamponu eklendi ve 10 s. vortekslendi. Eppendorf, manyetik standı alınarak boncuklar mıknatıs yardımıyla çekildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorfa tekrar 400  $\mu\text{L}$  eşitleme tamponu eklendi ve yıkama adımı tekrarlandı. Hazırlanmış olan stok protein solüsyonu, eşit hacimde eşitleme tamponu ile seyreltilerek boncuğa bağlanması istenen protein özütü hazırlandı. 200  $\mu\text{L}$  stok protein, 200  $\mu\text{L}$  eşitleme tamponuna eklenerek hazırlanan protein solüsyonu (400  $\mu\text{L}$ ), süpernatantı uzaklaştırılan boncuklara eklendi. 10 s. vorteks yapıldıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında rotatorda inkübe edildi. Bu aşamada His-tag etiketi bulunan kemerin proteininin boncuklara bağlanması sağlandı. İnkübasyonun ardından, kemerin bağlanmış katı faz olarak kullanılan boncuklar manyetik stand kullanılarak toplandı (Şekil 4.1). Geriye kalan süpernatant, kemerin proteininin boncuklara ne kadar bağlandığının ölçülmesi için saklandı. Boncuk ve protein etkileşimi ne kadar kuvvetliyse, süpernatantta kalan protein miktarı o kadar az olacağı için, süpernatantta bulunan protein konsantrasyonu ölçülerek dolaylı olarak bağlanan protein miktarı bulundu. Boncuklarla inkübasyon öncesi protein miktarı ve inkübasyon sonrası süpernatantta bulunan protein miktarı karşılaştırılarak bağlanan protein konsantrasyonu hesaplandı. Protein ölçümü için standart olarak kullanılan BSA tabanlı Thermo Micro BCA Protein Assay Kit kullanıldı. Boncuk-protein etkileşimi ayrıca Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analiziyle (Bruker Alpha Compact) de test edildi. FT-IR analizinde, Ni-NTA manyetik

boncuğun (protein bağı olmayan boncuk) dalga boyu ile boncuğa bağı kemerinin dalga boyu karşılaştırılarak bağılanmanın olup olmadığına bakıldı.



Şekil 4.1. Manyetik boncuğa bağı kemerinin manyetik stantta toplanması.

#### 4.3. Seyreltilmiş Sığır Serum Albümin (BSA) Standartlarının Hazırlanması

Thermo Micro BCA Protein Assay Kit yönteminde, alkalın ortamda proteinin bakır iyonunu ( $Cu^{2+}$ ) indirgemesi sonucu oluşan  $Cu^{1+}$  iyonunun tespiti için bikinkoninik asidi (BCA) reaktif olarak kullanılır. Bu işlem sonucunda, bir  $Cu^{1+}$  iyonu ile iki BCA molekülünün şelatlaşmasıyla mor renkli bir reaksiyon ürünü oluşur. Suda çözünür bu kompleks, 562 nm dalga boyunda güçlü bir absorbans gösterir ve protein konsantrasyonu arttıkça absorbans değeri doğrusal olarak artar. İlk olarak kit prosedürüne uygun şekilde seyreltilmiş sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı. Seyreltiklerin hazırlanması için konsantrasyonu 2,0 mg/mL olan 1 mL'lik BSA stokları kullanıldı. Seyreltmeler deiyonize saf su ( $dH_2O$ ) ile, Tablo 4.1' de belirtildiği gibi yapıldı. Daha sonra ölçüm için gerekli olan Micro BCA çalışma reaktifi hazırlandı. Çalışma reaktifi (WR), Reaktif MA, Reaktif MB ve Reaktif MC 25:24:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. İlk olarak reaktif MA ve MB karıştırıldı en son MC reaktifi eklenerek WR hazırlandı. Hazırlanmış olan BSA seyreltikleri kullanılarak standart grafikleri hazırlandı. Küçük hacimde çalışılması daha uygun olduğu için ölçümler spektrofotometrik olarak  $OD_{562}$  nm'de nanodrop cihazı (BioSpec-nano, Shimadzu) ile yapıldı.

**Tablo 4.1.** Seyreltilmiş Sığır Serum Albumin (BSA) Standartlarının Hazırlanması.

Tüp	Seyreltici Hacmi (mL)	BSA Hacmi ve Kaynağı	Son BSA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	4,5	0,5 mL Stok	200
B	8	2,0 mL Tüp A seyreltmesi	40
C	4	4,0 mL Tüp B seyreltmesi	20
D	4	4,0 mL Tüp C seyreltmesi	10
E	4	4,0 mL Tüp D seyreltmesi	5
F	4	4,0 mL Tüp E seyreltmesi	2,5
G	4,8	3,2 mL Tüp F seyreltmesi	1
H	4	4,0 mL Tüp G seyreltmesi	0,5
I	8	0	0 (Blank)

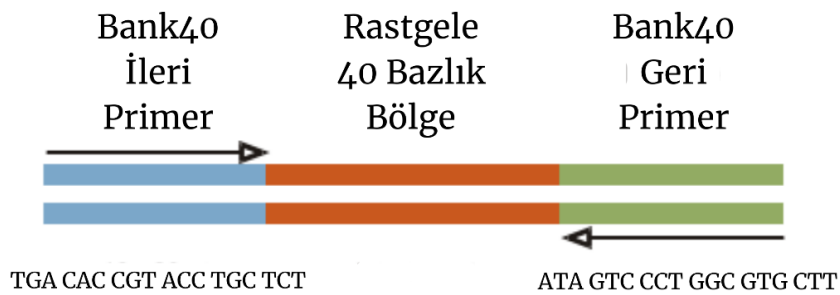
#### 4.3.1. BSA Grafiğinin Çıkarılması

BSA grafiği hem mikroplakada yapılan ölçümler hem de küçük hacimde çalışmak adına nanodrop cihazında  $\text{OD}_{562}$  nm'de yapılan ölçümler ile hazırlandı. Mikroplaka temelli yapılan ölçümler için, hazırlanmış olan BSA seyreltiklerinin (A-I) her birinden 150  $\mu\text{L}$  alındı ve 96 gözlü mikroplaka kuyucuğuna koyularak üzerlerine 150  $\mu\text{L}$  WR eklendi. Plaka çalkalayıcıda 30 saniye iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaka oda sıcaklığına soğutuldu ve plaka okuyucusunda (Multiskan™ FC 96 and 384-well Plate Microplate Photometers, Thermo Scientific) 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Boş (Blank) örneğin 562 nm absorbansı, diğer tüm standartların 562 nm değerlerinden çıkarıldı. Aynı işlemler, küçük hacimde tekrarlandı. Küçük hacim ölçümleri için BSA seyreltiklerinden (veya numuneden) 4  $\mu\text{L}$  alındı ve üzerlerine 4  $\mu\text{L}$  WR eklendi. Devamında yapılan aynı işlemlerin ardından örnekler, nanodropta 562 nm'de fotometrik olarak ölçüldü. Her BSA standardı için konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ ) gösteren bir standart eğrisi hem mikroplaka hem de nanodrop değerleri için çizildi ve  $R^2$  değeri hesaplandı. Küçük hacimde çalışılacağı için nanodrop temelli eğri kullanıldı. Standart eğrisi üzerinden bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

## 4.4. SELEX

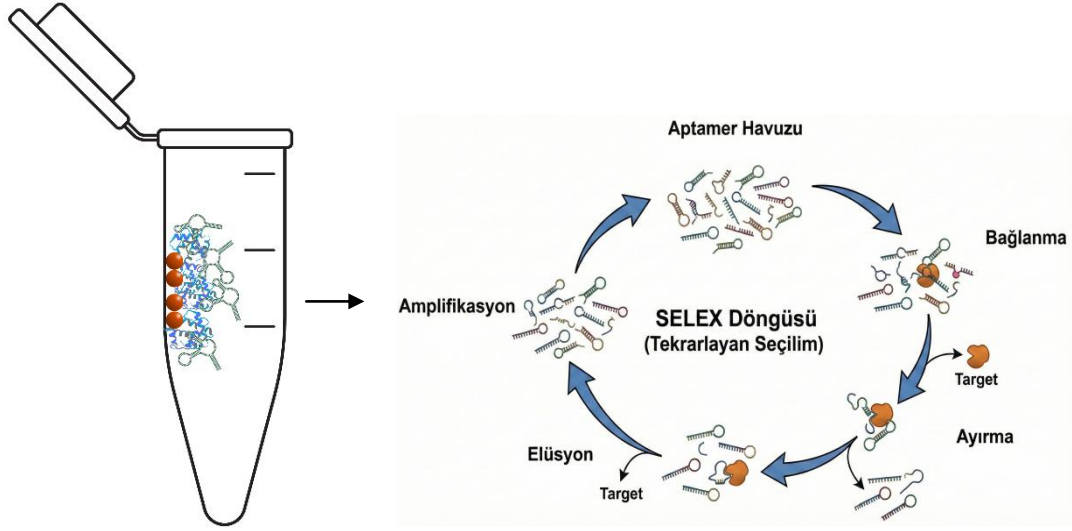
### 4.4.1. SELEX Turları ve PZR Koşulları

Ni-NTA boncuklara bağlı olarak bulunan kemerin proteinine yüksek afinite gösteren aptameri bulmak adına SELEX adımları gerçekleştirildi. EurX XELEX DNA Core Kit içerisinde bulunan 100 µl Bank40 kütüphanesine 50 µL 10x SELEX tamponu eklendi ve hacmi dH<sub>2</sub>O ile 500 µL'ye tamamlanarak kütüphane kullanıma hazır hale getirildi. Tek zincirli rastgele 40 nükleotitlik DNA zincirlerinden oluşan Bank40 kütüphanesi ve PZR için gerekli olan 5' ve 3' uçlarındaki primer dizileri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Bank40 Kütüphanesi ve Primer Dizileri

Kullanıma hazır olan kütüphaneden 200 µL alındı ve boncuklara bağlı olarak bulunan proteinlere eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında rotatorda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından zayıf bağlanan aptamerlerin uzaklaştırılması amacıyla 1x SELEX tamponu ile yıkama yapıldı. Manyetik stantta boncuk+protein+aptamer kompleksi (Şekil 4.3) tutularak tamponun bulunduğu süpernatant uzaklaştırıldı. Bağlanan aptamerlerin bir sonraki SELEX turunda kullanılması amacıyla, komplekse 80 µL Tris-EDTA (TE) eklendi ve karıştırıldı. Ardından TE içindeki kompleks, 94 °C'de 4 dakika bekletildi ve proteine afinite gösteren aptamerlerin kompleksten ayrılması sağlandı. Boncuk+protein manyetik stantta toplandı. Süpernatantta kalan aptamerler bir sonraki turun kütüphanesi olacağı için -20 °C'de saklandı.



Şekil 4.3. Manyetik stantta bulunan boncuk+protein+aptamer temsili şeması ve ardından gelen SELEX adımı.

Önceki adımdan elde edilen ve proteine afinite gösteren aptamer kütüphanesinin zenginleştirilmesi için EurX SELEX DNA Core Kit içinde bulunan ileri ve geri primerler kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Tablo 4.2). PZR reaksiyonu için EURx Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı (Tablo 4.3). PZR sonrasında dsDNA miktarı OD<sub>260</sub> nm’de ölçüldü ve kaydedildi. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünü görüntüldü. Ardından PZR ürününü tuz ve iyonlardan uzaklaştırmak için PCR Clean up Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Kit prosedürüne uygun olarak 50 µL PZR reaksiyon solüsyonu dH<sub>2</sub>O ile 200 µL’ye tamamlandı. Daha sonra üzerine 100 µL bağlanma tamponu eklendi ve %99’luk etanol eklenerek karıştırıldı. Karışım, toplama tüpüne takılan DNA saflaştırma mikro kolonuna aktarıldı. Kolon, 14.000 × g’de 30-60 saniye santrifüjlendi ve akış sıvısı atıldı. DNA saflaştırma mikro kolonunu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 14.000 × g’de 30-60 saniye santrifüj işlemi yapıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra kalan yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için, boş saflaştırma kolonu 14.000 × g’de 1 dakika daha santrifüjlendi. DNA saflaştırma kolonunu, temiz bir 1,5 mL mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve kolonda bulunan membranının tam ortasına 10 µL elüsyon tamponu eklenerek 14.000 × g’de 1 dakika santrifüjlendi. dsDNA elüsyonu elde edildi. Elde edilen dsDNA’nın sonraki SELEX turunda zenginleştirilmiş aptamer kütüphanesi olarak kullanılabilmesi için ssDNA’ya çevrilmesi gerekir. Bundan dolayı, dsDNA üzerine 500 µL 1x SELEX tamponu eklenerek 94 °C’de 4 dakika bekletildi ve hızlıca buza alındı. İşlem sonucunda elde edilen ssDNA’nın miktarı OD<sub>260</sub> nm’de ölçüldü. Miktarı belirlenen ssDNA bir sonraki SELEX turunun aptamer kütüphanesi olarak kullanıldı.

**Tablo 4.2.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları.

95 °C	2 dk	1 Döngü
95 °C	15 sn	15 Döngü
60 °C	30 sn	
72 °C	5 dk	1 Döngü

**Tablo 4.3.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyon
10X Reaksiyon Tamponu	5 µL	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µL	1,5 mM
dNTP Karışımı	1 µL	0,2 mM
100 µM İleri Primer	0,25 µL	0,5 µM
100 µM Geri Primer	0,25 µL	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz	1 µL	1,25 U
Kalıp ssDNA	1 µL	
dH <sub>2</sub> O	38,5 µL	
Toplam Hacim	50 µL	

Aptamer kütüphanesi ile boncukla konjuge proteinin ilk inkübasyonu ardından Negatif SELEX gerçekleştirildi. Negatif SELEX, asıl hedefe özgü olan aptamerlerin seçilmesi için önemli bir adımdır. Protein bağlı olmayan boncuklara afinite gösteren aptamerler varsa, bu aptamerlerin uzaklaştırılması için ilk olarak 40 µL boncuk üzerine ilk turda elde edilen ssDNA kütüphanesi eklendi ve karıştırıldı. 1 saat oda sıcaklığında rotatorda inkübasyonun ardından manyetik stantta boncuk+aptamer kompleksi toplandı. Bir sonraki turda kullanılmak üzere süpernatantta kalan (boncuğa afinite göstermeyen) aptamerler toplandı.

Negatif SELEXin ardından elde edilen aptamer kütüphanesi 2. SELEX için kullanıldı. Aptamer kütüphanesi, 40 µL boncuğa bağlı olarak bulunan proteinlere eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında rotatorda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 500 µL 1x SELEX tamponu ile yıkama yapıldı. Manyetik stantta boncuk+protein+aptamer kompleksi tutturuldu ve süpernatant uzaklaştırıldı. Üçlü kompleks 80 µL TE'de çözüldü ve aptamerin komplekten ayrılması için 94 °C'de 4 dakika bekletildi ve koparılan ssDNA (aptamer)'nin miktarı OD<sub>260</sub> nm'de belirlendi. Elde edilen ssDNA Tablo 4.2'de belirtilen PCR koşulları ile çoğaltılarak

dsDNA elde edildi ve miktarı OD<sub>260</sub> nm'de ölçüldü. Ardından PZR ürünleri PZR Clean up Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak üretici protokolüne göre saflaştırıldı. Saflaştırılan dsDNA 94 °C'de 4 dakika bekletilip hızlıca buz üzerine alınarak ssDNA'ya dönüştürüldü. Ardından nanodrop ile miktar tayini yapıldı. Elde edilen ssDNA 3. SELEX turu için kütüphane olarak kullanıldı.

Bundan sonra yapılan her SELEX adımında, bir önceki turda ssDNA'ya dönüştürülen DNA havuzu bir sonraki turda aptamer kütüphanesi olarak kullanıldı. Toplam 14 SELEX turu gerçekleştirildi ve her SELEX turunda, proteine en çok afinite gösteren aptameri bulmak için şartlar zorlaştırıldı. Kütüphane ile boncuğa bağlı protein kompleksinin inkübasyonu 1 saat ile başlandı ve ardından 4. SELEXte 45 dk'ya, 5. SELEXten itibaren 30 dk'ya, 12. SELEXte 20 dk'ya, 13. SELEXte 10 dk'ya ve son olarak 14. SELEXte 5 dk'ya düşürüldü. SELEX turlarının amacı en düşük protein miktarı ve en kısa sürede proteine afinite gösteren aptameri bulmak olduğu için, boncuk+protein kompleksinin miktarı da SELEX turları boyunca olabildiğince azaltıldı. 40 µl ile başlanan boncuk+protein kompleksi, 3. SELEXten itibaren 20 µL'ye, 7. SELEXten itibaren 10 µL'ye, 9. SELEXte 5 µL'ye, 10. SELEXte 2,5 µL'ye ve son olarak 11. SELEXten itibaren 1 µL'ye düşürüldü. Her turda kullanılan kütüphane miktarı, SELEX turlarında kullanılan boncuk miktarı, inkübasyon süresi, yıkama sayıları ve çıkan dsDNA miktarları, sonuçlar bölümündeki Tablo 5.3'te ayrıntılı olarak verildi. 14. SELEX sonucunda proteine afinite gösteren aptamerler ölçüldüğünde negatif sonuç alındı. Bu sebeple 14. SELEX koşullarının bağlanma için uygun olmadığı gösterildi ve SELEX turları sonlandırıldı. Aptamer dizilerinin belirlenebilmesi için klonlama aşamasına geçildi.

#### **4.5. Kemerine Yüksek Afinite Gösteren Aptamer Dizilerinin Belirlenmesi**

##### **4.5.1. Klonlama**

Klonlama için *Escherichia coli* DH5α suşu kullanıldı. İlk olarak DH5α suşu, CaCl<sub>2</sub> tekniği ile kompetent hücre formuna getirildi. Bunun için DH5α suşu 1 gece 3 mL Luria Bertani Broth (LB Broth) besiyerinde büyütüldü. Spektrofotometrede OD<sub>600</sub> 'de ölçüldü ve 250 ml'lik erlende 30 mL LB besiyerine OD<sub>600</sub>'de 0,1 yoğunlukta bakteri olacak şekilde aşılındı. Optik yoğunluğu 0,45-0,55 arasına gelene kadar yaklaşık 1 saat 37 °C' de sallayıcıda inkübe edildi. Yoğunluk istenen değere gelince +4°C'de 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan pellet 10 mL soğuk 100mM'lık CaCl<sub>2</sub> ile homojen hale getirildi. 30 dakika buzda bekletildikten sonra 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 2 mL soğuk CaCl<sub>2</sub> ile homojen hale getirildi. 2 saat +4°C'de bekletildikten sonra

kompetent DH5 $\alpha$  suşu kullanıma hazır hale geldi ve Thermo CloneJET PCR klonlama kiti kullanılarak son SELEX turunda elde edilen PZR ürünün klonlanması çalışmasına geçildi.

SELEX turlarının PZR aşamasında kullanılan Taq polimeraz enzimi, PZR ürününün 3' ucuna A kuyruk ekleyerek yapışkan (sticky) uç oluşturma özelliğindedir. Kullanılan klonlama kiti blunt (küt) uçlarla reaksiyon verdiği için PZR ürünümüz küt uca çevrildi. Bunun için kit içerisinde bulunan 2X reaksiyon tamponundan 10  $\mu$ L, son SELEX turundan elde edilen PZR ürününden 1  $\mu$ L ve DNA Blunting enzimden 1  $\mu$ L eklenerek son hacim 18  $\mu$ L'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Bu işlem buz üzerinde gerçekleştirildi. 5 saniye vortekslendikten sonra 70°C 'de 5 dakika inkübe edildi ve buza alındı. Ardından PZR ürününün vektör ile ligasyonu aşamasına geçildi. Bu işlem T4 DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Küt uç oluşturma aşamasında elde edilen 18  $\mu$ L ürünün üzerine 1  $\mu$ L T4 DNA ligaz, 1  $\mu$ L Pjet1.2 Blunt cloning vector eklenerek 5 saniye vortekslendi. Ardından, 22 °C 'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve ligasyon ürünü transformasyona hazır hale getirildi.

#### **4.5.2. Transformasyon**

Ligasyon ürünün bakteri hücrelerine transformasyonunun gerçekleştirilmesi için kompetent hücreden 200  $\mu$ L alınarak üzerine 3  $\mu$ L ligasyon ürünü eklendi ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 2 dakika 45 °C'de bekletildi ve cam tüplere 1 mL LB koyularak 45°C 'de bekletilen karışım LB üzerine eklendi. Çalkalayıcıda 37°C'da 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı ve 1 saatin ardından 6000g' de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı döküldü ve kalan sıvıda pellet çözdürüldü. Amp<sup>+</sup> li LB agara, çözdürülen pellet yayıldı ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Klonlama çalışmasında kullanılan CloneJET PCR klonlama kitinde bulunan pJET 1.2/blunt vektörü eco47IR letal gen bölgesini içermektedir. Ayrıca bu vektöre ait klonlama bölgesi de bu letal gen içerisindedir. Dolayısı ile başarılı gerçekleşen transformasyon sonrası klonlanan gen, letal gen içerisine girerek bu geni inaktive etmektedir. Ayrıca vektör ampisilin direnç geni de içermektedir. Kısaca, transformasyon sonrası petride büyüyen koloniler PZR ürününü içeren rekombinantlar olmaktadır.

### 4.5.3. Ligasyon Ürünü İçeren Hücrelerin (Rekombinantların) Doğrulanması

#### 4.5.3.1. Plazmit İzolasyonu

Transformasyon sonrası petride belirlenen kolonilerin ligasyon ürünü içerip içermediğinin doğrulanması için Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System plazmit izolasyon kiti ile plazmit izolasyonu yapıldı. Bu amaçla, 3 µL Amp+ li LB sıvı besiyerine petrilere inokülasyon yapıldı ve 37 °C 'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 10000xg' de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet üzerine 250 mL lizis tamponu eklenerek alt üst edildi. Daha sonra 10 µL alkalın proteaz eklenerek alt üst edildi ve 5 dakika oda ısında inkübe edildi. Ardından 350 µL nötralizasyon tamponu eklenerek alt üst edildi ve 16000g 'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice kolona alınarak 1 dakika daha santrifüj edildi. Kolon 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı ve 100 µL nükleaz içermeyen su ile plazmit elüsyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı

#### 4.5.3.2. Plazmitlere Klonlanan Ürünün PZR ile Doğrulanması

Plazmit izole edildikten sonra plazmit üzerinde istediğimiz ürünün varlığının doğrulanması için aptamere ait primerler ve Promega Taq DNA polimeraz kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Tablo 4.4). PZR sonrası beklenen büyüklükteki bantlar %1 'lik agaroz jelde görüntülendi.

**Tablo 4.4.** PZR Koşulları.

95 °C	2 dk	1 Döngü
95 °C	30 sn	
60 °C	15 sn	25 Döngü
72 °C	15 sn	
72 °C	5 dk	1 Döngü

#### **4.5.4.Sanger Sekanslama**

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerde doğrulanan plazmitler Sanger dizileme için BM Laboratuvarına (Ankara) gönderildi. Sekans sonuçları ile zenginleşen aptamerlerin nükleotid dizileri çıkarıldı. Elde edilen aptamer dizilerinin sekonder yapıları, termodinamik özelliklerinin karşılaştırılması ve ayrıca kendi kendine hibritleşme durumlarının analizi için çevrimiçi bir program olan Mfold (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) kullanıldı. Aptamer dizilerinin benzerlik analizi için çevrimiçi analiz programı olan Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) kullanıldı (Madeira vd., 2024).

#### **4.5.5. Aptamerlerin Bağlanma Afinitelerinin Hesaplanması**

Kemerine yüksek afinite gösteren aptamer dizilerinin termodinamik olarak ne kadar stabil oldukları ve hibritleşme oranları Mfold üzerinden karşılaştırıldı. Bu analize göre en uygun aptamerler seçildi. Aptamerlerin K<sub>d</sub> (Dissosiyasyon Sabiti) değerlerinin hesaplanması amacıyla termodinamik olarak daha stabil olan 3 aptamer dizisinin 5' ucu 6-karboksifluoressein (FAM) etiket ile etiketlendi. Her biri FAM etiketli olan aptamerler 20, 50, 100, 200, 500 ve 1000 nM derişimde hazırlandı. Boncuğa bağlı kemerin miktarı sabit tutularak hazırlanan her bir derişim, protein ile ayrı ayrı muamele edildi. Boncuğa bağlı protein miktarı 13. SELEX turunda elde edilen en düşük miktar baz alınarak yapıldı. Her bir aptamerin floresan yoğunluğuna bağlı olarak standart grafiği çizildi. Ardından proteine bağlanan FAM etiketli aptamerler floresan spektrometre (Lumina Fluorescence Spectrometer, Thermo Scientific) ile ölçülerek aptamer konsantrasyonuna karşı floresan yoğunluğu grafiği çizildi. Daha sonrasında aptamer ile proteinin etkileşimini modellemek amacıyla moleküler kenetlenme yazılımı kullanılarak etkileşimler analiz edildi.

#### **4.6. Aptamer–Protein Etkileşimlerinin HADDOCK ile Modellenmesi ve**

##### **Yorumlanması**

Aptamer–protein komplekslerinin yapısal modellenmesi, veri destekli protein–ligand moleküler kenetlenme (docking) yazılımı olan HADDOCK 2.4 (High Ambiguity Driven DOCKing) kullanılarak gerçekleştirildi (Dominguez vd., 2003; van Zundert vd., 2016). Moleküler kenetlenme hesaplamalarında tam uzunluklu protein (FC1–FC5) ve S157 izoformu (S157C1–S157C5) olmak üzere iki farklı reseptör yapısı, beş farklı DNA aptameri (C1–C5) ile ayrı ayrı eşleştirildi. Her kompleks için arayüz kısıtlamaları (ambiguous interaction restraints, AIR), literatür verileri ve yapısal analiz temel alınarak tanımlandı. Moleküler kenetlenme protokolü standart HADDOCK iş akışını izlemiş olup sırasıyla katı gövde enerji

minimizasyonu (rigid-body energy minimization) ve yarı-esnek simülasyon (semi-flexible simulated annealing) aşamalarını kapsamıştır. Her kompleks için üretilen modeller arasından en düşük HADDOCK skoru ve etkileşim arayüzü mesafelerine göre en iyi model seçildi; arayüz rezidüleri ve rezidü çifti mesafeleri HADDOCK çıktı dosyalarından analiz edildi. Tüm görselleştirmeler Chimera X yazılımı ile hazırlandı.

## 5. SONUÇLAR

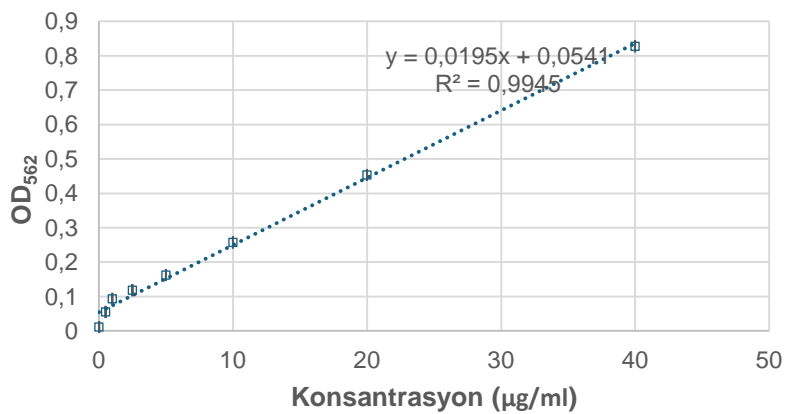
### 5.1. Kemerinin Manyetik Boncuklara Bağlanma Aktivitesinin Ölçümü

#### 5.1.1. Micro BCA Protein Assay Kit ile Ölçüm

BSA standart kalibrasyon grafiği, yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucu çizildi (Tablo 5.1). Tablo 4.1’de verilen dilüsyonlar kullanılarak yapılan ölçümler sonucu OD<sub>562</sub> - Konsantrasyon grafiği hazırlandı. Ölçümler üç tekrarlı yapıldı ve ortalamaları alındı. Mikroplaka ve nanodrop için ölçümler yapılsa da küçük hacimde çalışıldığı için nanodrop grafiği baz alındı (Şekil 5.1).

**Tablo 5.1.** Nanodrop ölçümünde elde edilen ortalama sonuçlar.

Konsantrasyon	Absorbans (562 nm)
40 µg/mL	0,827 ± 0,0035
20 µg/mL	0,363 ± 0,003
10 µg/mL	0,257 ± 0,0035
5 µg/mL	0,232 ± 0,002
2,50 µg/mL	0,211 ± 0,0015
1,00 µg/mL	0,083 ± 0,0015
0,5 µg/mL	0,055 ± 0,0035
0 µg/mL	0,011 ± 0,0345



**Şekil 5.1.** Nanodrop ölçümleri sonucu elde edilen BSA standart grafiği.

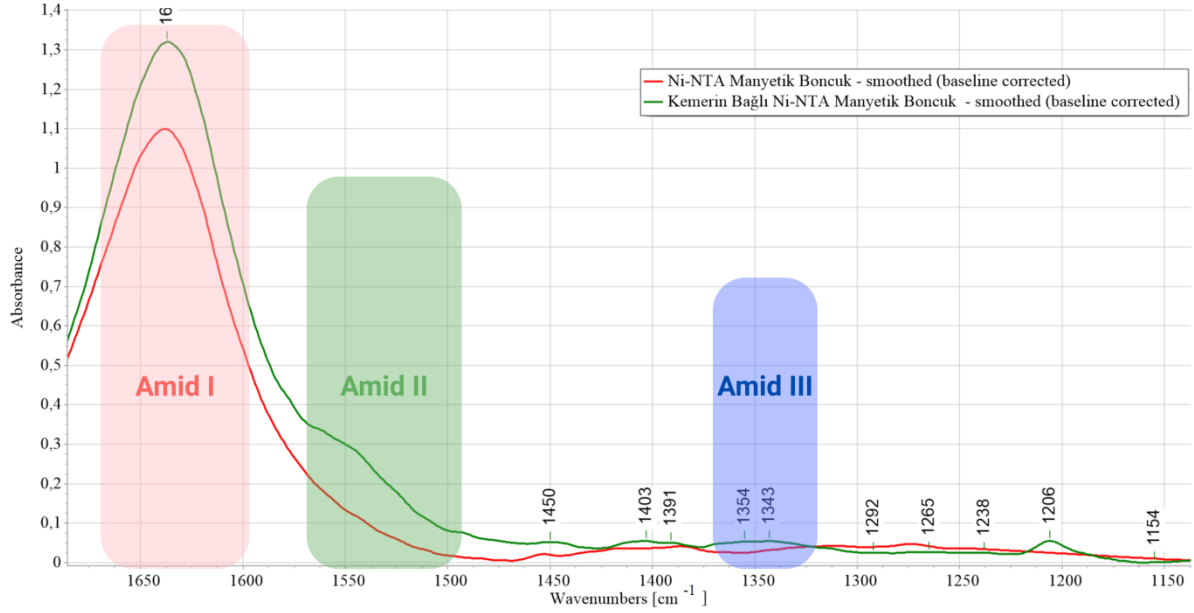
Çizilen kalibrasyon grafiği  $R^2$  değeri 0,9945 olan bir doğru verdi. Bundan dolayı protein ölçümleri bu grafik üzerinden yorumlandı. Saf kemerin proteini ve 30 dk boncukla inkübasyonun ardından ölçülen kemerin miktarlarının grafik üzerinden hesaplanan değerleri Tablo 5.2’de verildi. Bu değerler kemerinin boncuğa bağlandığını doğrulamaktadır.

**Tablo 5.2.** Kemerinin Boncukla İnkübasyon Öncesi ve Sonrası Miktarları

İnkübasyon Öncesi Kemerin	30 dk Boncukla İnkübasyon Sonrası
39,22 $\mu\text{g/ml}$	Süpernatantta Kalan Kemerin Tayin aralığı dışında ölçüm

### 5.1.2. FT-IR ile Ölçüm

Kemerinin manyetik boncuklara immobilizasyonun gösterilmesi adına kemerin proteini, Ni-NTA manyetik boncuklar ile 24 saat inkübe edildi ve FT-IR analizi yapıldı. ATR-FTIR spektrumları  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında elde edildi. Spektrumlara sırasıyla zemin çizgisi düzeltme ve 10 nokta 3. Derece Savitsky-Golay düzleştirme uygulandı (Belanche vd., 2013). Şekil 5.2’de proteine ait Amid I-III bantlarının gözlenebileceği  $1160\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  aralığı verildi (M. Kaur vd., 2024).  $1340\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde proteine ait olan  $\text{CH}_3$  ve C-C gerilmesine ait Amid III bandı görölmektedir (Nafie ve Mantsch, 1993).  $1480\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda ise Amid II bandı görölmektedir (Hands vd., 2016).  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  arasında da  $\alpha$ -heliksel,  $\beta$ -bükümlü levhalar,  $\beta$ -dönüşler, çapraz beta-levhalar ve yan-zincir yapıları ait  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , CNN titreşimleri ile ilişkili Amid I bandı gözlenmektedir (Hands vd., 2016). Proteine özđü olan Amid bağlarının protein bağlı manyetik boncuklarda gözlenmesi, kemerinin boncuklara bağlandığı göstermektedir.



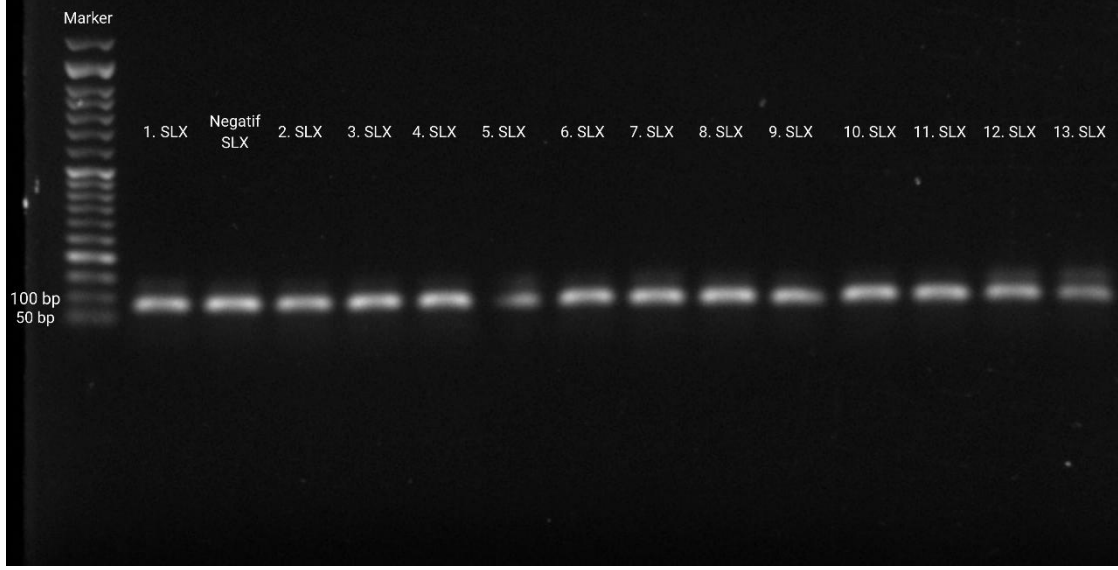
**Şekil 5.2.** Ni-NTA manyetik boncuklar ve kemerin bağlı Ni-NTA manyetik boncukların ATR FT-IR sonuçları. Yeşil: Kemerin bağlı manyetik boncuk, kırmızı: boş manyetik boncuk.

## 5.2. SELEX Döngüleri Sonucu Aptamer Seçimi

Her SELEX döngüsünde değiştirilen koşullar ve çıktılar Tablo 5.3'te gösterildi. Her bir SELEX'in sonunda yapılan PZR ürünleri agaroz jelde görüntülendi ve beklendiği gibi yaklaşık 80 bp (40 baz aptamer+ primerler) bantlar Şekil 5.3'te gösterildi. Yapılan 14 SELEX döngüsü sonucu 13. Döngüde kemerine en yüksek afinite gösteren aptamerler seçildi. SELEX turları sonunda elde edilen 1 µL boncuğa bağlı bulunan 25 pmol kemerin proteinine afinite gösteren aptamer dizileri elde edildi. Bu aptamer dizilerinin belirlenebilmesi için klonlama çalışmalarına geçildi. Klonlama çalışmaları, 96,49 ng/µL değerinde olan PZR ürünü ile gerçekleştirildi.

**Tablo 5.3.** SELEX turları boyunca değişen koşullar. ssDNA kütüphanesi: Bir önceki turda PCR yapılarak zenginleştirilen kütüphanenin tek zincirli hali. İnkübasyon süresi ve yıkamalar: boncuğa bağlı proteinle kütüphanenin inkübasyonu ve sonrasında SELEX tamponuyla yıkanması. Çıktı DNA: proteine afinite gösteren aptamerlerin (ssDNA). Zenginleştirilen dsDNA: proteine afinite gösteren aptamerlerin PCR ile zenginleştirilmesi.

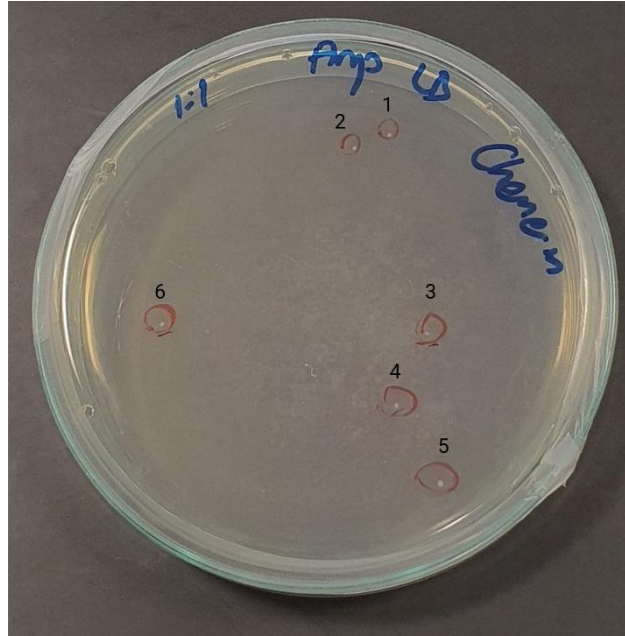
SELEX Turu	ssDNA Kütüphanesi (ng/μL)	Manyetik Boncuğa Bağlı Protein (μL)	İnkübasyon Süresi ve Yıkamalar	Çıktı ssDNA (ng/μL)	Zenginleştirilen dsDNA (ng/μL)
1	28,84	40	60 dk 1X500 μL	30,15	141,12
NS	31,58	40 (sadece manyetik boncuk)	60 dk	28,15	167,29
2	23,68	40	60 dk 1X500 μL	26,32	162,73
3	1,6	20	60 dk 1X500 μL	15,95	292
4	4,7	20	45 dk 2X500 μL	3,93	165,52
5	2,96	20	30 dk 2X500 μL	5,57	216,02
6	2,24	20	30 dk 2X1000 μL	3,75	152
7	18,67	10	30 dk 2X500 μL	5,5	133,63
8	2,32	10	30 dk 2X500 μL	4,13	103
9	5,2	5	30 dk 2X500 μL	0,52	159
10	1,59	2,5	30 dk 2X500 μL	1	118,24
11	2,45	1	30 dk 2X500 μL	0,75	91,75
12	1,74	1	20 dk 2X500 μL	0,56	105
13	0,26	1	10 dk 2X500 μL	0,47	96,49
14	1,51	1	5 dk 2X500 μL	-0,86	



**Şekil 5.3.** 1-13 arası SELEX turlarında yapılan PZR döngülerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. Marker: 100bp Opti-DNA Marker.

### 5.3. Klonlama Sonuçları

Yapılan transformasyon sonrası petride büyüyen kolonilerin, 13. SELEX'ten gelen PZR ürününü içeren rekombinantlar olduğu bilindiği için petrideki 6 koloni başarılı olan transformasyonu göstermektedir (Şekil 5.4).



**Şekil 5.4.** Transformasyon sonrası Amp<sup>+</sup> LB besiyerinde PZR ürününü içeren koloniler.

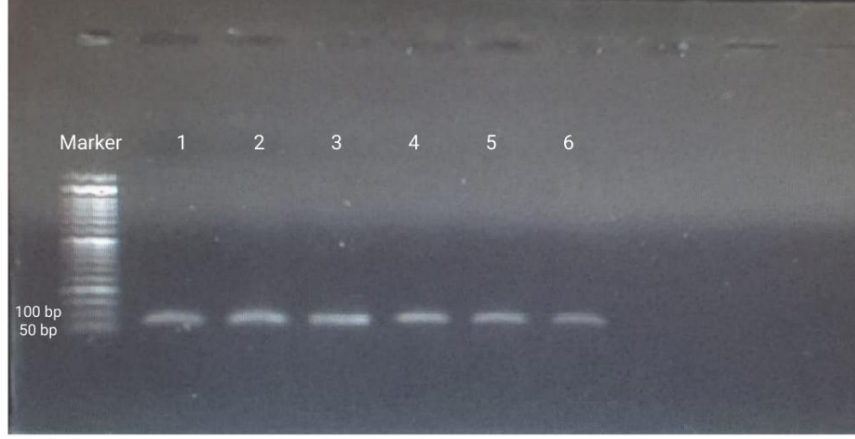
#### 5.4. Klonlama Sonucu PZR Ürünü İçeren Plazmitlerin Doğrulanması

6 adet kolonide bulunan ve PZR ürününü içeren plazmitlerin doğrulanması için plazmit izolasyonu yapıldı ve agaroz jel elektroforezinde doğrulandı (Şekil 5.5). pJET1.2/blunt klonlama vektörü (plazmit) uzunluğu 2974 bp'dir. Plazmit içerisine klonlanan PZR ürünümüz ise 80 bp olduğundan dolayı agaroz jelde yaklaşık 3000 bp seviyelerinde bant gözlendi.



Şekil 5.5. Plazmid izolasyonu. 1-6 kolonilerden izole edilen plazmitler.

Plazmitlerin doğrulanmasının ardından plazmite klonlanan PZR ürününün doğrulanması için aptamerlere ait primerler ve plazmit, kalıp olarak kullanılarak PZR kuruldu. Ardından agaroz jelde görüntülendi. Beklendiği gibi 80 bp (aptamer+primerler) seviyesinde bant görüldü (Şekil 5.6).



**Şekil 5.6.** SELEX turlarındaki PZR ürününü içeren (aptamer) plazmitlerin PZR ile doğrulanması. 1-6 PZR ürünü (aptamer)

Sonuç olarak transformasyon sonrası elde edilen 6 koloninin de PZR ürününü içerdiği doğrulandı. Beklenildiği gibi yaklaşık 80 bp (40 baz aptamer+primerler) bantlar her 6 plazmitte de tespit edildi. Doğrulama sonrası 6 koloniye ait plazmitlerin Sanger dizileme sonuçları Tablo 5.4'te verildi. 6 adet dizi içinde iki tanesinin aynı olduğu Nükleotit Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) yapılarak doğrulandı ve kaydedildi. Sonuç olarak 5 farklı aptamer dizisi elde edildi.

**Tablo 5.4.** SELEX ile Kemerin Proteinine Özgü Seçilen Aptamer Dizileri

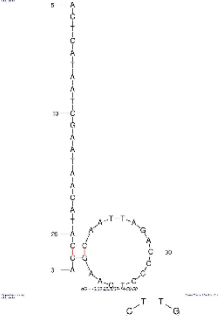
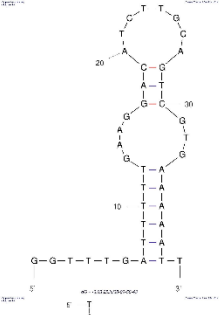
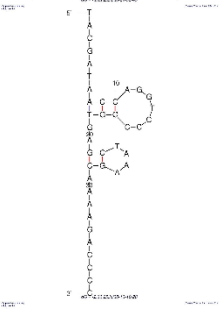
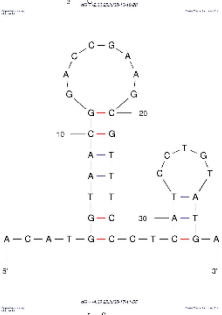
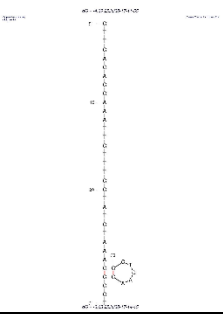
Aptamer Adı	Aptamer Dizisi
Apt-C1	ACTGATAATGGAATAACATAGCAATTAGACCCCTCAAGCA
Apt-C2	GGTTTGATTTTTGAAGGACATCTTGCAGTCGTGAAAAATT
Apt-C3	TACGATAACCAGGTCCCGGTGAGCTAAAGCAAAAGACCCC
Apt-C4	ACATGGTAACGGACCGAAGCGTTTCCCTCATCCTGTATGA
Apt-C5	CTTCAGACCAAATTCTTTCCTATCTAAAGCCTCAAGCGCT

## 5.5. Sekanslanan Aptamer Dizilerinin Biyoinformatik Analizi

### 5.5.1. MFold Analizi

Dizisi belirlenen 5 aptamer için, MFold üzerinden belirli koşullar ayarlandı ve oluşabilecek olası sekonder yapılar en düşük  $\Delta G$  değerine göre görselleştirildi. Katlanma sıcaklığı 25 °C, iyonik koşullar 100 nM Na<sup>+</sup> ve 0.0M Mg<sup>2+</sup>, katlanma sayısı üst sınırı 50 olarak ayarlandı ve her bir aptamerin sekonder yapısı Tablo 5.5'te gösterildi. Katlanan aptamerlerin ikincil yapı oluşumuna katılan hairpin ve heliks yapılarının termodinamik verileri ise Tablo 5.6'da verildi.

**Tablo 5.5.** Mfold analizi sonucu elde edilen katlanmış aptamerlerin yapısı ve termodinamikleri.

Aptamer Dizisi (5'-3')	$\Delta G$ (kcal/mol)	$T_m$ (°C)	Katlanma Yapısı
ACTGATAATGGAATAACATAGCAATTAGACCCCTCAAGCA	-0,39	27,9	
GGTTTGATTTTGAAGGACATCTTGACATCGTGAAAAATT	-0,93	28,8	
TACGATAACCAGGTCCCGGTGAGCTAAAGCAAAAGACCCC	-2,36	23,6	
ACATGGTAACGGACCGAAGCGTTTCCCTCATCTGTATGA	-4,39	39,6	
CTTCAGACCAAATTCCTTCTATCTAAAGCCTCAAGCGCT	-0,63	31	

**Tablo 5.6.** Aptamerlerin katlanma yapısına katılan loop ve heliks yapılarının termodinamikleri.

<b>Apt-C1</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>
Heliks	-2,31
Hairpin loop	3,42
<b>Apt-C2</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>
Heliks	-5,05
Interior loop	4,3
Heliks	-2,82
Hairpin loop	3,04
<b>Apt-C3</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>
Heliks	-2,31
Hairpin loop	2,14
Heliks	-3,33
Hairpin loop	3,27
<b>Apt-C4</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>
Heliks	-2,38
Hairpin loop	2,57
Heliks	-4,79
Hairpin loop	2,94
<b>Apt-C5</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>
Heliks	-2,31
Hairpin loop	2,29

Aptamerlerin katlanma özellikleri ve oluşturduğu yapıların haricinde aptamerlerin kendi kendine hibritleşme özellikleri de analiz edildi. Bunun için Mfold üzerinden DINAMelt özelliği kullanılarak her aptamerin hibritleşme değerleri Tablo 5.7’de gösterildi.

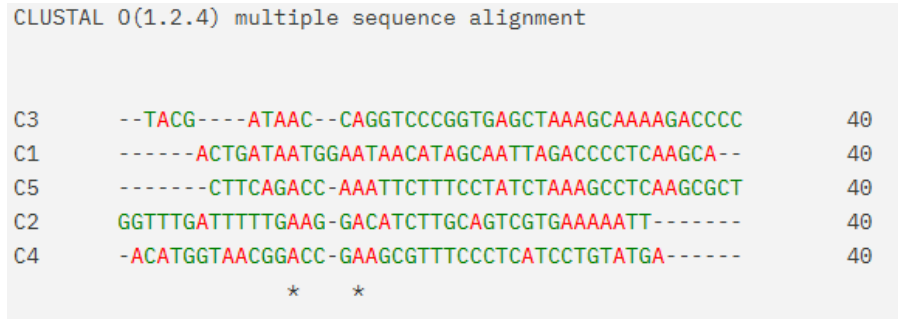
**Tablo 5.7.** Aptamerlerin hibridizasyon değerleri.

<b>Aptamer Adı</b>	<b>Aptamer Dizisi</b>	<b><math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
Apt-C1	ACTGATAATGGAATAACATAGCAATTAGACCCCTCAAGCA	7,6	48,967
Apt-C2	GGTTTGATTTTTGAAGGACATCTTGCAGTCGTGAAAAATT	9,7	51
Apt-C3	TACGATAACCAGGTCCCAGGTGAGCTAAAGCAAAAGACCCC	9,5	57,633
Apt-C4	ACATGGTAACGGACCGAAGCGTTTCCCTCATCCTGTATGA	13,5	60,6
Apt-C5	CTTCAGACCAAATTCTTTCCTATCTAAAGCCTCAAGCGCT	7,3	54,1

Analiz edilen 5 aptamer arasında Apt-C3, Apt-C4 ve Apt-C5 termodinamik olarak düşük  $\Delta G$  ve yüksek  $T_m$  derecelerine sahip olduğu için daha kararlı bir yapı göstermektedir (Zuker, 2003; SantaLucia, 1998). Ayrıca bu üç aptamerin sahip oldukları loop ve hairpin yapıları diğer iki aptamere kıyasla daha stabildir. Her bir aptamerin hibridizasyon değerlerine bakıldığında ise yine Apt-C3, Apt-C4 ve Apt-C5'in diğerlerine kıyasla hibritleşme oranı düşük çıkmıştır. Çünkü Tablo 5.7'de da görüldüğü gibi yüksek  $T_m$  ve düşük  $\Delta G$  değeri olan aptamerlerin hibritleşme oranları daha yüksektir.

### 5.5.2. Clustal Omega Analizi

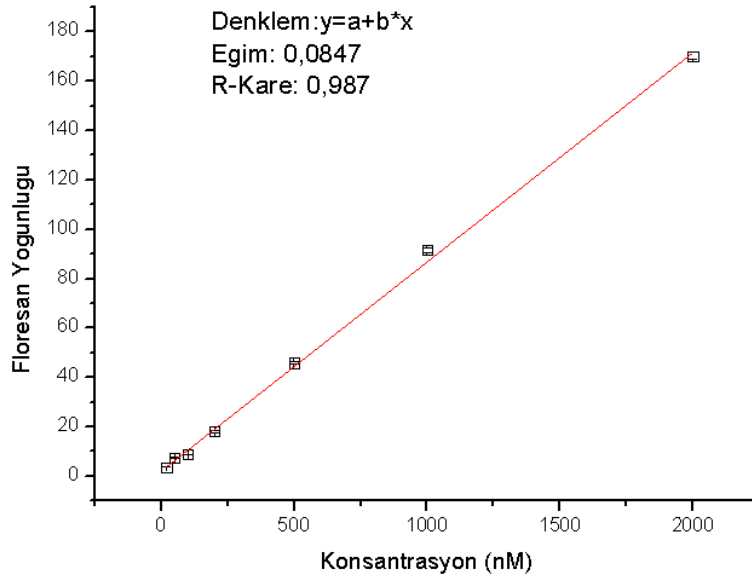
5 farklı aptamer diziliminin çoklu hizalama ile benzerlik oranlarına bakıldı. Her dizide 2 farklı noktada benzerlik olduğu gözlemlendi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. 5 farklı aptamer dizisine uygulanan çoklu hizalama sonuçları.

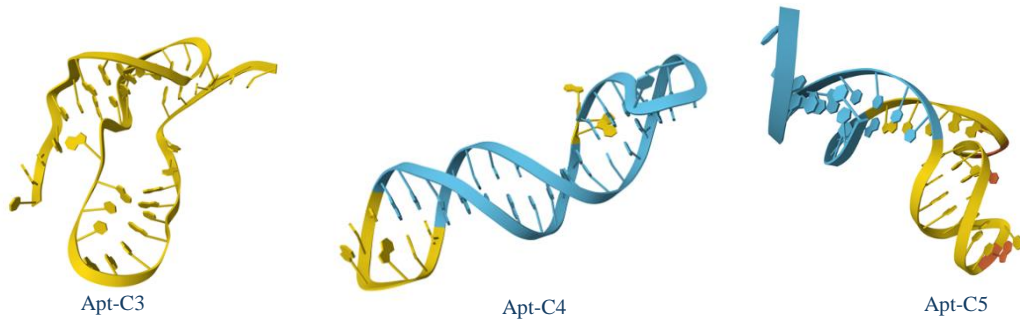
### 5.5.3. Aptamerlerin Bağlanma Afnitelerinin Belirlenmesi

FAM ile etiketlenmiş aptamerler 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ve 2000 nM konsantrasyonlarında hazırlanarak standart eğri oluşturmak amacıyla floresan ölçümleri yapıldı. Ölçümler, uyarım dalga boyu  $\lambda = 490$  nm ve emisyon dalga boyu  $\lambda = 520$  nm olacak şekilde gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için ölçümler iki tekrar halinde yürütüldü ve ortalama floresan sinyalleri ile standart sapmaları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 5.8). Oluşturulan grafik denklemi,  $y = a + b \cdot x$  şeklindedir. Grafiğin eğimi  $0,13427 \pm 0,0099$  ve grafiğin  $R^2$  değeri  $0,972$ 'dir.

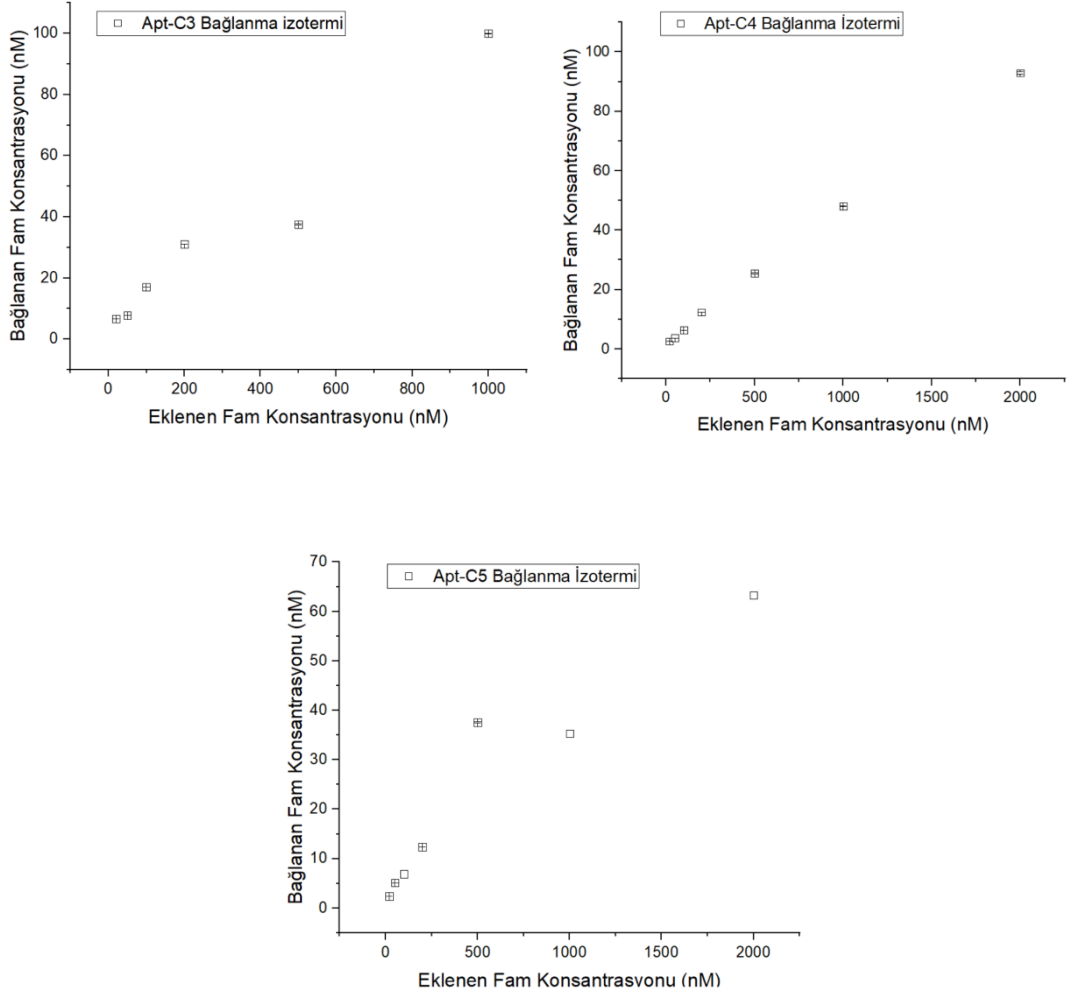


Şekil 5.8. Farklı FAM derişimleriyle oluşturulan standart grafiği.

Termodinamik açıdan en stabil olan Apt-C3, Apt-C4 ve Apt-C5 aptamerlerinin 3 boyutlu yapıları AlphaFold (Jumper vd., 2021) kullanılarak görselleştirildi (Şekil 5.9). Seçilen 3 farklı aptamere yönelik floresan ölçümleri, aynı konsantrasyon aralıklarında ve uyarım dalga boyu  $\lambda = 490$  nm, emisyon dalga boyu  $\lambda = 520$  nm olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 5.10'da sunuldu.



Şekil 5.9. Üç farklı aptamerin yapıları.



Şekil 5.10. Üç farklı aptamerin bağlanma izotermi.

Standart eğrinin oluşturulması sonucu elde edilen eğim değeri kullanılarak her üç aptamer için bir standart sapmalı sinyal değişiminin karşılık geldiği konsantrasyon miktarı hesaplandı. Ardından Apt-C3, Apt-C4 ve Apt-C5 aptamerleri için oluşturulan bağlanma izotermi grafiklerinde elde edilen denklemler kullanılarak  $K_d$  hesaplaması yapıldı.  $K_d$  değeri belirlenirken, proteinin manyetik boncuklara bağlanması ve etiketli aptamerin bağlanmayan miktarı üzerinden bir analiz gerçekleştirildiğinden doygunluğun belirlenmesi için önce Freundlich adsorbsiyon izoterm modeli kullanıldı. Ardından Langmuir kinetik modeli kullanılarak  $K_d$  değeri tespit edildi. Hesaplama sonucu elde edilen  $K_d$  değerleri Tablo 5.8’de verildi.

**Tablo 5.8.** Aptamerlerin Kd değerleri

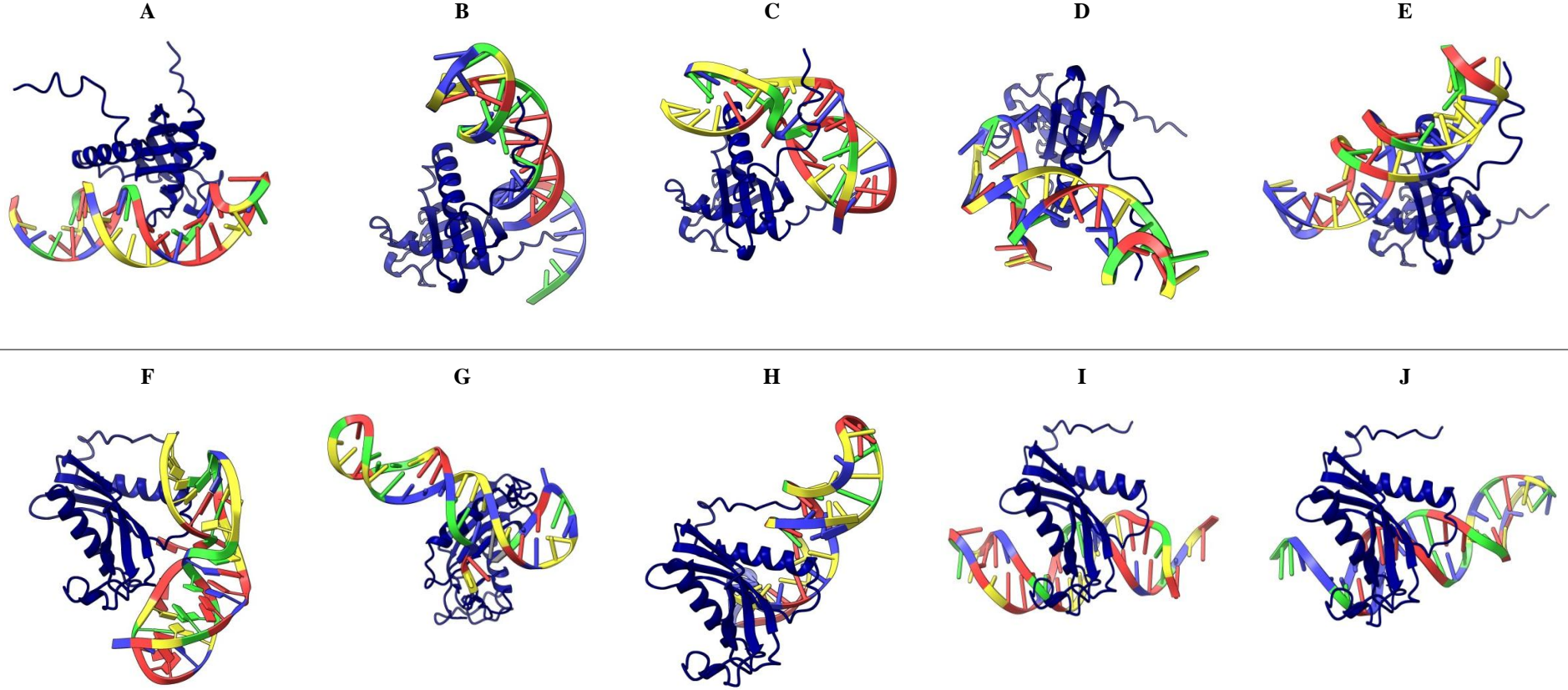
<b>Aptamer</b>	<b>Kd (nM)</b>
Apt-C3	124,1±6,3
Apt-C4	224,7 ±2,7
Apt-C5	288,3 ±7,2

Kd değerinin düşük olması, aptamerin hedefe olan afinitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Kd sonuçlarına göre en düşük olan iki Kd değeri Apt-C3 ve Apt-C4'e aittir. Bu ikisi arasında en düşük olan Apt-C3 olmasına rağmen, termodinamik açıdan daha stabil olarak bulunan Apt-C4'ün sensör çalışmaları için daha uygun olduğu düşünülmektedir. Bu sayede kemerin proteini için aday aptamerler başarıyla seçilmiştir.

### **5.6. Aptamer–Protein Etkileşimlerinin HADDOCK ile Modellenmesi ve Analizi**

HADDOCK kenetlenme sonuçları incelendiğinde, tam uzunluklu protein (FC serisi) ile aptamerler (C1–C5) arasındaki etkileşimlerin belirgin biçimde farklı geometriler sergilediği grlmektedir (şekil 5.11, A-E panelleri). FC komplekslerinde protein, büyük bir globüler yapı olarak DNA ift sarmalıyla geniş bir temas yüzeyi oluşturmakta; arayüzde ortalama 60–75 rezidü çifti etkileşimi ve 3.2–3.9 Å aralığında mesafeler gözlemlenmektedir. Görüntülerde de açıkça izlenebileceği gibi her aptamer, tam uzunluklu proteine farklı bir açıdan yaklaşmaktadır: C1 ve C5 aptamerleri proteine sarmal eksenine paralel biçimde bağlanırken, C3 aptameri daha dik bir geometri sergilemekte ve protein gövdesinin içine kısmen gömülmektedir. Bu eşitlilik, tam uzunluklu proteinin yüzey esnekliğinin ve birden fazla potansiyel bağlanma bölgesi sunduğunun bir göstergesidir.

S157 izoformuyla gerçekleştirilen kenetlenmeler ise daha kompakt ve geometrik açıdan tekdüze etkileşimler ortaya koymaktadır (şekil 5.11, F-J panelleri). İzoform, tam protein kadar büyük bir yapısal ereve sunmamasına karşın bazı aptamerlerle (zellikle S157C1 ve S157C5) tam proteine kıyasla daha fazla yakın temas (<3 Å) oluşturabilmektedir; bu durum, izoformun belirli aptamerler için daha erişilebilir veya daha uyumlu bir bağlanma yüzeyi sunduğuna işaret etmektedir. Görüntülerde S157 serisi proteinlerinin DNA sarmalının farklı bölgelerine konumlandığı dikkat çekmekte olup bu bulgu, aptamer-protein uyumunun (aptamer–protein complementarity) yalnızca mesafe değil, aynı zamanda bağlanma bölgesi kimliği ve amino asit kompozisyonu bakımından da gruplar arasında farklılaştığını ortaya koymaktadır.



**Şekil 5.11.** HADDOCK ile modellenen aptamer-protein komplekslerinin yapısal gösterimi. Tam uzunluklu protein (FC1-FC5, A-E panelleri) ve S157 izoformu (S157C1-S157C5, F-J panelleri) ile beş farklı DNA aptamerinin (C1-C5) en iyi kenetlenme modelleri gösterilmektedir. Tüm komplekslerde protein koyu mavi ribbon gösterimiyle, aptamer nükleotidleri ise baz kompozisyonuna göre renklendirilmiş çift sarmal yapıyla temsil edilmektedir (kırmızı: DA, yeşil: DG, sarı: DT, mavi: DC). FC serisi komplekslerinde tam uzunluklu proteinin aptamerlerle geniş ve geometrik açıdan çeşitli temas yüzeyleri oluşturduğu, S157 fragmenti komplekslerinde ise daha kompakt bağlanma geometrileri sergilendiği izlenmektedir. Tüm görseller PyMOL yazılımı kullanılarak hazırlanmıştır.

### 5.6.1. Arayüz Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme

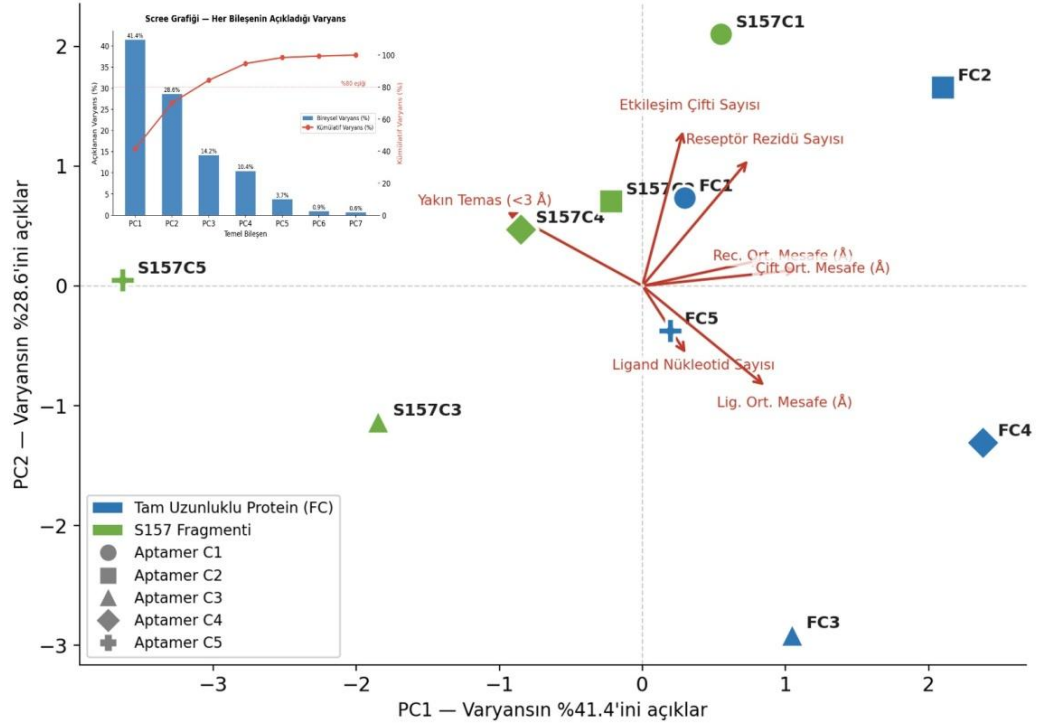
HADDOCK tabanlı yapısal kenetlenme analizleri sonucunda elde edilen her bir kompleksin arayüz etkileşimlerini kantitatif olarak tanımlamak amacıyla çeşitli yapısal metrikler hesaplandı. Bu kapsamda; reseptör (protein) arayüz rezidü sayısı, ligand (aptamer) arayüz nükleotid sayısı, toplam rezidü-nükleotid etkileşim çifti sayısı ve 3 Å'dan daha kısa mesafedeki yakın temas (close contact) sayıları belirlendi. Tam uzunluklu protein ile S157 izoformunun aptamer bağlanma profillerini karşılaştırmak amacıyla Temel Bileşenler Analizi (PCA) uygulandı. PCA öncesinde tüm değişkenler z-skoru normalizasyonu ile standardize edildi. Analizler Python programlama dili (v3.12) kullanılarak scikit-learn ve matplotlib kütüphaneleri aracılığıyla gerçekleştirildi. HADDOCK analizinden elde edilen tüm komplekslere ait arayüz metrikleri Tablo 5.9'da özetlenmiştir.

**Tablo 5.9.** HADDOCK ile modellenen 10 aptamer-protein kompleksine ait arayüz metrikleri özeti. Rec. Rez.: reseptör arayüz rezidü sayısı; Lig. Nük.: ligand arayüz nükleotid sayısı; Etk. Çifti: toplam etkileşim çifti sayısı; Yakın Temas: 3 Å altındaki temas sayısı; Yakın/Çift: yakın temas oranı.

Kompleks	Protein	Aptamer	Rec. Rez.	Lig. Nük.	Etk. Çifti	Yakın Temas	Ort. Mesafe (Å)	Yakın/Çift
FC1	Tam uzunluklu	C1	33	18	68	13	3.685	0.191
FC2	Tam uzunluklu	C2	34	21	75	16	3.844	0.213
FC3	Tam uzunluklu	C3	23	20	49	11	3.813	0.224
FC4	Tam uzunluklu	C4	29	19	56	8	3.795	0.143
FC5	Tam uzunluklu	C5	27	19	57	12	3.647	0.211
S157C1	S157 İzoformu	C1	33	17	72	16	3.829	0.222
S157C2	S157 İzoformu	C2	30	17	64	15	3.713	0.234
S157C3	S157 İzoformu	C3	21	23	60	18	3.594	0.300
S157C4	S157 İzoformu	C4	31	18	58	15	3.604	0.259
S157C5	S157 İzoformu	C5	21	16	57	21	3.513	0.368

### 5.6.2. Temel Bileşenler Analizi (PCA)

Temel bileşenler analizi (PCA), toplam varyansın %70,0'ını açıklayan ilk iki bileşen (PC1: %41,4; PC2: %28,6) temelinde FC ve S157 serisi komplekslerinin PCA uzayında birbirinden belirgin biçimde ayrıştığını ortaya koymaktadır. PC1 eksenini boyunca FC2 ve FC4 kompleksleri pozitif yönde, S157C5 ve S157C3 kompleksleri ise negatif yönde konumlanmıştır. Bu ayrışmada yükleme analizi incelendiğinde, PC1'in ağırlıklı olarak çift ortalama mesafe, reseptör ve ligand ortalama mesafe değişkenleri tarafından şekillendirildiği görülmektedir; dolayısıyla FC serisinin S157 fragmentine kıyasla daha uzun mesafeli etkileşim profilleri sergilediği söylenebilir. PC2 eksenini ise etkileşim çifti sayısı ve reseptör rezidü sayısı yüklemeleri tarafından tanımlanmakta olup FC2 ve S157C1 komplekslerinin bu eksen boyunca yukarı konumlanması, söz konusu komplekslerin daha geniş arayüz yüzeyleri oluşturduğuna işaret etmektedir. Buna karşın yakın temas değişkeni PC1 negatif yönünde yüklenmekte, başka bir ifadeyle yüksek yakın temas sayısı düşük ortalama mesafeyle eş zamanlı seyretmektedir; S157C5 ve S157C3 komplekslerinin bu bölgede kümelenmesi bu ilişkiyi desteklemektedir. Scree grafiği incelendiğinde dördüncü bileşenden itibaren ek varyans kazanımının belirgin biçimde azaldığı ve ilk dört bileşenin toplam varyansın yaklaşık %95'ini açıkladığı görülmektedir (Şekil 5.12). Bu sonuçlar, aptamer-protein etkileşim profilinin iki temel boyutla — bağlanma mesafesi ve arayüz büyüklüğü — büyük ölçüde tanımlanabildiğini ve iki protein grubunun aptamerlere yapısal açıdan ayrışık örüntülerle bağlandığını istatistiksel düzeyde doğrulamaktadır.

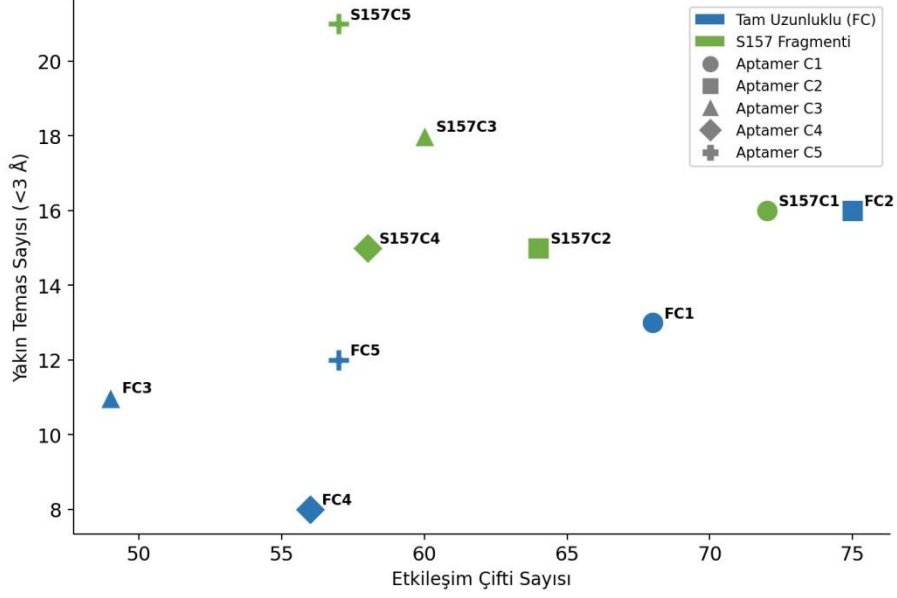


**Şekil 5.12.** Aptamer–protein arayüz özelliklerinin PCA biplot gösterimi. Her nokta bir kompleksi temsil etmekte olup mavi noktalar tam uzunluklu protein (FC), yeşil noktalar S157 fragmenti komplekslerini göstermektedir. Kırmızı oklar her değişkenin PC uzayındaki yüklem yönünü ve büyüklüğünü yansıtmaktadır. FC ve S157 serilerinin PC1 ekseninde belirgin biçimde ayrıştığı izlenmektedir. Inset: Scree grafiği. Her temel bileşenin açıkladığı bireysel varyans (mavi çubuklar) ve kümülatif varyans (kırmızı çizgi) gösterilmektedir. İlk iki bileşen toplam varyansın %70.1'ini açıklamakta, dört bileşen ise %80 eşliğini aşmaktadır.

### 5.6.3. Yakın Temas ve Etkileşim Mesafesi Karşılaştırması

Etkileşim çifti sayısı ile yakın temas arasındaki ilişki incelendiğinde, yüksek etkileşim çifti sayısının ile her zaman yüksek yakın temas elde edilmediği görülmektedir. Özellikle S157C5 kompleksi görece düşük etkileşim çifti sayısına ( $n=57$ ) karşın en yüksek yakın temas değerine ( $n=21$ ) sahiptir (Şekil 5.13); bu durum söz konusu komplekste etkileşimlerin daha yoğun ve sıkı bir yapıda konumlandığını göstermektedir.

FC ve S157 serileri arasındaki en belirgin fark yakın temas sayısında gözlemlenmiştir. S157 fragmenti, özellikle C3 ve C5 aptamerleriyle birlikte tam uzunluklu proteine kıyasla daha yüksek sayıda yakın temas ( $<3 \text{ \AA}$ ) oluşturmuştur (Şekil 5.13). Ortalama etkileşim mesafesi açısından ise S157 serisi tüm aptamerlerde daha düşük değerler sergilemiş, bu durum S157 izoformunun aptamerle daha sıkı bir arayüz oluşturduğuna işaret etmektedir (Şekil 5.13).



**Şekil 5.13.** Etkileşim çifti sayısı ile yakın temas sayısı arasındaki ilişki., S157C5 kompleksi en yüksek yakın temas yoğunluğuyla öne çıkmaktadır.

Tam uzunluklu protein (FC serisi) ve S157 izoformunun beş farklı DNA aptameriyle (C1–C5) oluşturduğu toplam 10 kompleks, HADDOCK veri destekli moleküler kenetlenme yazılımı kullanılarak modellendi ve elde edilen arayüz metrikleri çok boyutlu istatistiksel yöntemlerle karşılaştırıldı. PCA sonuçları, FC ve S157 serisi komplekslerinin yedi arayüz metriği temelinde belirgin biçimde ayrıştığını ortaya koymuştur. PC1 eksenini ağırlıklı olarak etkileşim mesafesi bilgisini temsil ederken, PC2 eksenini arayüz büyüklüğü ile ilişkili değişkenler tarafından şekillendirilmektedir. Bu ayrışma, tam uzunluklu protein ile S157 izoformunun aptamerlere yapısal açıdan farklı bağlanma modları sergilediğini istatistiksel düzeyde doğrulamaktadır. Arayüz mesafesi açısından değerlendirildiğinde, S157 izoformu tüm aptamerlerde tam uzunluklu proteine kıyasla daha düşük çift ortalama etkileşim mesafesi sergilemiştir. Bu bulgu, izoformun aptamerle daha kompakt ve daha sıkı bir arayüz oluşturabildiğine işaret etmektedir. Özellikle S157C5 kompleksi (ortalama mesafe: 3.513 Å, yakın temas: 21) tüm kompleksler arasında en yüksek bağlanma yoğunluğunu sergilemektedir. Benzer biçimde S157C3 kompleksi (yakın temas: 18) de yüksek etkileşim kalitesiyle öne çıkmaktadır.

Reseptör arayüz rezidü sayısı açısından ise FC serisi genel olarak daha geniş yüzey alanı sunmaktadır. FC2 kompleksi 34 reseptör rezidüsüyle en geniş protein arayüzünü oluştururken, bu durum tam uzunluklu proteinin aptamer bağlanması için S157 izoformuna kıyasla daha fazla yüzey erişilebilirliğine sahip olduğunu yansıtmaktadır. Bununla birlikte

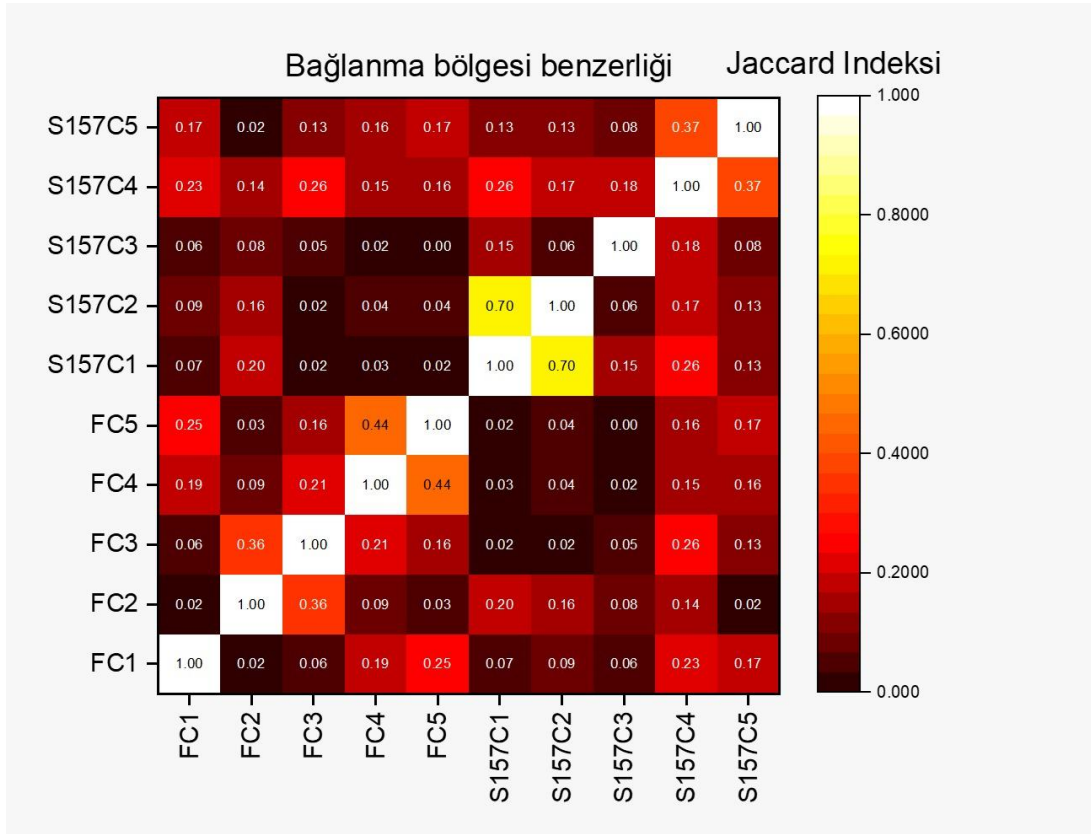
geniş arayüzün her zaman yüksek bağlanma kalitesiyle eşleşmediği, yakın temas analizlerinden açıkça görülmektedir.

Aptamer bazında değerlendirildiğinde, C5 aptamerinin S157 izoformuyla kurduğu etkileşimin hem düşük ortalama mesafe hem de en yüksek yakın temas sayısı bakımından diğer aptamerlere göre belirgin biçimde üstün olduğu görülmektedir. C3 aptameri de her iki protein yapısında yüksek yakın temas değerleri sergileyerek güçlü bir aday aptamer niteliği taşımaktadır. Buna karşın C4 aptameri FC serisinde en düşük yakın temas sayısını (n=8) göstermiş; bu sonuç C4'ün tam uzunluklu proteinle zayıf bir arayüz oluşturduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, aptamer tasarımında protein izoformlarının tam uzunluklu yapılara alternatif olarak kullanılabilmesini ve bazı aptamerlerin (özellikle C5 ve C3) S157 izoformuyla daha güçlü bağlanma profilleri sergileyebileceğini ortaya koymaktadır.

#### **5.6.4. Jaccard İndeksi ile Aptamer-Protein Etkileşim Bölgelerinin Karşılaştırılması**

Seçilen aptamerlerin hedef protein üzerindeki bağlanma bölgelerinin ne ölçüde örtüştüğünü belirlemek amacıyla Jaccard İndeksi hesaplanmıştır. Bağlanma bölgesi benzerlik matrisi değerlendirildiğinde, on kompleks arasında genel Jaccard indeks değerlerinin oldukça düşük seyrettiği (çoğunlukla  $<0.20$ ) görülmektedir (Şekil 5.14). Bu sonuç, farklı aptamerlerin aynı protein üzerinde birbirinden büyük ölçüde ayrışan bağlanma bölgeleri kullandığına işaret etmekte ve her aptamerin kendine özgü bir etkileşim yüzeyi tanımladığını ortaya koymaktadır. Matristeki en yüksek benzerlik değeri S157C1 ile S157C2 arasında gözlemlenmiştir (Jaccard = 0.70); bu iki kompleksin arayüzde büyük ölçüde örtüşen reseptör rezidülerini paylaştığını, dolayısıyla C1 ve C2 aptamerlerinin S157 fragmentinde rekabetçi bağlanma bölgeleri oluşturabileceğini göstermektedir. FC serisi içinde ise en yüksek örtüşme FC4–FC5 arasında (Jaccard = 0.44) tespit edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada FC ve S157 serisi kompleksleri arasındaki Jaccard değerlerinin büyük çoğunlukla 0.20'nin altında kaldığı görülmekte; bu bulgu tam uzunluklu protein ile fragmentin aptamerlerle yapısal olarak farklı bağlanma bölgeleri üzerinden etkileşime girdiğini, dolayısıyla iki yapının birbirinden işlevsel açıdan da ayrılabileceğini desteklemektedir.

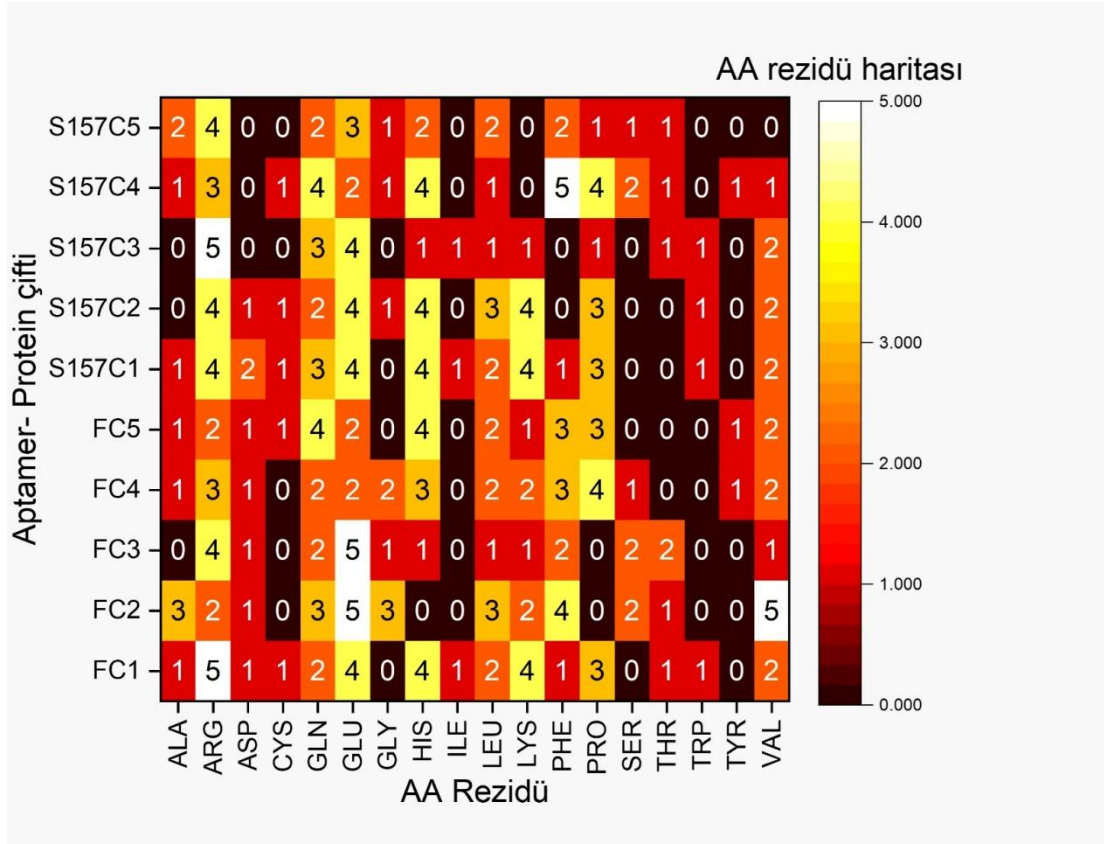


**Şekil 5.14.** Aptamer–protein kompleksleri arasında bağlanma bölgesi benzerlik matrisi (Jaccard İndeksi). Matrisin her hücresi iki kompleksin reseptör arayüz rezidü setleri arasındaki Jaccard benzerlik indeksini (0–1) göstermektedir. Köşegen hücreler aynı kompleksin kendisiyle karşılaştırmasını (1.00) yansıtmaktadır.

### 5.6.5. Aptamer Adaylarının Amino asit Rezidü Etkileşim Profilleri

Aptamerlerin hedef proteine bağlanma eğilimlerini atomik düzeyde incelemek amacıyla hazırlanan amino asit rezidü haritası (Şekil 5.15), adayların belirli amino asitlere karşı seçicilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Amino asit rezidü haritası incelendiğinde, ARG, GLU, HIS ve LYS rezidülerinin tüm komplekslerde yüksek frekansla arayüzde yer aldığı dikkat çekmektedir. Bu bulgu, aptamer–protein etkileşiminin büyük ölçüde elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı ağı aracılığıyla gerçekleştiğine işaret etmektedir; zira söz konusu pozitif ve negatif yüklü rezidüer DNA aptamerinin fosfat omurgasıyla güçlü elektrostatik temas kurabilecek konumdadır. FC2 kompleksinde TRP (n=5) ve VAL (n=5) rezidülerinin eş zamanlı yüksek frekansı dikkat çekici olup bu durum hidrofobik istiflenme ile polar etkileşimlerin bir arada rol oynadığına işaret etmektedir. S157C4 kompleksinde ise PHE (n=5) rezidüsünün belirgin biçimde öne çıkması, bu komplekste  $\pi$ – $\pi$  veya CH– $\pi$  etkileşimlerinin arayüze katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak S157 serisi komplekslerinde GLU ve ARG rezidülerinin baskın kalmasına karşın FC serisinde rezidü çeşitliliğinin daha

fazla olduğu gözlemlenmekte; bu durum tam uzunluklu proteinin aptamerle daha heterojen bir temas yüzeyi oluşturduğunu teyit etmektedir.



**Şekil 5.15.** Aptamer–protein komplekslerinde arayüz amino asit rezidü dağılım haritası. Her satır bir aptamer–protein kompleksini, her sütun bir amino asit türünü temsil etmektedir. Hücre değerleri ilgili amino asidin arayüzde kaç kez yer aldığını göstermekte olup renk skalası koyu kırmızıdan (düşük frekans) açık sarıya (yüksek frekans) doğru uzanmaktadır.

Tam uzunluklu protein (FC serisi) ile S157 izoformunun beş farklı DNA aptameriyle oluşturduğu kompleksler karşılaştırıldığında, iki protein yapısının birbirinden belirgin biçimde ayrılan bağlanma profilleri sergilediği görülmektedir. FC serisi, aptamer başına ortalama 61 etkileşim çifti ve geniş bir reseptör arayüz yüzeyi (FC2: 34 rezidü) ile büyük bir temas alanı oluşturmaktadır; ancak bu geniş arayüz, her zaman sıkı ve yoğun bir bağlanmayla eşleşmemektedir. Nitekim FC4 kompleksi yüksek sayıda etkileşim çifti (n=56) sergilemesine karşın çalışmanın en düşük yakın temas değerine (n=8) sahiptir. Buna karşın S157 izoformu tüm aptamerlerde daha düşük ortalama etkileşim mesafesi sergilemiş (S157 genel ortalaması: 3.669 Å; FC genel ortalaması: 3.757 Å) ve özellikle yakın temas kategorisinde (<3 Å) FC serisini tutarlı biçimde geride bırakmıştır. Bağlanma bölgesi benzerlik matrisi bu ayrışmayı sayısal olarak da desteklemektedir; FC ile S157 kompleksleri arasındaki Jaccard indeks değerleri büyük çoğunlukla 0.20'nin altında kalmakta olup bu sonuç, iki protein yapısının

aptamerleri yapısal açıdan farklı yüzeyler üzerinden tanıdığını göstermektedir. Amino asit rezidü haritasında ise FC serisinin daha heterojen bir rezidü kompozisyonu sunduğu, S157 izoformunun ise ARG, GLU ve HIS rezidüleri başta olmak üzere daha odaklı ve tekrarlayan bir etkileşim örüntüsü sergilediği dikkat çekmektedir.

Bununla birlikte, HADDOCK tabanlı yapısal kenetlenme analizleri, Kd değerlerine dayalı afinite sıralamasını tamamlayan bulgular ortaya koymuştur. Bu analizlerde Apt-C5, S157 proteini fragmentiyle kurduğu komplekste tüm çalışma kapsamının en düşük çift ortalama etkileşim mesafesini (3.513 Å) ve en yüksek yakın temas sayısını (n=21, yakın temas oranı: 0.368) sergilemiştir. Bu bulgular, Apt-C5'in S157 fragmentiyle yapısal düzeyde son derece kompakt ve yoğun bir arayüz oluşturabildiğine işaret etmektedir. Bu aptamerin, yakın temas oranının diğer aptamerlere kıyasla yaklaşık iki ila üç kat yüksek olması, Apt-C5'in bağlanma geometrisinin yalnızca sayısal olarak değil, kalitatif olarak da üstün olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, 288.3 nM düzeyindeki görece yüksek Kd değerinin tek başına Apt-C5'in bağlanma potansiyelini tam anlamıyla yansıtmayabileceğine dikkat çekmektedir; zira Kd değeri denge termodinamiğini yansıtırken, kenetlenme analizleri bağlanma arayüzünün geometrik ve yapısal kalitesi hakkında tamamlayıcı bilgi sunmaktadır.

Bu bağlamda, Apt-C4'ün termodinamik kararlılık ve yapısal uygunluk açısından öne çıkmasının yanı sıra, Apt-C5'in S157 fragmentiyle kurduğu yüksek kaliteli yapısal etkileşimin de göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmektedir. İki aptamerin farklı protein yapıları üzerindeki performansı birlikte değerlendirildiğinde, Apt-C4'ün tam uzunluklu protein için, Apt-C5'in ise S157 fragmenti gibi daha kompakt hedef yapılar için tercih edilebilir bir aday olabileceği öngörülmektedir. Bu hipotezin doğrulanması, her iki aptamerin S157 fragmentiyle eş zamanlı olarak yüzey plazmon rezonansı (SPR) veya izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) gibi hassas Kd belirleme yöntemleri ile test edilmesini gerektirmektedir. Söz konusu deneysel doğrulama çalışmaları, yapısal modelleme ile kinetik afinite ölçümlerini bütünleştirerek aptamer seçiminde daha kapsamlı ve güvenilir bir değerlendirme çerçevesi oluşturacaktır.

S157 izoformu kompleksleri kendi içinde değerlendirildiğinde, C5 aptamerinin birden fazla metrikte üstün performans sergilediği görülmektedir. S157C5 kompleksi tüm çalışma kapsamında en düşük çift ortalama etkileşim mesafesiyle (3.513 Å) ve en yüksek yakın temas sayısı (n=21) öne çıkmakta; bu iki bulgu birlikte, C5 aptamerinin S157 izoformuyla son derece kompakt ve yoğun bir arayüz kurabildiğini ortaya koymaktadır. S157C5'teki yakın temas oranı (yakın temas/toplam çift = 0.368), diğer tüm komplekslerin yaklaşık iki ila üç katı

düzeyinde olup etkileşimlerin yalnızca sayısal olarak fazla değil, yapısal kalite açısından da üstün olduğuna işaret etmektedir. S157C3 kompleksi de yakın temas sayısı (n=18) ve düşük ortalama mesafe (3.594 Å) açısından güçlü bir ikinci aday olarak öne çıkmakta; özellikle arayüzde en fazla ligand nükleotidini (n=23) devreye sokması, bu aptamerin S157 fragmentinin yüzeyine geniş bir aptamer bölgesiyle temas kurabildiğini göstermektedir. Bağlanma bölgesi benzerlik matrisi incelendiğinde S157C4 ile S157C5 arasındaki Jaccard indeksinin (0.37) S157 serisi içinde yüksek bir değer olduğu görülmektedir; bu durum C4 ve C5 aptamerlerinin S157 üzerinde kısmen örtüşen bağlanma bölgeleri kullandığını, dolayısıyla rekabetçi bağlanma potansiyeli taşıdıklarını düşündürmektedir. Buna karşın S157C3'ün matristeki diğer komplekslerle düşük Jaccard değerleri sergilemesi, C3 aptamerinin S157 üzerinde tamamen kendine özgü ve bağımsız bir epitop bölgesi tanımladığını göstermekte; bu özellik, C3'ü gelecekteki çok-aptamerli sensör veya kombinasyon yaklaşımları açısından özellikle değerli kılmaktadır.

HADDOCK tabanlı yapısal kenetlenme ve çok boyutlu arayüz analizi araçlarını bir araya getirerek FC tam uzunluklu proteini ile S157 izoformunun aptamer bağlanma profillerini sistematik biçimde karşılaştırmış ve her iki protein yapısına özgü etkileşim örüntülerini nicel düzeyde tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular; etkileşim mesafesi, yakın temas yoğunluğu, arayüz rezidü kompozisyonu ve bağlanma bölgesi benzerliği gibi tamamlayıcı metriklerin birlikte yorumlanmasının, salt docking skoru veya tek bir metriğe dayalı değerlendirmelerin ötesinde daha kapsamlı ve güvenilir bir karşılaştırma imkânı sunduğunu göstermektedir. Çalışmanın en önemli çıktısı, S157 fragmentinin aptamer bağlanması açısından tam uzunluklu proteine işlevsel bir alternatif oluşturabileceğini ve özellikle C5 aptameriyle yüksek kaliteli bir kompleks kurabildiğini ortaya koymaktır. Bu sonuçlar, ileride gerçekleştirilecek yüzey plazmon rezonansı (SPR), izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) ve elektroforetik mobilite kayması (EMSA) gibi deneysel doğrulama çalışmaları için öncelikli hedef çiftlerin — başta S157-C5, S157-C3 ve S157-C4 olmak üzere — belirlenmesinde doğrudan yol gösterici nitelik taşımaktadır.

## 6. TARTIŞMA

Günümüzde hastalıkların tanı ve tedavi yöntemlerinde yaşanan ilerlemeler, daha erişilebilir, hızlı ve düşük maliyetli tanı yaklaşımlarına olan ihtiyacı artırmıştır. Bu ihtiyaca yanıt olarak geliştirilen biyosensörler, biyolojik örneklerdeki spesifik analit düzeylerindeki değişiklikleri algılayarak, bu biyokimyasal sinyalleri bir transdüser aracılığıyla ölçülebilir elektriksel sinyallerine dönüştüren cihazlar olarak tanımlanmaktadır (Kalpana vd., 2019). Yüksek özgüllük ve hassasiyet, kısa yanıt süresi ve taşınabilirlik gibi avantajları sayesinde biyosensörler hem klinik tanı süreçlerinde hem de tedavi uygulamalarında giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada, birçok hastalık ve metabolik durumda insan serumunda seviyeleri değişen kemerin proteinine özgü aptamer geliştirilmiştir. Bu sayede de kemerine özgü aptamer tabanlı biyosensör çalışmalarının ana adımı tamamlanmıştır.

Bu çalışmada aptamer geliştirme sürecinde hedef molekül olarak seçilen kemerin proteini, biyolojik sistemlerde hem aktif hem de inaktif formda bulunabilen çok sayıda izoforma sahiptir. Bu izoformların ekspresyonu hem doku spesifikliği hem de bağlandıkları reseptör tipine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Ernst ve Sinal, 2010). Literatürde, bu izoformlar arasında biyolojik aktivitesi en yüksek olan ve dolaşım sisteminde, özellikle serum sıvısında, en fazla bulunan formun kemerin-S157 olduğu bildirilmiştir. S157 izoformu, CMKLR1 reseptörü üzerinde yüksek afinite ile etkili olarak sinyal iletimini başlatabilen aktif bir izoformdur. Bu nedenle, çalışmanın özgünlüğünü ve biyosensörün etkinliğini artırmak adına, kemerin-S157 izoformu rekombinant olarak üretilmiş ve analizlerde hedef analit olarak tercih edilmiştir. S157 izoformu seçimi bu çalışmanın özgün yönlerinden birini oluşturmaktadır. Literatürde kemerin proteinine yönelik çeşitli tespit yöntemleri raporlanmış olmakla birlikte, bu yaklaşımlar genellikle ELISA tabanlı kitler veya antikor temelli analizlere dayanmaktadır (Chang vd., 2016; El-Mesallamy vd., 2011; Garcés vd., 2013; González-Ponce vd., 2021). Antikor tabanlı testler, pahalılık ve uzun süren üretim süreçleri sebebiyle bir dezavantaj yaratmaktadır. Ancak, bugüne kadar kemerin proteinine özgü bir aptamer tanımlanmamıştır. Ayrıca kemerine özgü aptamer geliştirilmesi, kemerinin sahip olduğu izoformlar göz önünde bulundurularak geliştirilmelidir. Bu çalışma, literatürdeki boşluğu doldurmak amacıyla, kemerin-S157 izoformunu hedef alan bir aptamerin SELEX yöntemi ile ilk kez seçilmesini kapsamaktadır. Seçilen aptamer, geleneksel test yöntemlerinin yaygın dezavantajlarına yüksek özgüllük ve düşük maliyet avantajları sunan bir aptasensör platformunun geliştirilmesi için zemin hazırlanmıştır.

Mevcut çalışmalarda, kemerin düzeyleri genel olarak ELISA ile tespit edilmiştir ve çoğunlukla obezitedeki artışla ilişkilendirilmiştir. Obezite ile ilişkili kemerin düzeyleri yaklaşık olarak 160 ng (Bauer vd., 2012), 249 ng (Garcés vd., 2013) ve 300 ng (El-Mesallamy vd., 2011) aralığındadır. Fakat farklı metabolik durumlarda kemerin düzeyleri 0.485 ng/mL ile 520 ng/ mL aralığında değişmektedir. Bu sebeple büyük bir aralığın tespit edebilecek bir ölçüm tekniği olması oldukça önemlidir. Ancak, bu çalışmalarda kullanılan kemerinin hangi izoformunun ölçüldüğü net olarak belirtilmemiştir. Bu durum, elde edilen bulguların spesifik izoformlar hakkında yorum yapılmasını güçleştirmektedir. Kemerinin birden fazla aktif formu vardır ve çoğu doku spesifik özellik gösterir. Bu izoformlar arasında, kemerin-158, kemerin-157, kemerin-156 izoformları yaygın bulunanlar arasındadır. Ayrıca aktivitesi henüz bilinmeyen kemerin-152 formu da bulunmaktadır (Ernst ve Sinal, 2010). Bazıları ise sadece hastalık durumlarında veya metabolizmadaki farklılıklardan kaynaklanır. Bu yüzden kemerinin hangi formunun tespit edileceği de oldukça önemlidir ve gerekli çalışmalar yapılmalıdır. Kemerin proteininin izoformları, çoğu durum için bir biyobelirteç adayı olarak yüksek kapasiteye sahiptir. Ayrıca aktivitesi bilinmeyen kemerin izoformlarının hem aktivitesinin belirlenmesi hem de fizyolojik rollerinin anlaşılması bakımından izoforma özgü aptamer geliştirilmesi de ayrı bir çalışma konusu olarak düşünülebilmektedir. Fakat kemerinin aktif izoformları arasındaki amino asit farklılıkları oldukça azdır. Her bir izoform, kemerinin C terminal ucundan uzaklaştırılan amino asit ile oluşur. Kemerin'in aktif izoformları (örneğin kemerin-156, kemerin-157 ve kemerin-158), ardışık proteolitik işlemler sonucunda tek bir amino asit kalıntısının eksikliği ile karakterize edilen çeşitli formlar olarak mevcuttur. Bu sebeple tek bir aktif forma özgü geliştirilen aptamerin diğer tüm aktif formları da tespit edebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada, aptamer kütüphanesiyle muamele etme aşamalarında hedef proteini sabitlemek amacıyla kullanılan manyetik boncukların, hedef molekül ile etkileşmesi amacıyla kemerin proteini histidin etiketli olarak oluşturulmuştur. Boncuk çapının 1 µm olması, 16 kDa büyüklüğündeki kemerin için oldukça uygundur. Yapılan ölçüm ve analizlerde kemerinin %100'e yakın oranda boncuğa bağlı kaldığı gösterilmiştir. Bağlanmanın kanıtlanması amacıyla yapılan FT-IR analizinde, boncuğa bağlı kemerin absorbanısı ölçülmüştür. Bunun sonunca proteinle kaplanan boncukların verdiği pikler, yalnızca proteine özgü olan amid bantlarının pikleridir. Yapılan ek çalışmalarda daha büyük kDa'a sahip proteinlerin boncuğa bağlanma düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir. Sadece boyut bakımından değil proteinin sahip olduğu üçüncül ve dördüncül katlanmaların da boncuk ile etkileşimi değiştirdiği

düşünülmektedir. Maximum şekilde protein ile kaplanan boncuklar elde edildikten sonra başlanan SELEX turlarında, her bir turda proteine afinite gösteren aptamer dizileri agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. SELEX turları boyunca aptamer havuzunun ilk turlarda azaldığı ancak proteine özgü aptamerlerin her bir turda seçilmesiyle daha sonra az da olsa tekrar artış gösterdiği gözlenmiştir. Aptamer seçim süreci, proteinin miktarının düşürülebildiği son kademeye kadar devam etmiştir. Bu sayede en düşük protein konsantrasyonunda dahi proteine afinite gösteren diziler elde edilmiştir. SELEX turlarının sonlandırılacağı aşama araştırmanın amaç ve gerekliliğine göre değişmektedir. Herhangi bir hedefe özgü aptamerin zenginleştirilmesi gerektiğinde, genel olarak kütüphanedeki miktarın azalış gösterip ardından tekrar artmasını görmek yeterlidir. Fakat bu çalışmanın sonucu biyosensör geliştirme ile tamamlanacağı için, oldukça hassas ve yüksek afiniteli aptamerlerin bulunması kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada özgünlük ve yüksek duyarlılık ilkeleri doğrultusunda, hedef molekül olan kemerin-S157 izoformunu düşük konsantrasyonlarda dahi etkin bir şekilde tanıyabilen aptamerlerin seçilmesi amaçlanmıştır. Bu hedefe ulaşmak için SELEX yöntemi, protein konsantrasyonunun kademeli olarak azaltıldığı çok sayıda döngü şeklinde uygulanmıştır. Her SELEX döngüsünde, bağlanma spesifitesi yüksek olabilecek aptamer dizilerinin zenginleştirilmesi sağlanırken, aynı zamanda kemerinin mümkün olan en düşük konsantrasyon düzeylerinde bile seçici olarak tanınmasını sağlayacak dizilerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Böylece geliştirilen aptamerlerin hem özgünlüğü hem de düşük düzeydeki hedef protein varlığını saptayabilme kapasitesi optimize edilmiştir.

Çalışmada kullanılan DNA kütüphanesi, her biri tek zincirli ve yaklaşık 80 baz çifti uzunluğunda oligonükleotid dizilerinden oluşmaktadır. Ancak bu dizilerin kısa yapıda ve düşük miktarda elde edilmesi, doğrudan görselleştirilmelerini güçleştirmektedir (Tombelli vd., 2005). Bu nedenle her SELEX turu sonrasında, hedef protein olan Kemerin-S157 izoformuna belirli düzeyde afinite gösterdiği varsayılan ssDNA havuzu, PZR ile çoğaltılmıştır. Böylece hem dizi zenginleştirilmesi sağlanmış hem de görselleştirme için yeterli miktarda DNA ürünü elde edilmiştir (Ellington ve Szostak, 1990).

PZR işleminden sonra elde edilen çift zincirli DNA ürünlerinin boyutlarının doğrulanması amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulanmış ve her SELEX turunda yaklaşık 80 bp uzunluğunda bantlar gözlemlenerek istenilen ürünlerin başarıyla çoğaltıldığı doğrulanmıştır. Ancak çoğaltılması hedeflenen dizilerin oldukça kısa olması, klasik PZR protokolleri ile yeterli verim alınmasını engelleyebilmekte ve spesifik olmayan ürün oluşumuna yol açabilmektedir. Bu nedenle, amplifikasyon sürecinde yüksek verim ve

özgüllük sağlanması için PZR koşulları optimize edilmiştir. Denatürasyon, annealing ve uzama sıcaklıkları ile süreleri dikkatle optimize edilmiştir. Dizinin kısa olması sebebiyle PZR döngü sayısı optimum olarak 15 döngü ile sınırlandırılmıştır. Bağlanma sıcaklığı, yan ürün oluşumunun engellenmesi amacıyla 60 °C’de gerçekleştirilmiştir.

SELEX sürecinin tamamlanmasının ardından, son turdan elde edilen aptamerlerin kemerin-S157 izoformuna en yüksek bağlanma afinitesi gösteren diziler olduğu varsayılmıştır. Bu son havuz, özgüllük ve afinite açısından zenginleşmiş aptamer dizilerini içerdiğinden, hedef molekül ile etkileşim kurabilecek en uygun ve afinitesi en yüksek yapılar bu havuzda yer almaktadır. Bu nedenle, dizilerin daha detaylı karakterize edilebilmesi için klonlama ve dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aptamer dizilerinin kısa olması (~80 bp), dizileme yöntemi olarak Sanger sekanslama tekniğini ön plana çıkarmıştır. Bu yöntem, kısa fragmanların yüksek doğrulukla dizilenmesini sağladığından dolayı özellikle aptamer karakterizasyonunda yaygın olarak tercih edilmektedir (Sanger vd., 1977; Shendure vd., 2008). Sekanslama sonucu 6 farklı koloni tespit edilmiş, fakat bunlardan ikisinin nükleotid dizilerinin tamamen aynı olduğu belirlenmiştir. Böylece toplamda 5 farklı aptamer dizisi belirlenmiş ve bunlar aday aptamer olarak değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 5.4).

Belirlenen dizilerin özgüllüğü ve yapısal kararlılığı, hedef moleküle olan bağlanma düzeyini doğrudan etkileyen faktörlerdendir. Bu nedenle K<sub>d</sub> hesaplamalarına geçilmeden önce, aptamerlerin ikincil yapılarına ait termodinamik özelliklerinin analiz edilmesi gerekli görülmüştür. Bu amaçla, UNAFold veritabanı kullanılarak dizilerin tahmin edilen ikincil yapıları, serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ), erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>), loop ve hairpin yapılarına ait  $\Delta G$  değerleri hesaplanmıştır (Markham ve Zuker, 2008).

$\Delta G$  değeri, molekülün belirli bir yapıya katlanması sırasında sistemin toplam serbest enerji değişimini ifade eder. Daha düşük (daha negatif)  $\Delta G$  değeri, aptamerin kendi üzerine katlanarak daha stabil ve kararlı bir ikincil yapı oluşturduğunu gösterir (SantaLucia, 1998). Stabil yapı, aptamerin hedefe bağlandığında konformasyonunu koruması açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle aptamerlerde genel  $\Delta G$  değerinin düşük (örneğin  $\leq -8$  kcal/mol), T<sub>m</sub> değerinin ise yüksek ( $\geq 60^\circ\text{C}$ ) olması, molekülün biyolojik ortamlarda denatüre olmadan görevini sürdürebilmesi açısından tercih edilen özelliklerdendir. Bu değerler, biyosensör aşaması için oldukça önemlidir. Biyolojik bir sıvıdan tespit yapılacağı için stabil yapıdaki aptamerler tercih edilmelidir.

$T_m$  değeri, molekülün ikincil yapısının %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık olarak tanımlanır. Yüksek  $T_m$  değeri, aptamerin yüksek sıcaklıklarda dahi yapısal bütünlüğünü koruyabildiğini ve bu sayede plazma, serum gibi fizyolojik koşullarda daha etkin çalışabileceğini gösterir (Bompiani vd., 2012). Ayrıca, dizilerin kendi kendine hibritleşme eğilimleri de değerlendirilmiştir.  $T_m$  değerinin yüksek ve  $\Delta G$  değerinin düşük olması, aptamerin kendisiyle eşleşme eğiliminde olduğunu, bu durumda hedefe bağlanabilirliğinin azalabileceğini gösterebilir. Bu nedenle sadece düşük  $\Delta G$  ve yüksek  $T_m$  yeterli olmayıp, aynı zamanda loop yapısının uygun enerjide olması, yani hedefe bağlanabilecek şekilde açık ve esnek kalması önemlidir (Irmisch vd., 2020).

Yapılan bu analizler sonucunda, Apt-C3, Apt-C4 ve Apt-C5 numaralı diziler, hem genel  $\Delta G$  değerleri hem de  $T_m$  değerleri açısından termodinamik olarak diğer dizilere göre daha stabil bulunmuştur. Bu üç aday dizinin hedefe bağlanma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, bir sonraki adım olarak dissosiyasyon sabiti ( $K_d$ ) hesaplamalarına geçilmiştir.  $K_d$  değeri, bir aptamerin hedefine olan bağlanma kuvvetini kantitatif olarak gösterdiğinden, seçilen dizilerin hedefe yönelik etkinliğini belirlemede oldukça önemlidir.

Çalışmada, SELEX sürecinin tamamlanmasının ardından elde edilen aday aptamer dizilerinin hedef protein olan kemerin-S157'ye olan bağlanma afiniteleri, floresan etiketli (FAM) aptamerler kullanılarak belirlenmiştir. Bağlanma analizlerinin sonucunda elde edilen izoterm verileri, farklı kinetik modellerle değerlendirilmiş ve yüzeyde birden fazla bağlanma bölgesi olabileceği göz önünde bulundurularak, Freundlich izoterm modeli uygun bulunmuştur. Freundlich modeli, özellikle çoklu bağlanma bölgelerine sahip sistemlerde, adsorpsiyon süreçlerinin açıklanmasında sıklıkla tercih edilmektedir (Liu vd., 2007). Aptamer-hedef etkileşimlerinin bu modele uyması, dizilerin olası farklı konformasyonlarda ve birden çok bölgede bağlanma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen  $K_d$  değerleri, aptamerlerin hedef molekülle olan afinite düzeylerini ortaya koymuştur.  $K_d$ , bağlayıcı molekülün hedefe olan bağlanma gücünü yansıtan temel bir parametredir ve düşük  $K_d$  değeri, molekülün düşük konsantrasyonlarda dahi hedefe sıkı bir şekilde bağlanabildiğini ifade eder (Ellington ve Szostak, 1990). Bu durumda, aptamerlerin tanıma ve bağlanma kabiliyetleri açısından düşük  $K_d$  değerleri kritik öneme sahiptir. Literatürde bildirilen birçok başarılı aptamer çalışmasında  $K_d$  değerlerinin nanomolar (nM) düzeyinde olduğu ve bu değerlerin tanı sistemlerinde yüksek hassasiyet için yeterli olduğu belirtilmektedir (Song vd., 2008; Stoltenburg vd., 2007).

Yaptığımız çalışmada Apt-C3'ün Kd değeri 124.1 nM, Apt-C4'ün Kd değeri 224.7 nM ve Apt-C5'in Kd değeri 288.3 nM olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada değerlendirilen üç farklı diziden Apt-C4, en düşük Kd değerine sahip olmamasına rağmen yapısal olarak değerlendirildiğinde daha uygun görülmüştür. Yalnızca bağlanma afinitesi açısından değil, aynı zamanda yapısal kararlılığı açısından da daha uygundur. Apt-C4 dizisi, diğer dizilere kıyasla daha uygun bir  $\Delta G$  değeri (daha düşük, negatif) ve daha yüksek Tm değerine sahiptir.  $\Delta G$  değerinin negatif ve büyük olması, aptamerin ikincil yapısının termodinamik olarak stabil olduğunu gösterirken; yüksek Tm değeri, bu yapının biyolojik ortam koşullarında da kararlılığını sürdürebileceğine işaret etmektedir (Zuker, 2003). Ayrıca loop bölgelerinde gözlemlenen  $\Delta G$  değerlerinin de düşük olması, aptamerin hedefe spesifik bağlanma yapısını sürdürebilmesine olanak tanımaktadır.

Sonuç olarak, Apt-C4 dizisi, sadece düşük Kd değerine sahip olmasıyla değil, aynı zamanda yapısal olarak termodinamik açıdan daha stabil bir konformasyon sergilemesiyle de biyosensör uygulamaları için uygun bir aday olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, literatürde yüksek afiniteli ve stabil aptamerlerin seçilmesine yönelik yapılan çalışmalarda bildirilen genel bilgilerle de örtüşmektedir (Chen vd., 2016). Dolayısıyla, geliştirilen biyosensör platformunda bu dizinin tercih edilmesi, sistemin hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü artıracığı öngörülmektedir.

Aptamerlerin deneysel olarak belirlenen bağlanma afinitelerinin (Kd) yanı sıra bu etkileşimlerin moleküler mekanizmalarını anlamak amacıyla gerçekleştirilen HADDOCK tabanlı yapısal modellemeler ve çok boyutlu arayüz analizleri, bağlanma kalitesinin sadece sayısal bir kuvvet değil, aynı zamanda geometrik bir uyum meselesi olduğunu ortaya koymuştur. Temel Bileşenler Analizi (PCA) sonuçları, tam uzunluklu protein (FC) ile S157 izoformunun aptamerlere bağlanma profillerinin istatistiksel olarak tamamen farklı uzaylarda konumlandığını gösterirken; S157 izoformunun tüm aptamerlerde FC serisine kıyasla daha düşük çift ortalama etkileşim mesafesi sergilemesi, bu küçük fragmentin aptamerler için yapısal düzeyde daha erişilebilir ve kompakt bir yüzey sunduğunu kanıtlamaktadır. Özellikle Apt-C5 adayının, çalışmadaki en yüksek Kd değerine (288.3 nM) sahip olmasına rağmen HADDOCK analizlerinde en düşük etkileşim mesafesini (3.513 Å) ve en yüksek yakın temas sayısını (n=21) sergilemesi, bağlanma potansiyelinin sadece termodinamik dengeyle değil, anahtar-kilit uyumunu yansıtan geometrik kaliteyle de değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Amino asit rezidü haritasındaki Arjinin (ARG) ve Glutamik Asit (GLU) baskınlığı ise etkileşimin temelinde nükleik asit-protein kompleksleri için tipik olan elektrostatik kuvvetlerin ve hidrojen bağlarının yattığını doğrulamakta; sonuç olarak bu bütünsel karakterizasyon çerçevesi, seçilen adayların klinik örneklerde kemerin tespiti için geliştirilecek biyosensörlerde yüksek duyarlılık ve özgüllükle kullanılabileceğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

## 7. ÖNERİLER

Seçilen aptamer dizileri, altın yüzeyli elektrotlar üzerine immobilize edilerek elektrokimyasal biyosensör platformunun prototipi geliştirilmelidir. Aptamerin yüksek özgüllüğünü kanıtlamak amacıyla, kemerinin inaktif öncül formu olan prokemerin ve diğer aktif izoformlar (kemerin-156, kemerin-158) kullanılarak Counter-SELEX benzeri yaklaşımlarla aptamerlerin seçiciliği kantitatif olarak doğrulanabilir. Aktif izoformlar arasındaki amino asit dizilimi çok farklı olmadığından tek bir aptamer dizisinin tüm aktif formlara karşı yüksek afinite gösterip göstermediği de test edilmelidir. Aptamerin stabilitesi ve afinitesi, fizyolojik olarak ilgili sıvılarda (örneğin, tam kan, serum veya plazma) test edilebilir. Bu, biyosensörün klinik uygulamadaki potansiyelini belirlemek için kritik öneme sahiptir.

Kemerin-S157 dışındaki aktif izoformlar olan kemerin-156, kemerin-158 ve biyolojik rolü tam anlaşılammış kemerin-152 formlarına özgü aptamerler geliştirmek amacıyla ayrı ayrı SELEX çalışmaları yapılabilir. Bu, kemerinin farklı hastalıklardaki (obezite, kanser, inflamasyon) izoform-spesifik rolünün anlaşılmasına olanak tanıyacaktır.

Kemerin-S157, özellikle obezite ve diyabet gibi durumlarda seviyeleri artan ve metabolik süreçlerde rol oynayan bir faktördür. Kemerin-S157'ye yüksek afinite gösteren aptamerler ve kenetleme analizleri sonucu da değerlendirilerek, ileride hedefli ilaç dağıtım sistemlerinde veya kemerin aktivitesini inaktive eden (antagonist) terapötik bir ajan olarak aptamerlerin kullanımı sağlanabilir. Seçilen aptamerler ile geliştirilecek olan sensör, obezite, Tip 2 Diyabet veya romatoid artrit gibi kemerin seviyelerinin arttığı bilinen hastalıklardan alınan klinik serum örneklerinde test edilmeli ve tespit edilen kemerin-S157 düzeylerinin hastalığın evresi veya şiddeti ile korelasyonu incelenmelidir.

## KAYNAKÇA

- Abbaspour, A., Norouz-Sarvestani, F., Noori, A., & Soltani, N. (2015). Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 149–155.
- Akin, S., Akin, S., Gedik, E., Haznedaroglu, E., Dogan, A. L., & Altundag, M. K. (2017). Meme kanserinde serum chemerin düzeyi. *UHOD - Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 27(2), 127–132.
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discovery*, 11(4), 858–873.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes\* (2026). 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2026. *Diabetes care*, 49(Supplement\_1), S27–S49.
- Ashtary-Larky, D., Lamuchi-Deli, N., Kashkooli, S., Mombaini, D., Alipour, M., Khodadadi, F., ... Wong, A. (2023). The effects of exercise training on serum concentrations of chemerin in individuals with overweight and obesity: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of 43 clinical trials. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1012–1027.
- Barnea, G., Strapps, W., Herrada, G., Berman, Y., Ong, J., Kloss, B., ... Lee, K. J. (2007). *The genetic design of signaling cascades to record receptor activation*.
- Arshavsky-Graham S, Heuer C, Jiang X, Segal E. Aptasensors versus immunosensors – Which will prevail? *Eng Life Sci.* 2022; 22: 319–333.
- Bauer, S., Bala, M., Kopp, A., Eisinger, K., Schmid, A., Schneider, S., ... Buechler, C. (2012). Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(11), 1213–1220.
- Belanche, A., Weisbjerg, M. R., Allison, G. G., Newbold, C. J., & Moorby, J. M. (2013). Estimation of feed crude protein concentration and rumen degradability by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7867–7880.
- Bondue, A., Wittamer, V., & Parmentier, M. (2011). Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(5-6), 331-338.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., ... Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 148(10), 4687–4694.

- Bozaoglu, K., Curran, J. E., Stocker, C. J., Zaibi, M. S., Segal, D., Konstantopoulos, N., ... Jowett, J. B. M. (2010). Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), 2476–2485.
- Bruno, J. G., & Kiel, J. L. (1999). In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. In *Biosensors & Bioelectronics*.
- Buechler, C., Feder, S., Haberl, E. M., & Aslanidis, C. (2019). Chemerin isoforms and activity in obesity. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., & Benovic, J. L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7805–7817.
- Cash, J. L., Christian, A. R., & Greaves, D. R. (2010). Chemerin Peptides Promote Phagocytosis in a ChemR23- and Syk-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 184(9), 5315–5324.
- Cash, J. L., Hart, R., Russ, A., Dixon, J. P. C., Colledge, W. H., Doran, J., ... Greaves, D. R. (2008). Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *Journal of Experimental Medicine*, 205(4), 767–775.
- Cash, J. L., Norling, L. V., & Perretti, M. (2014). Resolution of inflammation: Targeting GPCRs that interact with lipids and peptides. *Drug Discovery Today*. 1186–1192.
- Cesarini, V., Scopa, C., Silvestris, D. A., Scafidi, A., Petrera, V., Del Baldo, G., & Gallo, A. (2020, September 1). Aptamer-based in vivo therapeutic targeting of glioblastoma. *Molecules*.
- Chakaroun, R., Raschpichler, M., Klötting, N., Oberbach, A., Flehmig, G., Kern, M., ... Blüher, M. (2012). Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(5), 706–714.
- Chang, S. S., Eisenberg, D., Zhao, L., Adams, C., Leib, R., Morser, J., & Leung, L. (2016). Chemerin activation in human obesity. *Obesity*, 24(7), 1522–1529.
- Chen, L., He, W., Jiang, H., Wu, L., Xiong, W., Li, B., ... Qian, Y. (2019). In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 149–159.
- Choi, S. Il, Lee, Y. S., Lee, Y. M., Kim, H. J., Kim, W. J., Jung, S., ... Kim, I. H. (2023). Complexation of drug and hapten-conjugated aptamer with universal hapten antibody for pancreatic cancer treatment. *Journal of Controlled Release*, 360, 940–952.

- Chung, J., Kang, J. S., Jurng, J. S., Jung, J. H., & Kim, B. C. (2015). Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosensors and Bioelectronics*, *67*, 303–308.
- Daniels, D. A., Chen, H., Hicke, B. J., Swiderek, K. M., & Gold, L. (2003). A *tenascin-C* aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment.
- de Melo, M. I. A., da Silva Cunha, P., de Miranda, M. C., Barbosa, J. L., Faria, J. A. Q. A., Rodrigues, M. A., ... Gomes, D. A. (2021). Selection of DNA Aptamers for Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(11), 3704–3718.
- Del Prete, A., Sozio, F., Schioppa, T., Ponzetta, A., Vermi, W., Calza, S., ... Sozzani, S. (2019). The Atypical Receptor CCRL2 Is Essential for Lung Cancer Immune Surveillance. *Cancer Immunology Research*, *7*(11), 1775–1788.
- Dembowski, S. K., & Bowser, M. T. (2018). Microfluidic methods for aptamer selection and characterization. *Analyst*. 21–32.
- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(7), 1731–1737.
- Dong, L., Tan, Q., Ye, W., Liu, D., Chen, H., Hu, H., ... Wu, W. (2015). Screening and Identifying a Novel ssDNA Aptamer against Alpha-fetoprotein Using CE-SELEX. *Scientific Reports*, *5*(1).
- Dong, L., Zhou, H., Zhao, M., Gao, X., Liu, Y., Liu, D., ... Wu, W. (2018). Phosphorothioate-Modified AP613-1 Specifically Targets GPC3 when Used for Hepatocellular Carcinoma Cell Imaging. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, *13*, 376–386.
- Dua, P., Kang, S., Shin, H. S., Kim, S., & Lee, D. K. (2018). Cell-SELEX-Based Identification of a Human and Mouse Cross-Reactive Endothelial Cell-Internalizing Aptamer. *Nucleic Acid Therapeutics*, *28*(4), 262–271.
- Dupont, D. M., Larsen, N., Jensen, J. K., Andreasen, P. A., & Kjems, J. (2015). Characterisation of aptamer-target interactions by branched selection and high-throughput sequencing of SELEX pools. *Nucleic Acids Research*, *43*(21).
- Duran<sup>1</sup>, M., Karabulut<sup>2</sup>, A., & Şahin<sup>1</sup>, T. (n.d.). *The association of serum chemerin levels with retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus.*
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.*

- El-Mesallamy, H. O., El-Derany, M. O., & Hamdy, N. M. (2011). Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabetic Medicine*, 28(10), 1194–1200.
- Ernst, M. C., & Sinal, C. J. (2010). Chemerin: At the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 660–667.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581-611.
- Galon, J., Angell, H. K., Bedognetti, D., & Marincola, F. M. (2013). The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity*. 11–26.
- Garces, M. F., Sanchez, E., Ruíz-Parra, A. I., Rubio-Romero, J. A., Angel-Müller, E., Suarez, M. A., ... Caminos, J. E. (2013). Serum chemerin levels during normal human pregnancy. *Peptides*, 42, 138–143.
- Ghallab, N. A., & Shaker, O. G. (2017). Serum and salivary levels of chemerin and MMP-9 in oral squamous cell carcinoma and oral premalignant lesions. *Clinical Oral Investigations*, 21(3), 937–947.
- Gibson, T. L., & Cohen, P. (1999). Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 9(4), 241–253.
- Gonzalez-Ponce, F., Gamez-Nava, J. I., Perez-Guerrero, E. E., Saldaña-Cruz, A. M., Vazquez-Villegas, M. L., Ponce-Guarneros, J. M., ... Gonzalez-Lopez, L. (2021). Serum chemerin levels: A potential biomarker of joint inflammation in women with rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, 16(9 September).
- Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. A., Zabel, B. A., Butcher, E. C., Parlee, S. D., ... Sinal, C. J. (2007). Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 28175–28188.
- Goralski, K. B., & Sinal, C. J. (2009). Chapter 14 Elucidation of Chemerin and Chemokine-Like Receptor-1 Function in Adipocytes by Adenoviral-Mediated shRNA Knockdown of Gene Expression. *Methods in Enzymology*. 289–312.
- Gubala, V., Harris, L. F., Ricco, A. J., Tan, M. X., & Williams, D. E. (2012). Point of care diagnostics: Status and future. *Analytical Chemistry*, 84(2), 487–515.

- Guenther, U. P., Yandek, L. E., Niland, C. N., Campbell, F. E., Anderson, D., Anderson, V. E., ... Jankowsky, E. (2013). Hidden specificity in an apparently nonspecific RNA-binding protein. *Nature*, *502*(7471), 385–388.
- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., & Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, *725*–731.
- Han, K., Liang, Z., & Zhou, N. (2010). Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors*, *4541*–4557.
- Hands, J. R., Clemens, G., Stables, R., Ashton, K., Brodbelt, A., Davis, C., ... Baker, M. J. (2016). Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Neuro-Oncology*, *127*(3), 463–472.
- Hanthazi, A., Jespers, P., Vegh, G., Dubois, C., Hubesch, G., Springael, J. Y., ... Mc Entee, K. (2020). Chemerin Added to Endothelin-1 Promotes Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Frontiers in Physiology*, *11*.
- Herenius, M. M. J., Oliveira, A. S. F., Wijbrandts, C. A., Gerlag, D. M., Tak, P. P., & Lebre, M. C. (2013). Anti-TNF Therapy Reduces Serum Levels of Chemerin in Rheumatoid Arthritis: A New Mechanism by Which Anti-TNF Might Reduce Inflammation. *PLoS ONE*, *8*(2).
- Ho, K. J., Spite, M., Owens, C. D., Lancero, H., Kroemer, A. H. K., Pande, R., ... Conte, M. S. (2010). Aspirin-triggered lipoxin and resolvin E1 modulate vascular smooth muscle phenotype and correlate with peripheral atherosclerosis. *American Journal of Pathology*, *177*(4), 2116–2123.
- Höpfinger, A., Behrendt, M., Schmid, A., Karrasch, T., Schäffler, A., & Berghoff, M. (2024). A Cross-Sectional Study: Systematic Quantification of Chemerin in Human Cerebrospinal Fluid. *Biomedicines*, *12*(11), 2508.
- Huang, H., Tong, T. T., Yau, L. F., Wang, J. R., Lai, M. H., Zhang, C. R., ... Jiang, Z. H. (2020). Chemerin isoform analysis in human biofluids using an LC/MRM-MS-based targeted proteomics approach with stable isotope-labeled standard. *Analytica Chimica Acta*, *1139*, 79–87.
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal*, *2944*–2971.
- Irvine, D., Tuerk, C., & Gold, L. (1991). SELEXION Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment with Integrated Optimization by Non-linear Analysis. In *J. Mol. Biol.*

- Jason W. Griffith, Caroline L. Sokol, Andrew D. Luster. 2014. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review Immunology*. 32:659-702.
- Jayasena S. D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry*, 45(9), 1628–1650.
- Jin, C. H., Yi, K. W., Ha, Y. R., Shin, J. H., Park, H. T., Kim, T., & Hur, J. Y. (2015). Chemerin Expression in the Peritoneal Fluid, Serum, and Ovarian Endometrioma of Women with Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(4), 379–386.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589 (2021).
- Kacherovsky, N., Yang, L. F., Dang, H. V., Cheng, E. L., Cardle, I. I., Walls, A. C., ... Pun, S. H. (2021). Discovery and Characterization of Spike N-Terminal Domain-Binding Aptamers for Rapid SARS-CoV-2 Detection. *Angewandte Chemie - International Edition*, 60(39), 21211–21215.
- Kalpna, S., Priyadarshini, S. R., Maria Leena, M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science and Technology*. 145–157. Elsevier Ltd.
- Kaur, J., Adya, R., Tan, B. K., Chen, J., & Randeva, H. S. (2010). Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(4), 1762–1768.
- Kaur, M., Singh, S., & Kaur, A. (2024). Structural changes in amide I and amide II regions of PCOS women analyzed by ATR-FTIR spectroscopy. *Heliyon*, 10(13).
- Kennedy, A. J., & Davenport, A. P. (2018). International union of basic and clinical pharmacology CIII: Chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) nomenclature, pharmacology, and function. *Pharmacological Reviews*, 70(1), 174–196.
- Kennedy, A. J., Yang, P., Read, C., Kuc, R. E., Yang, L., Taylor, E. J. A., ... Davenport, A. P. (2016). Chemerin elicits potent constrictor actions via chemokine-like receptor 1 (CMKLR1), not G-
- Kiczmer, P., Seńkowska, A. P., Kula, A., Dawidowicz, M., Strzelczyk, J. K., Zajdel, E. N., ... Świątochowska, E. (2020). Assessment of CMKLR1 level in colorectal cancer and its correlation with angiogenic markers. *Experimental and Molecular Pathology*, 113.
- Kulig, P., Kantyka, T., Zabel, B. A., Banaś, M., Chyra, A., Stefańska, A., ... Cichy, J. (2011). Regulation of Chemerin Chemoattractant and Antibacterial Activity by Human Cysteine Cathepsins. *The Journal of Immunology*, 187(3), 1403–1410.

- Kumar, H., Dhalaria, R., Guleria, S. et al. Immunosensors in food, health, environment, and agriculture: a review. *Environ Chem Lett* 22, 2573–2605 (2024).
- Laing, K. J., & Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5),
- Lavis, P., Bondue, B., & Cardozo, A. K. (2024). The Dual Role of Chemerin in Lung Diseases. *Cells*, Vol. 13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Lehrke, M., Becker, A., Greif, M., Stark, R., Laubender, R. P., von Ziegler, F., ... & Broedl, U. C. (2009). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and systemic inflammation in humans. *Atherosclerosis*, 206(2), 483-485.
- Li, J. J., Yin, H. K., Guan, D. X., Zhao, J. S., Feng, Y. X., Deng, Y. Z., ... Xie, D. (2018). Chemerin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis. *British Journal of Cancer*, 118(10), 1337–1348.
- Li, L., Huang, C., Zhang, X., Wang, J., Ma, P., Liu, Y., ... Zhang, J. V. (2014). Chemerin-derived peptide C-20 suppressed gonadal steroidogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 71(3), 265–277.
- Li, X., Li, C., Yang, J., Lin, M., Zhou, X., Su, Z., ... Chen, X. (2025). Associations of the levels of adipokines and cytokines in individual follicles with in vitro fertilization outcomes in women with different ovarian reserves. *Journal of Ovarian Research*, 18(1), 11.
- Lin, N., Wu, L., Xu, X., Wu, Q., Wang, Y., Shen, H., ... Yang, C. (2021). Aptamer Generated by Cell-SELEX for Specific Targeting of Human Glioma Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9306–9315. American Chemical Society.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., & Prohaska, E. (2002). An aptamer-based quartz crystal microbalance biosensor for the detection of human IgE. *Analytical Chemistry*, 74(17), 4488-4495.
- Liu, L., Zhang, J., Lu, K., Zhang, Y., Xu, X., Deng, J., ... Wang, X. (2024). ChemR23 signaling ameliorates brain injury via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuronal pyroptosis in ischemic stroke. *Journal of Translational Medicine*, 22(1).
- Liu, Y., Liu, A., & Ye, R. D. (2024). Structural Basis for Chemerin Recognition and Signaling Through Its Receptors. *Biomedicines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Ludeman, J. P., & Stone, M. J. (2013). *The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition LINKED ARTICLES Tyrosine sulfation.*

- Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y., & Coffey, D. S. (2002). Identification and Characterization of Nuclease-stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-specific Membrane Antigen 1. In *CANCER RESEARCH*.
- Lyu, C., Khan, I. M., & Wang, Z. (2021). Capture-SELEX for aptamer selection: A short review. *Talanta*. Elsevier B.V.
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., ... Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W521–W525.
- Maheshwari, A., Kurundkar, A. R., Shaik, S. S., Kelly, D. R., Hartman, Y., Zhang, W., ... Ohls, R. K. (2009). Translational Research in Normal and Disordered Development (TReNDD) Program, UAB Department of Pediatrics; and 7. *Am J Physiol Gastro-Intest Liver Physiol*, 4, 1–10.
- Manea, I., Casian, M., Hosu-Stancioiu, O., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., & Cristea, C. (2024). A review on magnetic beads-based SELEX technologies: Applications from small to large target molecules. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V.
- Mannes, P. Z., Barnes, C. E., Biermann, J., Latoche, J. D., Day, K. E., Zhu, Q., ... Tavakoli, S. (2023). Molecular imaging of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) in experimental acute lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(3).
- Mattern, A., Zellmann, T., & Beck-Sickinger, A. G. (2014). Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*. 19–26.
- Mayıs, O., Sağlık, Ü., Fakültesi, B., Ve, B., & Bölümü, D. (n.d.). *GÜNCEL BİR ADİPOKİN: CHEMERİN A CURRENT ADIPOKINE: CHEMERIN* *Meşure Nur ÇELİK, Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT*.
- Meder, W., Wendland, M., Busmann, A., Kutzleb, C., Spodsberg, N., John, H., ... Forssmann, W. G. (2003). Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Letters*, 555(3), 495–499.
- Mi, J., Liu, Y., Rabbani, Z. N., Yang, Z., Urban, J. H., Sullenger, B. A., & Clary, B. M. (2010). In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nature Chemical Biology*, 6(1), 22–24.
- Michael Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Research*, Volume 31, Issue 13, 1 July 2003, Pages 3406–3415.
- Mitchell, D., Chintala, S., & Dey, M. (2018). Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *Journal of Neuroimmunology*. 63–73. Elsevier B.V.

- Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C., & Kondo, A. (2009). Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, 38(4).
- Mosing, R. K., & Bowser, M. T. (2009). Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). *Methods in Molecular Biology*, 535, 33–43.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Bert, C. A. H., Horuk, R., Matsushima, K., ... Power, C. A. (n.d.). *International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors*.
- Nafie, L. A. ., & Mantsch, H. H. . (1993). *Proceedings of biomolecular spectroscopy III : 17-18 January 1993, Los Angeles, California*.
- Nagpal, S., Patel, S., Jacobe, H., DiSepio, D., Ghosn, C., Malhotra, M., ... Chandraratna, R. A. S. (1997). Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(1), 91–95.
- Nikanfar, S., Oghbaei, H., Rastgar Rezaei, Y., Zarezadeh, R., Jafari-gharabaghlou, D., Nejabati, H. R., ... Dittrich, R. (2021). Role of adipokines in the ovarian function: Oogenesis and steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd.
- Okten, S. B., & Bildacı, T. B. (2020). Salivary Leptin and Chemerin; a novel way of gestational diabetes screening. *Gynecological Endocrinology*, 36(12), 1116–1118.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 11, pp. 85–97.
- Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A., & Barthelmebs, L. (2013). Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. *Methods*. 229–240.
- Paniel, Nathalie, Istamboulié, G., Triki, A., Lozano, C., Barthelmebs, L., & Noguier, T. (2017). Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. *Talanta*, 162, 232–240.
- Parlee, S. D., Ernst, M. C., Muruganandan, S., Sinal, C. J., & Goralski, K. B. (2012). Serum chemerin levels vary with genetic background and are induced by immune exposure in mice. *Endocrinology*, 153(10), 5098-5107.
- Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L., Facchetti, F., ... Sozzani, S. (2007). The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*, 109(9), 3625–3632.
- Poulos, S. P., Hausman, D. B., & Hausman, G. J. (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 20–34.

- Ress, C., Tschoner, A., Engl, J., Klaus, A., Tilg, H., Ebenbichler, C. F., ... Kaser, S. (2010). Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels. *European Journal of Clinical Investigation*, 40(3), 277–280.
- Roman, A. A., Parlee, S. D., & Sinal, C. J. (2012). Chemerin: A potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine*, Vol. 42, pp. 243–251. Humana Press Inc.
- Rourke, J. L., Dranse, H. J., & Sinal, C. J. (2013). Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity Reviews*. 245–262.
- Rourke, Jillian L., Muruganandan, S., Dranse, H. J., McMullen, N. M., & Sinal, C. J. (2014). Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *Journal of Endocrinology*, 222(2), 201–215.
- Rundhaug, J. E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(2), 267-285.
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460–1465.
- Schultz, S., Saalbach, A., Heiker, J. T., Meier, R., Zellmann, T., Simon, J. C., & Beck-Sickinger, A. G. (2013). Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks epithelial barrier function. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(4), 946-955.
- Sell, H., Divoux, A., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Bedossa, P., ... Clément, K. (2010). Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(6), 2892–2896.
- Sell, H., & Eckel, J. (2009). Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: In vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? *Proceedings of the Nutrition Society*, 68(4), 378–384.
- Sell, H., Launcikienė, J., Taube, A., Eckardt, K., Cramer, A., Horrigts, A., ... & Eckel, J. (2009). Chemerin is associated with insulin resistance and inflammation in human skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes*, 58(12), 2731-2740.
- Shin, H. S., Gedi, V., Kim, J. K., & Lee, D. ki. (2019). Detection of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles using DNA aptamers. *Scientific Reports*, 9(1).
- Song, K. M., Cho, M., Jo, H., Min, K., Jeon, S. H., Kim, T., ... Ban, C. (2011). Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Analytical Biochemistry*, 415(2), 175–181.
- Song, K. M., Lee, S., & Ban, C. (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors*. 612–631.

- Song, Y., Zhu, Z., An, Y., Zhang, W., Zhang, H., Liu, D., ... Yang, C. J. (2013). Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Analytical Chemistry*, 85(8), 4141–4149.
- Stejskal, © D, Karpisek, M., Hanulova, Z., Svestak, M., Stejskal, D., Karpisek, M., ... Svestak, M. (2008). *CHEMERIN IS AN INDEPENDENT MARKER OF THE METABOLIC SYNDROME IN A CAUCASIAN POPULATION-A PILOT STUDY*.
- Stoltenburg, R., Nikolaus, N., & Strehlitz, B. (2012). Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1(1).
- Tan, B. K., Chen, J., Farhatullah, S., Adya, R., Kaur, J., Heutling, D., ... Randeve, H. S. (2009). Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes*, 58(9), 1971–1977.
- Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2424-2434.
- Trecek, O., Buechler, C., & Ortmann, O. (2019). Chemerin and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.
- Tuerk, C., & Gold, L. (n.d.). *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase* Downloaded from.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220).
- van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S. J., van Dijk, M., de Vries, S. J., & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 720–725.
- Viciano, C. P. (n.d.). *Study of the activation mechanisms of the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) and the atypical chemokine receptor 3 (ACKR3) Untersuchung zum Aktivierungsmechanismus des CXC Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) und des atypischen Chemokin-Rezeptor 3 (ACKR3)*.
- Waly, Y., Hussain, A., Al-Majmoei, A., Alatoom, M., Alaraibi, A. J., Alaysereen, A., & Deen, G. R. (2026). Evolution of Biosensors and Current State-of-the-Art Applications in Diabetes Control. *Biosensors*, 16(1), 39.
- Wang, C., Wu, W. K. K., Liu, X., To, K. F., Chen, G. G., Yu, J., & Ng, E. K. W. (2014). Increased serum chemerin level promotes cellular invasiveness in gastric cancer: A clinical and experimental study. *Peptides*, 51, 131–138.

- Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Filarsky, M., Bauer, S., Wiest, R., ... Buechler, C. (2010). Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clinical Endocrinology*, 72(3), 342–348.
- White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., & Sullenger, B. (2001). Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle” SELEX. *Molecular Therapy*, 4(6), 567–573.
- Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M., & Communi, D. (2005). Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 175).
- Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., Le Poul, E., Migeotte, I., ... Communi, D. (2003). Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *Journal of Experimental Medicine*, 198(7), 977–985.
- Wittamer, V., Grégoire, F., Robberecht, P., Vassart, G., Communi, D., & Parmentier, M. (2004). The C-terminal Nonapeptide of Mature Chemerin Activates the Chemerin Receptor with Low Nanomolar Potency. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9956–9962.
- Wolter, O., & Mayer, G. (2017). Aptamers as valuable molecular tools in neurosciences. *Journal of Neuroscience*, 37(10), 2517–2523.
- Xu, C.-H., Yang, Y., Wang, Y.-C., Yan, J., & Qian, L.-H. (2017). Oncotarget 22483 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) Prognostic significance of serum chemerin levels in patients with non-small cell lung cancer. In *Oncotarget*.
- Yagi, M., Sasaki, Y., Abe, Y., Yaoita, T., Sakuta, K., Mizumoto, N., ... Ueno, Y. (2020). Association between High Levels of Circulating Chemerin and Colorectal Adenoma in Men. *Digestion*, 101(5), 571–578.
- Yamawaki, H., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., & Hara, Y. (2012). A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(1), 152–157.
- Yang, M., Yang, G., Dong, J., Liu, Y., Zong, H., Liu, H., ... Li, L. (2010). Elevated Plasma Levels of Chemerin in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus With Hypertension.
- Yao, C., Tang, H., Wu, W., Tang, J., Guo, W., Luo, D., & Yang, D. (2020). Double Rolling Circle Amplification Generates Physically Cross-Linked DNA Network for Stem Cell Fishing. *Journal of the American Chemical Society*, 142(7), 3422–3429.

- Yoshimura, T., & Oppenheim, J. J. (2008). Chemerin reveals its chimeric nature. *Journal of Experimental Medicine*, 2187–2190.
- Yoshimura, T., & Oppenheim, J. J. (2011). Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. *Experimental Cell Research*, 674–684. Academic Press Inc.
- Yu, X., Pan, X., Huang, M., Lin, X., & Wang, X. (2025). Chemerin mediates exercise-induced improvements of bone microstructure and bone mass in diabetes or high fat diet mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 599.
- Yue, G., An, Q., Xu, X., Jin, Z., Ding, J., Hu, Y., ... Xie, R. (2023). The role of Chemerin in human diseases. *Cytokine*. Academic Press.
- Yücel, A., & Özcan, H. M. (2025). "Fabrication and application of disposable 3D-printed gold electrodes for impedimetric biosensing of chemerin: a potential obesity biomarker." *Analytical Methods*, 17(34), 6866-6880.
- Zabel, B. A., Allen, S. J., Kulig, P., Allen, J. A., Cichy, J., Handel, T. M., & Butcher, E. C. (2005). Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34661–34666.
- Zabel, B. A., Silverio, A. M., & Butcher, E. C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis by human immature dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 174(1), 244-251.
- Zabel, B. A., Nakae, S., Zúñiga, L., Kim, J. Y., Ohyama, T., Alt, C., ... Butcher, E. C. (2008). Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2207–2220.
- Zhang, J., Jin, H. C., Zhu, A. K., Ying, R. C., Wei, W., & Zhang, F. J. (2014). Prognostic significance of plasma chemerin levels in patients with gastric cancer. *Peptides*, 61, 7–11.
- Zhang, Q., Jia, Y., Guo, Y., Yu, X., Wang, R., & Wang, X. (2025). Chemerin loss-of-function attenuates glucagon-like peptide-1 secretion in exercised obese mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*.
- Zhao, L., Leung, L. L., & Morser, J. (2022). Chemerin Forms: Their Generation and Activity. *Biomedicines*. MDPI.

- Zheng, H., Zhang, Z., He, J. W., Fu, W. Z., Wang, C., & Zhang, Z. L. (2014). Identification of two novel CLCN7 gene mutations in three Chinese families with autosomal dominant osteopetrosis type II. *Joint Bone Spine*, 188–189. Elsevier Masson SAS.
- Zhou, J. X., Liao, D., Zhang, S., Cheng, N., He, H. Q., & Ye, R. D. (2014). Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 653–663.
- Zhu, G., & Chen, X. (2018, September 1). Aptamer-based targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65–78. Elsevier B.V.
- Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., ... Zhang, B. (2017). Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG.