



**Kuantum Noktacığı Lüsiferaz BRET Çiftinin DNA
Bağlanıcı Proteinler Kullanılarak DNA İskelesi
Üzerinde Montajına Dayalı Bir Nanobiyosensör
Platformunun Geliştirilmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113M158

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Can ÖZEN

MAYIS 2016
ANKARA



ÖNSÖZ

2013-2016 yılları arasında TÜBİTAK (MAG 113M158) desteğiyle Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Can Özen'in yürütücülüğünde tamamlanan bu projede, kendiliğinden düzenlenme prensibine dayalı olarak, bir DNA iskelesi üzerinde çalışan nanobiyosensör platformu ilke ispatı yapılmıştır.

Çalışmalar ODTÜ Merkezi Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi ve ODTÜ Biyomateryal ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi (BIOMATEN) olanaklarıyla gerçekleştirilmiştir.

Proje ekibi olarak çalışmalarımıza destek sağlayan Prof. Dr. Mesut Muyan'a teşekkür ederiz.

ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Terminoloji ve Kısaltmalar.....	3
2.2 DNA Nanoteknolojisi ve DNA-Aracılı Montaj.....	3
2.3 DNA Bağlanıcı Proteinler ve Tepki Elemanları.....	6
2.4 Kuantum Noktacıkları (KN).....	7
2.5 Rezonans Enerji Transferi (RET); FRET ve BRET.....	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	12
3.1 Kuantum Noktacığı (KN).....	12
3.2 Lüsiferaz (LF).....	12
3.3 DNA Bağlanıcı Proteinler (DBP) ve Tepki Elemanları (TE).....	13
3.4 Nano-Tag (NT9).....	13
3.5 Bağlayıcı (BC).....	13
3.6 DNA İskelesi.....	13
3.7 Klonlama Çalışmaları.....	13
3.8 Protein Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları.....	14
3.9 <i>In Situ</i> BRET Platformu Sinyali Ölçümü.....	14
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	15
4.1 Klonlama Çalışmaları.....	15
4.1.1 Lüsiferaz Kolu Klonlaması.....	15
4.1.2 Kuantum Noktacığı Kolu Klonlaması.....	17
4.1.3 DNA İskelesi Klonlaması.....	18
4.2 Protein Ekspresyon ve Saflaştırılma Çalışmaları.....	18



4.2.1	Lüsiferaz Kolu Ekspresyonu.....	19
4.2.2	Kuantum Noktacığ Kolu Ekspresyonu.....	20
4.2.3	Kuantum Noktacığ Kolu Safılaştırması.....	21
4.3	<i>In Situ</i> BRET Platformu.....	23
4.3.1	<i>In Situ</i> BRET Platformu Optimizasyon Çalışmaları.....	26
5.	SONUÇ.....	28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET) prensibine dayalı sensör platformu bileşenleri.....	1
Şekil 2. DNA iskelesi üzerinde oligonükleotidler yoluyla bir araya getirilmiş glikoz oksidaz (GOx)-yaban turpu peroksidaz (HRP) enzim çifti.....	5
Şekil 3. DNA'ya bağlanmış bir çinko parmak motifi-Zif268 (Pavletich vd., 1991)	7
Şekil 4. Tipik bir kuantum noktacığının yapısı ve boyutuna bağlı emisyon dalga boyu değişimi (Invitrogen).....	8
Şekil 5. Kuantum noktacıklarının biyolojik görüntüleme alanındaki uygulamaları (Michalet vd., 2005).....	8
Şekil 6. Histidin ek ile KN'ye takılan ve tayini hedeflenen proteaz enziminin tanıdığı bir peptid dizilimi ve soğurucu molekül içeren test sistemi. Soğurucu molekül enzim yokluğunda KN.....	9
Şekil 7. Lüsiferaz-KN konjügasyonu ile BRET'e dayalı kendiliğinden ışık yayan KN'ler (So vd., 2006).....	10
Şekil 8. Invitrogen kuantum noktacıklarının absorpsiyon ve emisyon eğrileri.....	12
Şekil 9. Lüsiferaz kolunu oluşturan DNA bileşenleri ve 1638 baz çiftinden oluşan parçanın dizilim bilgisi.....	15
Şekil 10. pET28a vektöründen kesilen LF kolunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kare içerisine alınmış bant yaklaşık 1600 baz çifti uzunluğundadır.....	16
Şekil 11. KN kolunu oluşturan DNA bileşenleri ve 504 baz çiftinden oluşan parçanın dizilim bilgisi.....	17
Şekil 12. pET28a vektöründen kesilen KN kolunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kare içerisine alınmış bant yaklaşık 500 baz çifti uzunluğundadır.....	18
Şekil 13. CDC ve Gal4 DBP'lerinin bağlandığı tepki elemanlarını içeren DNA segmenti.....	18
Şekil 14. LF kolunu oluşturan protein bileşenleri ve parçanın protein dizilimi.....	19
Şekil 15. LF kolunun PAGE görüntüsü. 1: indüksiyonsuz, 2: 37°C 1 saat indüksiyon, 3: 37°C 2 saat indüksiyon, 4: 37°C 4 saat indüksiyon, 5: indüksiyonsuz, 6: 24°C 1 saat indüksiyon, 7: 24°C 2 saat indüksiyon ve 8: 24°C 4 saat indüksiyon.....	20
Şekil 16. KN kolunu oluşturan protein bileşenleri ve parçanın protein dizilimi.....	20



Şekil 17. KN kolunun IPTG indüksiyonsuz (1) ve indüksiyonlu (2) hücre lizatlarının SDS-PAGE görüntüsü.....	21
Şekil 18. Kuantum Noktacığı kolu olan STII-Gal4'un streptavidin saflaştırma kolonu uygulamasından elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. 1: Kolona yükleme, 2: Yıkama I, 3: Yıkama II, 4: Yıkama III, 5: Yıkama IV, 6: Yıkama V, 7: Elüsyon I, 8: Elüsyon II ve 9: Elüsyon III.....	22
Şekil 19. In situ BRET platformu lüminesans ölçüm grafiği. A) Lusiferaz enzim aktivitesi ve kuantum noktacığı emisyonunu gösteren dalga boyu eğrileri mavi ve turuncu renklerle gösterilmiştir.....	24
Şekil 20. In situ BRET platformu bileşenlerinden CDC ve Gal4 tepki elemanları arası uzaklığın lüminesans sinyaline etkisi. Ölçümler üç bağımsız deneyin averajı ve averajın standart hatası (SEM) olarak gösterilmiştir.....	26



ÖZET

Bir ışık proteiniyle floresan molekül arasında gerçekleşen enerji transferi olarak tanımlanan Biyolüminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET)'e dayanan biyosensör platformları proteaz aktivitesi ölçümü, nükleik asit tayini, lenfatik görüntüleme ve fotodinamik terapi gibi amaçlar için başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmalarda donör-alıcı ikilisi olarak birbirine kovalent bağ ile bağlanmış lüsiferaz-kuantum noktacığ**ı** bileşenleri kullanılmıştır.

DNA molekülü sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel özellikleri açısından nanoteknolojik uygulamalar için ideal bir biyopolimer malzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Bu proje kapsamında moleküler kendiliğinden düzenlenme prensibine dayalı olarak BRET donör-alıcı ikilisi olan lüsiferaz-kuantum noktacığ**ı**nı, DNA bağlanıcı proteinler yoluyla bir DNA iskelesi üzerine monte etmek amaçlanmıştır. Alıcı molekül olarak streptavidin kaplı bir kuantum noktacığ**ı** kullanılarak, Nano-Tag peptidine bağlı bir DNA bağlanıcı protein yoluyla DNA iskelesi üzerinde konumlandırılmıştır.

Proje, DNA bağlanıcı proteinler olan östrojen reseptör bileşeni CDC ve galaktoz metabolizmasından sorumlu Gal4 transkripsiyon faktörlerinin Renilla lüsiferaz enzimi ve Nano-Tag peptidiyle hazırlanan füzyon proteinlerinin üretimiyle başlamış, fakat yeterli miktarda protein sağlanamaması üzerine platform *in situ* (hücre içi) kapsama taşınmıştır. Sensör bileşenlerini taşıyan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu ilke prensibi ispatına dayalı platformdan BRET sinyali elde edilmiştir. Elde edilen sinyal verimi (BRET oranı 0.2) bileşenlerin kovalent bağlı olduğu sistemlere oranla (0.3-0.6) daha düşüktür.

Oluşturulan nanobiyosensör platformu rezonans enerji transfer veriminin iyileştirilmesi durumunda, özellikle DNA bağlanıcı ve modifiye edici moleküllerin (DBPler, Dnazlar, DNA metilazlar, vb.) aktivitelerini belirlemekte kullanılabilecek uygulama potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: nanobiyoteknoloji, biyosensör, biyolüminesans rezonans enerji transferi, DNA, kuantum noktacığ**ı**



ABSTRACT

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) which is defined as the energy transfer between a light protein and fluorescence molecule, has been previously used in biosensor applications such as protease activity determination, nucleic acid detection, lymph node imaging and photodynamic therapy. In these applications, donor-acceptor pair (luciferase-quantum dot) has been covalently linked.

DNA is an ideal biopolymer material for nanotechnology applications due to its structural and functional properties. Within the scope of this project, which is based on self-assembly principle, it was aimed to assemble the BRET donor-acceptor pair, luciferase-quantum dot, on a DNA scaffold using DNA binding proteins. As a donor molecule, a streptavidin-coated quantum dot was used and its localization on DNA was facilitated by a Nano-tag linked DNA binding protein.

In the initial phase of the project, production of fusion protein constructs of DNA binding proteins CDC (an estrogen receptor component) and Gal4 (a transcription factor responsible for galactose metabolism) with Renilla luciferase and Nano-Tag peptide has started but due to the low protein yield, platform was carried to an *in situ* format. A BRET signal was obtained from the proof-of-principle platform which was constructed in MDA-MB-231 breast cancer cell line. The signal efficiency of the system (BRET ratio 0.2) was relatively poor when compared to the covalently linked BRET pairs (0.3-0.6).

If the resonance energy transfer efficiency is improved, nanobiosensor platform described in this project may have an application potential for determination of the activity of DNA binding and modifying molecules such as transcription factors, DNAses and methylases.

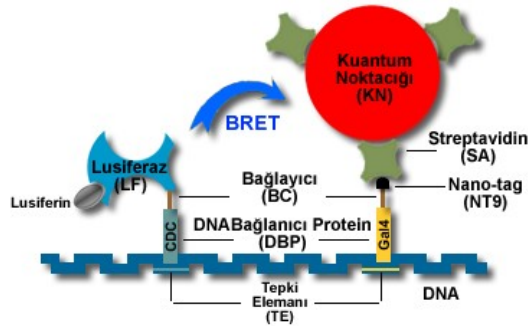
Keywords: nanobiotechnology, biosensor, bioluminescence resonance energy transfer, DNA, quantum dots

1. GİRİŞ

Rezonans Enerji Transferi (RET) aralarındaki uzaklık 10 nm'nin altında olan bir donör ve alıcı kromofor çifti arasında gerçekleşen enerji transferidir. Bu transfer bir ışık proteiniyle floresan bir molekül arasında gerçekleştiğinde Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET) olarak tanımlanmaktadır. Literatürde lüsiferaz (ışık proteini) ve kuantum noktacığı (floresan molekül) ikilisinin kullanıldığı, proteaz aktivitesi ölçümü, nükleik asit tayini, lenfatik görüntüleme ve fotodinamik terapi gibi amaçlar için geliştirilmiş BRET sensörü örnekleri yer almaktadır. Bu örneklerin tümünde lüsiferaz ve kuantum noktacığı bileşenleri kovalent olarak birbirlerine bağlanmış şekilde kullanılmaktadır.

Yapısal ve fonksiyonel özellikleri açısından zengin bir biyopolimer olan DNA molekülü, nanoteknoloji araştırmalarında da kullanımı giderek artan bir bileşen olarak göze çarpmaktadır. DNA nanoteknolojisi adı altındaki bu çalışmalar, ağırlıklı olarak DNA origamileri adı verilen supramoleküler sistemlerin kurulması ve oligonükleotid hibridizasyonu yoluyla DNA aracılı komplekslerin oluşturulması üzerinedir.

Bu özgün, ilke ispatı (proof of principle) projesi kapsamında, DNA'yı bir yapısal iskele olarak kullanarak, BRET sensör bileşenlerini kovalent bağ gerektirmeden, moleküler kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) prensibine dayanarak bir araya getirmek hedeflenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak, DNA Bağlanıcı Proteinler (DBP) yoluyla bir DNA iskelesi üzerinde bir araya getirilen Lusiferaz-Kuantum Noktacığı nano-kompleksinin bileşenleri arasında gerçekleşen Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferine (BRET) dayalı bir nanobiyosensör platformu geliştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET) prensibine dayalı sensör platformu bileşenleri



Projenin iki dönem raporunu kapsayan bir buçuk yıllık süre zarfında platformu oluşturan proteinlerin klonlama, ekspresyon ve saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Protein üretiminin gerekli verimde sağlanamaması üzerine son bir yıllık proje döneminde sensör geliştirme stratejisi *in vitro* kapsamdan *in situ* (hücre içi) kapsama taşınarak özgün bir BRET sensör platformu ilke ispatı sağlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Terminoloji ve Kısaltmalar

- DNA Binding Protein: DNA Bağlanıcı Protein (DBP)
- DNA-guided: DNA Aracılı
- Donor/Acceptor: Donör/Alıcı
- Linker: Bağlayıcı (BC)
- Proof of Principle: İlke İspatı
- Quantum Dot: Kuantum Noktacığı (KN)
- Response Element: Tepki Elemanı (TE)
- Scaffold: İskele
- Self-assembly: Kendiliğinden Düzenlenme / Kendiliğinden Montaj

2.2 DNA Nanoteknolojisi ve DNA-Aracılı Montaj

Moleküler kendiliğinden düzenlenme, başlangıçta herhangi bir düzen ve organizasyon içerisinde olmayan bir molekül topluluğunun, herhangi bir dış etkene ihtiyaç duymadan, sistemi oluşturan parçalar arasındaki spesifik etkileşimler sonucunda, ortaya düzenli bir motif çıkarması olayı olarak tanımlanabilir (Israelachvili vd., 1976). Kristal ve lipit çift katman oluşumu, protein katlanması ve nükleik asit hibridizasyonu doğada gerçekleşen birkaç önemli molekül kendiliğinden düzenlenme örneğidir.

Kendiliğinden düzenlenme, hızla gelişmekte olan nanoteknoloji alanında nanomateryallerin kontrolü ve yeni malzemelerin geliştirilmesi, kataliz ve medikal tayin gibi uygulamalar vaat eden önemli bir konu başlığıdır. Bu hususta, çok moleküllü nanosistemlerin oluşturulması için ideal iskele özelliklerine sahip olan DNA, yürütülen çalışmaların önemli bir kısmında kullanılan bir biyopolimerdir (Mirkin ve Niemeyer, 2004).

Nükleik asitler, dünya üzerindeki tüm yaşam formlarının ve virüslerin yapısal ve fonksiyonel işlevleri için gerekli bilginin kodlandığı ortak bir molekül dildir (Krebs vd., 2011). Bir nükleik asit tipi olan DNA molekülünü nanoteknoloji açısından son derece cazip bir yapı malzemesi olarak ön plana çıkaran özellikleri arasında sadece dört farklı yapı taşından oluşması ve bu yapı taşlarının dizilim sırasına göre neredeyse sınırsız sayıda yapısal ve fonksiyonel işlev sunabilmesi, sentezi gün geçtikçe kolaylaşan ve ucuzlayan bir polimer oluşu, biyoyumluluğu, tahmin edilebilir ve modellenen yapı, yapısında farklı değişimler (kesme, birleştirme, kimyasal modifikasyon, vb.) yapabilmek için doğanın sunduğu birçok enzimin



bulunması ve özellikle nano montaj amacına yönelik spesifik (DNA-DNA, DNA-RNA ve DNA-Protein) ve spesifik olmayan (DNA-iyon) benzeri etkileşimler için uygun oluşu sayılabilir (Mirkin ve Niemeyer, 2004).

DNA nanoteknolojisinin günümüzde bulunduğu noktaya genel bir bakış attığımızda, katalitik verimin artırılmasına yönelik yapay çoklu enzim komplekslerinin oluşturulmasına yapısal destek sağlayan bir iskele olarak kullanımının yanı sıra miyozin ve kinesin gibi motor proteinlerine benzer ilke ispatı dinamik araçlarının da ("tweezers", "walkers" ve "steppers") DNA molekülü kullanılarak üretildiğini görmekteyiz (Michelotti vd., 2012). 80'li yıllarda Seeman (1982) önderliğinde başlayan bu çalışmalar, özellikle 2000'li yıllarda hız kazanmış ve DNA bazlı birçok iki ve üç boyutlu kompleks yapının oluşturulmasına önyak olmuştur (Pelesko vd., 2007). Kısa DNA parçaları (oligonükleotidler) tarafından tasarlanan iki veya üç boyutlu yapılara dönüşebilen bir DNA diziliminden oluşan DNA origamileri, bu yapılar arasında, alanı tanımlayıcı reform niteliği taşıyan bir ilerleme sağlamıştır (Rothmund vd., 2006).

Projemizin de bel kemiğini oluşturan DNA-Aracılı Montaj, DNA nanoteknolojisi çalışmalarının büyük bölümünü oluşturan DNA'ya dayalı iki ve üç boyutlu yapıların oluşturulması yerine DNA'nın bir montaj iskelesi olarak kullanılarak proteinler, nanoparçacıklar (NP) vb. elementlerden, kendiliğinden montaj prensibine dayanan nano kompleksler oluşturma şeklinde tanımlanabilir. Nanoteknoloji alanının önde gelen isimlerinin DNA aracılı montaj ile yakın gelecekte gerçekleştirilebileceklerini düşündükleri teknolojik atılımlar arasında yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip biyotestler ve biyosensörler, alternatif enerji üretim sistemleri, nano ilaç geliştirme platformları, moleküler hesaplama, plazmonik, organik sentez ve sentetik biyoloji uygulamaları sayılabilir (Michelotti vd., 2012; Mirkin ve Niemeyer, 2007).

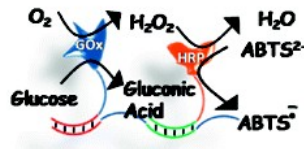
Nano-montaj çalışmaları genel olarak a) iskelesiz oligo-yönlendirmeli, b) DNA iskelesi üzerinde oligo-yönlendirmeli, c) DNA iskelesi üzerinde kovalent olmayan, d) DNA iskelesi üzerinde kovalent ve son olarak da e) DNA iskelesi üzerinde DNA Bağlanıcı Proteinler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu farklı montaj stratejileri için aşağıdaki örnekler gösterilebilir:

- a. *İskelesiz Oligo-Yönlendirmeli Montaj*: Bu alanda öncü çalışmalar 1996 yılında Mirkin ve Alivisatos'un önderliğindeki gruplar tarafından gerçekleştirilmiş ve Altın NP'ler (AuNP) DNA-NP konjugatları yoluyla bir araya getirilmiştir. İlerleyen yıllarda AuNP'lerin dışında diğer nanomateryallerin de kullanıldığı ve oligonükleotid hibridizasyonuna dayalı malzeme montaj çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalara

örnek olarak DNA-programlı bir araya getirilen yarıiletken NP'ler (Mitchell vd., 1999; Parak vd., 2002), nano çubuklar (Dujardin vd., 2001), mezoboyutlu parçacıklar (Dujardin vd., 2001; Soto vd., 2002; Milam vd., 2003) ve dendrimerler (Choi vd., 2004; DeMattei vd., 2004) verilebilir. Brookhaven Laboratuvarlarından Nykypanchuk ve ark., 2008 yılında NP yüzeylerini kaplamak için iki farklı tip oligonükleotid kullanarak sıcaklık yoluyla ayarlanabilir bir kristal yapı oluşturma metodu geliştirmişlerdir (DOE/Brookhaven National Laboratory).

- b. *DNA İskelesi Üzerinde Oligo-Yönlendirmeli Montaj*: Seeman'ın teorik olarak öngördüğü DNA iskelesi üzerinde moleküler montaj konsepti, Niemeyer'in grubu tarafından oligonükleotid bağlanmış streptavidin proteinlerinin tek sarmal bir DNA molekülü üzerinde sıralanmasıyla deneysel olarak da gösterilmiştir (1994). Bunu takip eden birçok çalışma genel olarak değerlendirildiğinde, ağırlıklı yaklaşımın DNA iskelesi üzerinde bir araya getirilecek parçaların montajı için bu parçalara eklenmiş oligonükleotidlerin ve nükleotid eşleşmesine (G-C, A-T) dayalı hibridizasyon kimyasının kullanılması prensibine dayandığı görülmektedir.

Literatürde, yukarıda açıklanan yaklaşım yoluyla DNA-yönlendirmeli yapay çoklu enzim komplekslerinin oluşturulmasına dair örnekler bulunmaktadır. İlk örneklerden biri lüsiferaz ve NFOR enzimlerinin streptavidin/biotin ve oligonükleotidler kullanarak bir DNA iskelesi üzerinde bir araya getirilmeleri ve gerçekleşen redoks reaksiyonu sonucu ışık üretilmesidir (Niemeyer vd., 2002). Bir başka örnek, glikoz oksidaz (GOx) ve yaban turpu peroksidaz (HRP) enzimlerinin DNA yoluyla sıralanarak enzimatik bir kademeli dizinin oluşturulabileceğinin gösterilmesidir (Şekil 2; Willner vd., 2009).



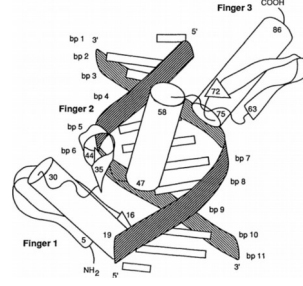
Şekil 2. DNA iskelesi üzerinde oligonükleotidler yoluyla bir araya getirilmiş glikoz oksidaz (GOx)-yaban turpu peroksidaz (HRP) enzim çifti

Dikkat çekici diğer bir çalışma, *Nature* dergisinde çıkan DNA origami iskelesi üzerinde AuNP'lerini taşıyıp birbirine transfer edebilen ve programlanabilir DNA dizilimlerinden oluşan bir DNA montaj hattının üretilmesidir (Gu vd., 2010).

- c. *Kovalent Modifikasyon ile DNA İskelesi Üzerinde Montaj:* Weiss ve ark., DNA Bağlanıcı Proteinleri (DBP) Kuantum Noktacıkları (KN) kullanarak işaretlemiş ve DNA üzerindeki dizilimlerini görüntülemişlerdir. Bu çalışma her ne kadar kullanılan araçlar açısından projemize benzerlik gösterse de çalışmanın amaç ve yaklaşımı önerilen projeden tamamen farklıdır. Çalışmada bir nano-montaj yoktur. DBP'ler kendiliğinden düzenlenme amacıyla montaj aracı olarak kullanılmamış, çapraz-bağlama yoluyla DNA üzerine sabitlenerek antikor-KN konjugatları ile işaretlenmişlerdir (Ebenstein vd., 2009).
- d. *Kovalent Olmayan Modifikasyon ile DNA İskelesi Üzerinde Montaj:* Science dergisinde yayınlanan bir çalışmada, aralarında eşit uzaklık olan streptavidin molekülleri biotin yoluyla modifiye edilmiş DNA iskelesi üzerinde art arda dizilmiştir (Yan vd., 2003).
- e. *DNA İskelesi Üzerinde DNA Bağlanıcı Protein-Yönlendirmeli Montaj:* Projemizde, DNA biyosensörleri, protein biyokimyası ve transkripsiyon faktörleri üzerine daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalardan elde ettiğimiz bilgi ve tecrübeler ışığında, yukarıda özetlenen araç ve yaklaşımlara alternatif olarak DBP ve bu proteinlerin iskele üzerinde spesifik olarak hedeflediği kısa DNA dizilimleri olan Tepki Elemanlarının (TE) nano-montaj araçları olarak kullanıldığı bir platform tasarladık.

2.3 DNA Bağlanıcı Proteinler ve Tepki Elemanları

DNA Bağlanıcı Proteinler (DBP) DNA replikasyonda görevli polimerazlar, gen ifadesinde rol alan transkripsiyon faktörleri, DNA'nın paketlenmesine yardımcı olan histon proteinleri, gen ifadesini düzenlemek amacıyla DNA'yı modifiye eden metilazlar ve DNA tamirinde rol alan nükleazlar gibi birçok proteinin yapısında yer alan proteinlerdir. Bunlar arasında en detaylı çalışılan sınıf olan transkripsiyon faktörleri, çift sarmal üzerinde tepki elemanı adı verilen kısa DNA dizilimlerini tanıyarak DNA'ya bağlanır ve RNA polimeraz enzimini devreye sokarak sorumlu oldukları genlerin ifade edilmesini sağlarlar. Günümüze kadar farklı birçok organizmada binlerce DBP bulunmuştur. Bu proteinlerin DNA bağlanıcı bölgeleri yapısal açıdan ve bağlandıkları DNA dizilimine göre sınıflara ayrılmış ve detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Doğada en sık görülen yapısal motifler arasında sarmal-dönüş-sarmal, lösün fermuarı, sarmal-döngü-sarmal ve çinko parmak sayılabilir (Şekil 3; Alberts vd., 2002; Lewin vd., 2008).



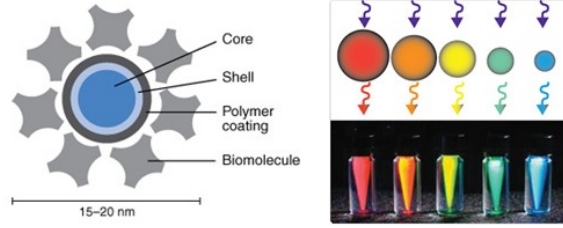
Şekil 3. DNA'ya bağlanmış bir çinko parmak motifi-Zif268 (Pavletich vd., 1991)

Montaj aracı olarak oligonükleotidler yerine DBP'lerin kullanılması, protein biyokimyasına getireceği yeni açılımların yanı sıra, hibridizasyon için gerekli tek sarmal iskele ihtiyacının ortadan kaldırarak önemli bir avantaj sağlayacaktır. Canlılarda DNA ikili sarmal halinde bulunduğundan bu gerekliliğin ortadan kaldırılması, özellikle biyomedikal alanda geliştirilebilecek nanobiyosensörler ve testler açısından çok önemlidir.

Gerçekleştirdiğimiz detaylı literatür taraması sonucu DNA iskelesi üzerinde DBP kullanılarak KN veya NP montajına dair bir çalışma bulunmamıştır. Öte yandan, DBP'ler kullanılarak DNA iskelesi üzerinde enzimatik katalizi daha etkin hale getirmek için nano-montaj yapan çarpıcı bir çalışma bulunmaktadır (Jerala vd., 2012). Ayrıca DBP'lerin projemize danışman olarak destek verecek Doç. Dr. Mesut Muyan'ın önceki çalışmalarında transkripsiyonel regülasyon amacıyla yapay transkripsiyon faktörlerinin modüler parçaları olarak kullanıldığını da görmekteyiz (Huang vd., 2004; Li vd., 2004).

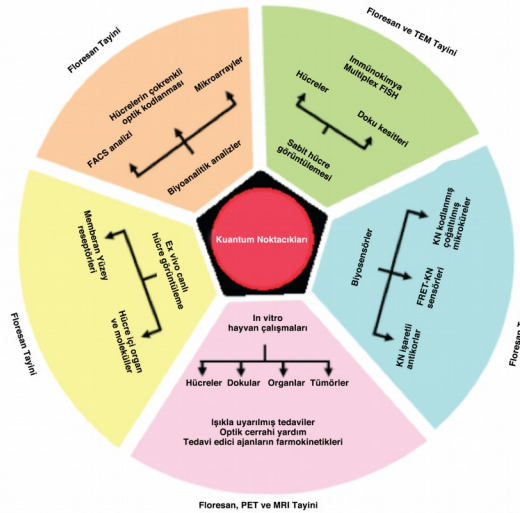
2.4 Kuantum Noktacıkları (KN)

Projede literatürde bir ilk olarak, KN'ler ile DBP'leri bir araya getirerek DNA üzerinde KN'lerin kendiliğinden montajı sağlanmıştır. KN'ler, boyutları 2 ila 10 nm arasında değişen yarı iletken floresan özellikteki nanokristallerdir (Şekil 4). İşaretleyici olarak kullanılacak alternatifler olan organik boyalar ve floresan proteinlerle kıyaslandığında, yüksek kuantum verimi ve parlaklık, boyutuna bağlı olarak değiştirilebilen ışımaya dalga boyu, uyarım sonucu renk kaybına karşı direnç (fotostabilite), dar emisyon ve geniş uyarım spektrumu gibi önemli spektroskopik ve optik avantajlara sahiptirler.



Şekil 4. Tipik bir kuantum noktacığının yapısı ve boyutuna bağlı emisyon dalga boyu değişimi (Invitrogen)

Literatürde KN'lerin hücre görüntüleme ve terapi amacıyla kullanımına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Şekil 5; Lidke vd., 2004; Dahan vd., 2003; Gao vd., 2005; Akerman vd., 2002; Rhyner vd., 2006; Yezhelyev vd., 2007).



Şekil 5. Kuantum noktacıklarının biyolojik görüntüleme alanındaki uygulamaları (Michalet vd., 2005)

2.5 Rezonans Enerji Transferi (RET); FRET ve BRET

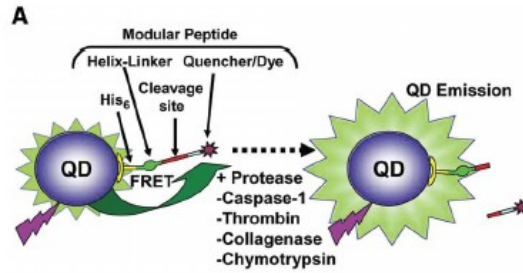
Rezonans Enerji Transferi (RET) aralarındaki uzaklık 10 nm'nin altında olan bir donör ve alıcı kromofor çifti arasında gerçekleşen enerji transferi olarak tanımlanabilir. Enerji transferinin verimliliği donör-alıcı çifti arasındaki uzaklığın altıncı kuvvetiyle ters orantılı olduğundan RET'e dayalı analizler, kullanılan kromoforların (floresan boyalar veya ışık proteinleri) arasındaki uzaklık açısından yüksek hassasiyete sahiptir. Bu hassasiyet sayesinde özellikle protein-protein ve diğer biyomoleküler etkileşimlerin araştırılması ve proteaz aktivitesi gibi

enzimatik fonksiyonların belirlenmesi gibi biyolojik birçok uygulaması bulunmaktadır (Stryer vd., 1967).

RET'in biyo-uygulamalarına bakıldığında hem floresan bir molekül çifti arasında gerçekleşen Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET) ve hem de bir ışık proteiniyle floresan bir alıcı molekül arasında gerçekleşen Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferine (BRET) dayalı çalışmalar olduğunu görmekteyiz. Bu çalışmalarda organik boyalar (Cy3, rodamin, vb.), floresan proteinler (GFP, Yeşil Floresan Protein vb.) ve inorganik nano kristaller (KN'ler) gibi floresan moleküller ve lüsiferaz gibi ışık proteinleri kullanılabilir. Özellikle enzim aktivitesi tayini amaçlı kurulan sistemlerde alıcı molekül olarak soğurucu bir molekül kullanıldığı da görülmektedir.

KN'lerin sıkı paketlenmiş filmler içerisindeki RET özellikleri literatürde oldukça detaylı çalışılmıştır (Crooker vd., 2002; Kagan vd., 1996). Proje konu ve kapsamı ile daha yakından ilgisi olan ve KN içeren dikkat çekici FRET ve BRET çalışmaları aşağıda özetlenmektedir.

Bu çalışmaların ilkinde Patolsky ve ark. oligonükleotid kaplı KN'ler kullanarak FRET prensibine dayalı olarak DNA replikasyonunu takip etmişlerdir (2003). FRET'e dayalı enzim aktivitesi tayini sağlayan bir diğer çalışmada proteolitik enzim aktivitesi ölçümünün RET prensibine dayalı bir sistem üzerinde yapılabileceği gösterilmiştir (Şekil 6; Medintz vd., 2006).

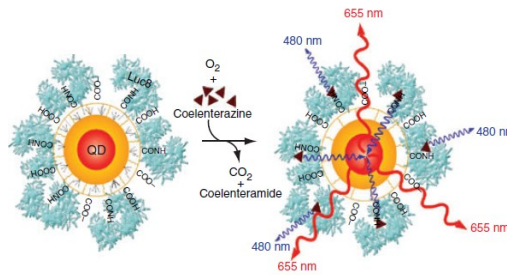


Şekil 6. Histidin ek ile KN'ye takılan ve tayini hedeflenen proteaz enziminin tanıdığı bir peptid dizilimi ve soğurucu molekül içeren test sistemi. Soğurucu molekül enzim yokluğunda KN emisyonunu engellerken enzim varlığında parçacıktan koparılacağı için sinyal oluşumuna etki edemez. Böylece FRET prensibine dayalı olarak hedef proteaz varlığında KN sinyali alınır.

BRET'in FRET ile kıyaslandığında biyolojik uygulamalar açısından sağladığı çok önemli avantajlar bulunmaktadır. Bu nedenle kurmayı hedeflediğimiz sistem BRET prensibine dayalı tasarlanmıştır. FRET analizlerinde bir uyarım kaynağına (lazer, LED, vb.) ihtiyaç duyulması ve hem donör hem de alıcı molekülün bu ışık kaynağı tarafından uyarımı, deneysel kontroller ve analiz sonrası hesaplamalar gerektirmesi açısından pratik değildir ve hata payı içerme riski bulunmaktadır. Ayrıca *in vivo* amaçlı görüntüleme FRET, uyarım ışığının doku (ağırlıklı olarak su molekülleri) tarafından dağıtılmasına bağlı olarak düşük penetrasyona sahiptir ve bu nedenle kullanımı kısıtlıdır. Son olarak, uyarım kaynağı hücrelerdeki floresan özelliğe sahip diğer molekülleri de uyardığından (otofloresan) FRET'e dayalı görüntüleme çalışmalarında ciddi bir sinyal/gürültü sorunu ortaya çıkmaktadır.

BRET'e dayalı sistemlerde enerji transferi, KN'lere entegre haldeki lüsiferaz benzeri bir ışık proteini tarafından gerçekleştirilir. Enzim, lüsiferin tipi bir substratın oksidasyonunu katalizler ve ortaya çıkan fotonların bir kısmı alıcı molekülü uyararak RET gerçekleştirir. Bu tür bir kendiliğinden ışıma sayesinde yukarıda FRET için belirtilen deneysel kontrol ve hesaplama ihtiyacı, doku penetrasyonu ve otofloresan problemleri BRET için geçerli değildir.

Lüsiferaz ve KN çiftine dayalı ilk çalışma Rao ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Rao'nun grubu, Renilla lüsiferaz mutanlığı bir enzimi (Luc8) 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimid (EDC) kimyası kullanılarak bir KN'ye kovalent olarak bağlamış ve ortama Luc8'in substratı olan sölenlerazin verildiğinde reaksiyon sonucu ortaya çıkan ışık KN'lerin uyarımını sağlamıştır (Şekil 7; So vd., 2006).



Şekil 7. Lüsiferaz-KN konjügasyonu ile BRET'e dayalı kendiliğinden ışık saçan KN'ler (So vd., 2006)

Lüsiferaz-KN çiftiyle günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar arasında proteaz aktivitesi ve nükleik asit tayini, lenfatik görüntüleme ve fotodinamik terapi örnek gösterilebilir (Xia vd., 2008; Hsu vd., 2012; Kobayashi vd., 2010). Proje kapsamında kurulan nanobiyosensör

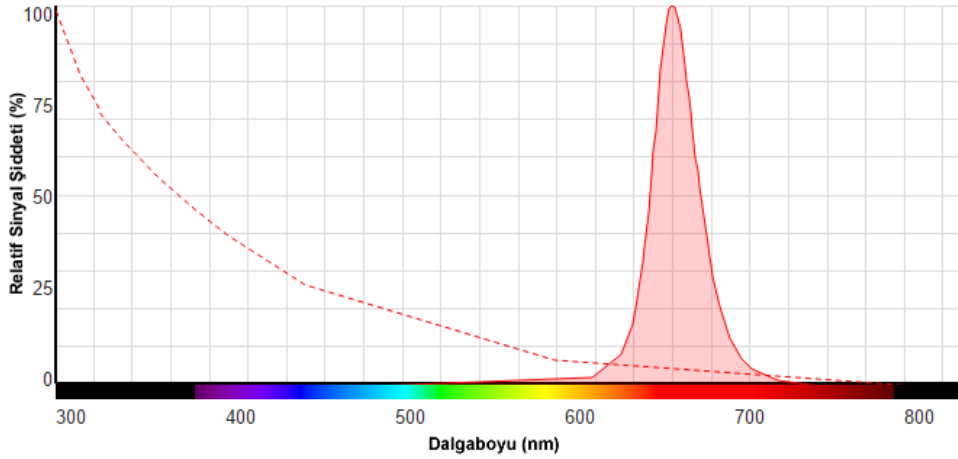


platformunun geliştirilebilmesi için önemli bir bilgi birikimi sağlayan bu yayınlar arasında lüsiferaz-KN çiftini DBP'ler yoluyla bir DNA iskeleti üzerinde bir araya getiren bir çalışma bulunmaması, çalışmaya özgün değer kazandırmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kuantum Noktacığı (KN)

Platformun kuantum noktacığı bileşeni Invitrogen firmasından sağlanan streptavidin kaplı (noktacık başına 5-10 protein) CdSe çekirdek ve ZnS kabuk yapısında Qdot 655 Kuantum Noktacığıdır. Parçacığın absorbands ve emisyon bilgisi Şekil 8'de verilmektedir. Kuantum noktacığı, Renilla lüsiferaz-sölenenterazin h enzim-substrat çiftinin maksimum emisyon değerinde (480 nm) yüksek moleküler sönmülenme katsayısına sahip bir KN olduğundan seçilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Invitrogen kuantum noktacıklarının absorbands ve emisyon eğrileri

3.2 Lüsiferaz (LF)

Işık proteini olarak *Renilla reniformis* Lüsiferaz (RLus; Renilla Lus.; Renilla-Lüsiferin 2-monooksijenaz) kullanılacaktır. Renilla Lus'un moleküler ağırlığı yaklaşık 36 kDa'dır. Protein sekans bilgisi aşağıda verilen (P27652, UniProt) detaylı karakterize edilmiş bir enzimdir. Enzim, substratı olan sölenenterazinin oksidasyon reaksiyonunu katalizleyerek 400-600 nm (maksimum 480 nm) aralığında foton emisyonu sağlayan bir ışık proteindir.

Renilla-luciferin (2-monooxygenase) amino asit sekansı:

MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLW
RHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHDWGA



CLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKGMVLENNFFVETML
PSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASD
DLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMKGKIKSFVERVLKNE
Q

3.3 DNA Bağlanıcı Proteinler (DBP) ve Tepki Elemanları (TE)

Platformun DNA bağlanıcı protein bileşenlerinden CDC, östrojen reseptörünün DNA'ya bağlanıcı protein kısmı olan bir proteindir (Huang vd., 2004). Gal4 ise *Saccharomyces cerevisiae* organizmasında, galaktoz kullanımından sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür . CDC'nin spesifik olarak tanıdığı Tepki Elemanı dizilimi GGTCCTCTGACC, Gal4 tepki elemanı dizilimi ise CGGAGTACTGTCCTCCG şeklindedir.

3.4 Nano-Tag (NT9)

Platformun kuantum noktacığın kolunu, streptavidin kaplı kuantum noktacığın monte etmek amacıyla 9 amino asitten oluşan (DVEAWLGER) Nano-Tag peptidi kullanılmıştır.

3.5 Bağlayıcı (BC)

DBP'lerin Lüsiferaz ve KN'ye bağlandıklarında ortaya çıkabilecek sterik çarpışmaları önlemek ve proteinlerin fonksiyonları için temel teşkil eden 3 boyutlu doğal yapılarını korumaları için gerekli ara uzaklığı sağlamak amacıyla GGSGGGSGGS amino asit dizilimine sahip bir polipeptid kullanılmıştır.

3.6 DNA İskelesi

Proje kapsamında DBP'lerin bağlanacağı tepki elemanlarını aralarındaki uzaklık 5, 20 ve 20 baz çifti olacak şekilde taşıyan üç farklı tip DNA iskelesi oluşturulmuştur.

3.7 Klonlama Çalışmaları

In vitro platformun protein bileşenlerinin propagasyonu için pSB1K3, ekspresyonu içi ise pET28a vektörleri kullanılmıştır. *In situ* platform bileşenleri ise bir memeli hücre ekspresyon vektörü olan pCDNA3.1'e aktarılmıştır. DNA amplifikasyonu hedef dizilimlere yönelik uygun primerler içeren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yoluyla gerçekleştirilmiş, DNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri düşük hacimli spektrofotometre, validasyon ise Agaroz Jel Elektroforezi ve DNA dizileme yoluyla sağlanmıştır. Klonlama çalışmalarının kesme ("restriction digestion") ve birleştirme ("ligation") aşamalarında, standart klonlama protokolleri uygulanmıştır. Plazmid izolasyonu için Promega Midi-Prep plazmid izolasyon seti kullanılmıştır. Vektörlerin transformasyonu Rubidyum klorür prosedürüyle hazırlanan kompetan bakteri hücrelerine standart transformasyon metodlarıyla gerçekleştirilmiştir. *In situ*

platform vektörleri MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına lipofektamine (Thermo Fisher) transfeksiyon setiyle aktarılmıştır.

3.8 Protein Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları

Protein ekspresyonu için bakteriyel ekspresyon vektörü olan pET28a vektörü içerisinde klonlanan parçalar, bir çoğaltma (propagasyon) suşu olan *E. coli* XL1 Blue içerisinde çoğaltılmış ve takibinde plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidler bir bakteriyel ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21 DE3 Star içerisine transforme edilmiştir. Transformasyonu yapılan bakteri kültürleri uygun antibiyotik içeren besi ortamında üretilerek farklı IPTG indükleme konsantrasyonları (0 – 1 mM arası), sıcaklık (37 ve 18 C) ve indükleme sonrası inkübasyon zamanları (3, 5, 18 saat) test edilmiştir. Bu bakteri kültürlerinden elde edilen hücreler sonikasyon yoluyla parçalanarak hem çözümlü (soluble) hem de çözünmez (insoluble) hücre lizatlarının protein ekspresyon miktarları SDS-PAGE metoduyla kıyaslamalı olarak belirlenmiştir. Yüksek ekspresyon sağlayan kültür koşulları, daha yüksek hacimde bakteri kültürü üretiminde kullanılarak protein saflaştırma aşaması için hazırlık yapılmıştır. Saflaştırma aşamasında öncelikle hücreler sonikasyon yoluyla parçalanmış ve santrifüj yapılmıştır. Elde edilen hücre lizatı denatüre edici olmayan (native) koşullarda saflaştırma etiketine uygun afinite kolonlarına (GE Healthcare streptavidin ve HisTag) yüklenmiştir. Tampon çözeltileri, akış hızı ve gradyan parametreleri tedarikçinin talimatları doğrultusunda ayarlanmıştır. In Vitro Translasyonu için “Promega TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation” paketi üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

3.9 In Situ BRET Platformu Sinyali Ölçümü

Vektör transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler kuyucuk başına 25.000 hücre düşecek şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Örneklere ve uygun kontrollere 10 nM kuantum noktacığı uygulandıktan sonra hücreler 18 saat 37 C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası uygun kuyucuklara 10 µM sölenterazin eklenmiş ve Molecular Devices Paradigm plaka okuyucu cihazında TUNE marka kartuş kullanılarak 24°C’de, spektrum tarama modunda (400-700 nm) lumisenans sinyal ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 400-600 nm (lusiferaz emisyonu) ve 600-700 nm (kuantum noktacığı emisyonu) arası piklerin alanları hesaplanarak bulgular bölümünde sunulan relatif luminesans şiddeti grafikleri oluşturulmuştur. Toplam kuantum noktacığı (alıcı) emisyonunun toplam lusiferaz (donör) emisyonuna bölünmesi ile BRET oranı hesaplanmıştır.

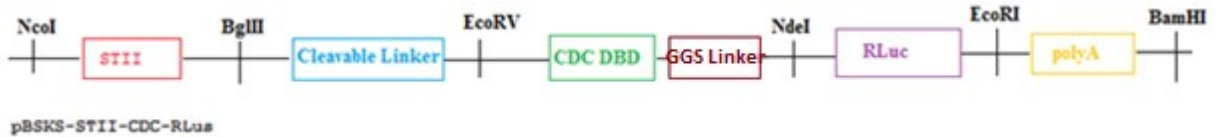
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Klonlama Çalışmaları

Şekil 1'de özetlendiği gibi BRET biyosensör platformu üç ana bileşenden (LF kolu, KN kolu ve DNA iskelesi) oluşmaktadır. Bu iş paketinde, üç ana bileşenin elde edilmesine yönelik klonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. LF ve KN kollarının DNA iskelesine bağlanmasında CDC ve Gal4 DNA Bağlanıcı Proteinler (DBP) kullanılmıştır. CDC, östrojen reseptörünün DNA'ya bağlanıcı protein kısmı olan bir proteindir (Huang vd., 2004). Gal4 ise *Saccharomyces cerevisiae* organizmasında, galaktoz kullanımından sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Tepki Elemanları da (TE) bu iki DBP'ye uygun şekilde seçilmiştir. Proje süresince farklı dönemlerde, LF ve KN kollarının ekspresyon sonrası saflaştırılması amacıyla StrepTagII (STII), 6XHis ve NT9 etiketli versiyonları klonlanmıştır. Parçaların klonlamaları, sekanslama kolaylığı sağlaması açısından önce bir ara vektör olan pBSKS içerisine yapılmış ardından genel bir bakteri ekspresyon vektörü olan pET28a plasmidine taşınmıştır. Klonlama çalışmalarının detayları aşağıda verilmektedir.

4.1.1 Lüsiferaz Kolu Klonlaması

Platformun Lüsiferaz enzim bileşenini DNA üzerine monte edecek olan LF kolunu (Şekil 9) oluşturan bileşenler standart klonlama metodları kullanılarak bir araya getirilmiştir.

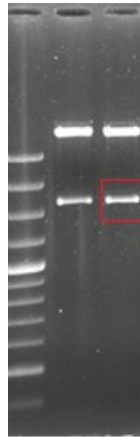


```
CCATGGATTGGTCTCACCCGCAATTCGAGAAGAGATCTGACGATGATGACAAGCGATCG
GAGACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTG
GTCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAACGACTATA
TGTGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAACAGGAGGAAGAGCTGCCAGGC
CTGCCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGAAAGGTGGGATACGAAAAGAC
CGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAGAGAGATGATGGGGAGGGCAGG
GGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCA
TGATCAAACGCTCTAAGCTTGAGACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTCA
GGCTACCATTATGGAGTCTGGTCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTAT
TCAAGGACATAACGACTATATGTGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAACA
GGAGGAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGA
```

AAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGAGGAGGGCATATGGGAGGCAGTACTTCGAAAGT
TTATGATCCAGAACAAAGGAAACGGATGATAACTGGTCCGCAGTGGTGGGCCAGATGTA
AACAAATGAATGTTCTTGATTCATTTATTAATTATTATGATTCAGAAAAACATGCAGAAAAT
GCTGTTATTTTTTACATGGTAACGCGGCCTCTTCTTATTTATGGCGACATGTTGT
GCCACATATTGAGCCAGTAGCGCGGTGTATTATACCAGACCTTATTGGTATGGGCAAAT
CAGGCAAATCTGGTAATGGTTCTTATAGGTTACTTGATCATTACAAATATCTTACTGCATG
GTTTGAACCTTCTTAATTTACCAAAGAAGATCATTTTTGTCGGCCATGATTGGGGTGCTTG
TTTGGCATTTCATTATAGCTATGAGCATCAAGATAAGATCAAAGCAATAGTTCACGCTGA
AAGTGTAGTAGATGTGATTGAATCATGGGATGAATGGCCTGATATTGAAGAAGATATTGC
GTTGATCAAATCTGAAGAAGGAGAAAAAATGGTTTTGGAGAATAACTTCTTCGTGGAAAC
CATGTTGCCATCAAAAATCATGAGAAAGTTAGAACCAGAAGAATTTGCAGCATATCTTGA
ACCATTCAAAGAGAAAGGTGAAGTTCGTCGTCCAACATTATCATGGCCTCGTGAAATCC
CGTTAGTAAAAGGTGGTAAACCTGACGTTGTACAAATTGTTAGGAATTATAATGCTTATC
TACGTGCAAGTGATGATTTACCAAAAATGTTTATTGAATCGGACCCAGGATTCTTTTCCA
ATGCTATTGTTGAAGGTGCCAAGAAGTTTCCTAATACTGAATTTGTCAAAGTAAAAGGTC
TTCATTTTTCGCAAGAAGATGCACCTGATGAAATGGGAAAATATATCAAATCGTTCGTTG
AGCGAGTTCTCAAAAATGAACAAGAATTC**TAATAA**GGATCC

Şekil 9. Lüsiferaz kolunu oluşturan DNA bileşenleri ve 1638 baz çiftinden oluşan parçanın dizilim bilgisi.

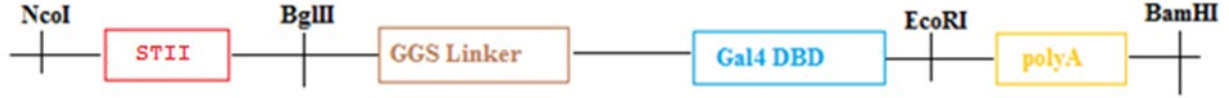
Oluşturulan yapıyı taşıyan pET28a vektörü uygun enzimlerle kesilerek LF kolunu içerdiği teyit edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. pET28a vektöründen kesilen LF kolunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kare içerisinde alınmış bant yaklaşık 1600 baz çifti uzunluğundadır.

4.1.2 Kuantum Noktacığı Kolu Klonlaması

Platformun streptavidin kaplı Kuantum Noktacığı (KN) bileşenini DNA üzerine monte edecek olan KN kolunu (Şekil 11) oluşturan bileşenler standart klonlama metodları kullanılarak bir araya getirilmiştir. Streptavidin kaplı KN, Invitrogen firmasından sipariş edilerek temin edilmiştir.

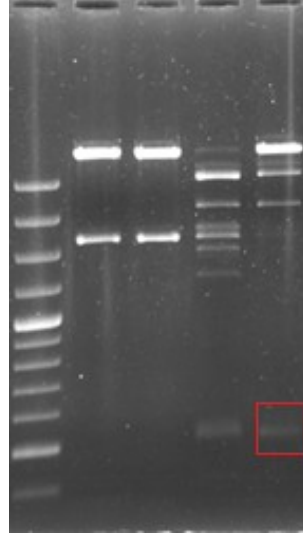


pBS-STII-Gal4

```
CCATGGATTGGTCTCACCCGCAATTCGAGAAGAGATCTGGAGGAGGCAAGCTACTGTC
TTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAA
ACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAAGTGGGAGTGTCGCTACTCTCCCAAACC
AAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAATCAAGGCTAGAAAGACT
GGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGA
TTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAA
GATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACA
GCATAGAATAAGTGCGACATCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGT
TGA CTGTATCGGAATTC TAATAAAGGATCC
```

Şekil 11. KN kolunu oluşturan DNA bileşenleri ve 504 baz çiftinden oluşan parçanın dizilim bilgisi.

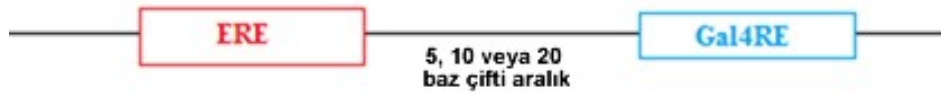
Oluşturulan yapıyı taşıyan pET28a vektörü uygun enzimlerle kesilerek KN kolunu içerdiği teyit edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. pET28a vektöründen kesilen KN kolunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kare içerisinde alınmış bant yaklaşık 500 baz çifti uzunluğundadır.

4.1.3 DNA İskelesi Klonlaması

LF ve KN kollarının DBP bileşenleri, özel olarak tanıdıkları DNA dizilimleri olan Tepki Elemanları (TE) yoluyla DNA iskelesi üzerine monte edilecektir. Çalışmada kullanılan CDC ve Gal4 DBP'lerinin bağlandığı TE'ler olan ERE ve Gal4RE, aralarında 5, 10 veya 20 baz çifti mesafe konularak üç farklı şekilde pGL3 vektörü içerisinde klonlanmıştır (Şekil 13).



GGTCACTCTGACC (TGGGA)_{x1, x2 veya x4} CGGAGTACTGTCCTCCG

Şekil 13. CDC ve Gal4 DBP'lerinin bağlandığı tepki elemanlarını içeren DNA segmenti

4.2 Protein Ekspresyon ve Saflaştırılma Çalışmaları

Bir önceki bölümde klonlaması gerçekleştirilen LF ve KN kollarının protein ekspresyon ve saflaştırma sonuçları bu bölümde sunulmaktadır.

4.2.1 Lüsiferaz Kolu Ekspresyonu

Lüsiferaz kolunun verimli bir şekilde üretimi ve saflaştırılması amacıyla projenin farklı dönemlerinde dört ayrı üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan üçü STII, NT9 ve 6XHis saflaştırma etiketlerini içeren versiyonlar kullanılarak yapılmış, sonuncu çalışmada ise 6XHis etiketi içeren vektör bir In Vitro Translasyon (IVT) sisteminde (Promega Quick Coupled Transcription/Translation System) kullanılmıştır. Farklı üretim stratejilerinin ve ekspresyon koşullarının denenmesine rağmen aşağıda sonuçları sunulan STII etiketli çalışmadan elde edilen sonuçlar iyileştirilememiş ve buna bağlı olarak saflaştırma çalışmalarına geçilmemiştir.

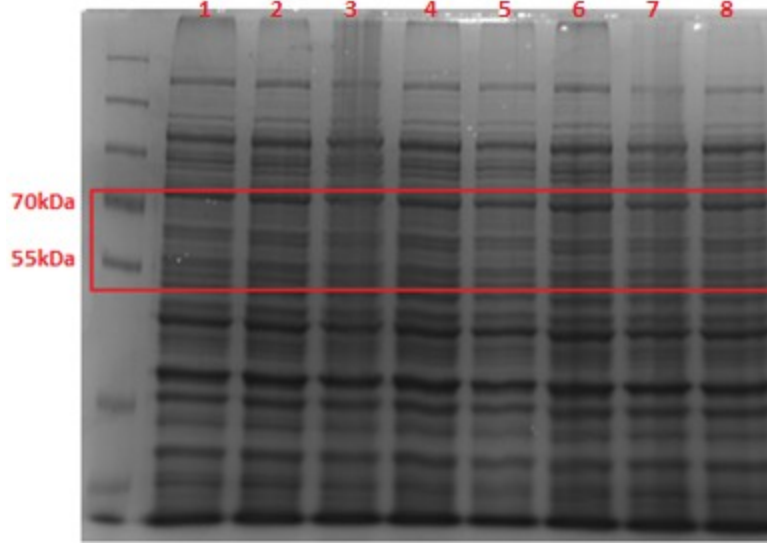
541 amino asitlik (~58 kDa) STII-CDC-RLus proteini (Şekil 14) aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.



MDWSHPQFEKRSDDDDKRSetryCAVCNDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDY
MCPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDDGEGR
GEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKLETRYCAVCNDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQ
GHNDYMCPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGHMGGSTSKVYD
PEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVPHIE
PVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHWDGACLAFHYSY
EHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKL
PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDLPMFIES
DPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVGLHFSQEDAPDEMKGKYSFVERVLKNEQEF

Şekil 14. LF kolunu oluşturan protein bileşenleri ve parçanın protein dizilimi

Yukarıda dizilim detayları verilen LF kolunu içeren bakteri kültürünün IPTG indüksiyonu ve indüksiyon sonrası inkübasyonunu takiben sonikasyon ile hücre parçalaması yapılmış ve elde edilen hücre lizatı SDS-PAGE sistemine yüklenerek ekspresyon kontrol edilmiştir. Şekil 15'de görüldüğü gibi IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen (negatif kontrol) örnekler arasında 58 kDa olarak beklenen protein bantı açısından bir fark gözlenmemektedir.



Şekil 15. LF kolunun PAGE görüntüsü. 1: indüksiyonsuz, 2: 37°C 1 saat indüksiyon, 3: 37°C 2 saat indüksiyon, 4: 37°C 4 saat indüksiyon, 5: indüksiyonsuz, 6: 24°C 1 saat indüksiyon, 7: 24°C 2 saat indüksiyon ve 8: 24°C 4 saat indüksiyon.

4.2.2 Kuantum Noktacığı Kolu Ekspresyonu

Lusiferaz kolunun üretimine paralel yürütülen KN kolu çalışmalarında da STII, NT9 ve 6XHis saflaştırma etiketlerini içeren versiyonlar ve 6XHis etiketi içeren vektörle In Vitro Translasyon (IVT) sistemi kullanılmıştır. LF koluna nispeten daha iyi sonuçlar elde edilen KN kolu üretim çalışmalarında en yüksek verime STII etiketiyle ulaşılmış ve kısmi bir başarı sağlanmıştır.

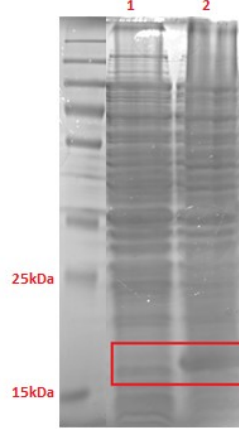
163 amino asitlik (~17 kDa) STII-Gal4 proteini (Şekil 16) aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.



MDWSHPQFEKRSGGGKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKR
SPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTD
RLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSEF

Şekil 16. KN kolunu oluşturan protein bileşenleri ve parçanın protein dizilimi.

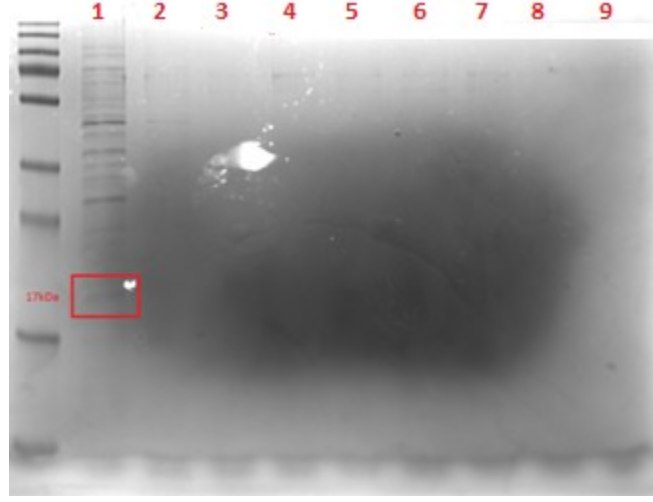
Sekans bilgileri verilen KN kolunun ekspresyon profili aşağıda verilmektedir (Şekil 17). Beklendiği gibi IPTG indüksiyonlu örnekteki kalın 17 kDa'luk bant, KN kolunun başarılı ekspresyonuna işaret etmektedir.



Şekil 17. KN kolunun IPTG indüksiyonsuz (1) ve indüksiyonlu (2) hücre lizatlarının SDS-PAGE görüntüsü.

4.2.3 Kuantum Noktaçığı Kolu Safaştırması

STII saflaştırma etiketi içeren Kuantum Noktaçığı kolunun pürifikasyonu amacıyla bu etikete bağlanan streptavidin kolonları GE Healthcare firmasından temin edilmiş ve üreticinin tavsiye ettiği yükleme, yıkama ve elüsyon prosedürlerine göre kullanılmıştır. Şekil 18'de görüldüğü gibi KN kolunu oluşturan protein, kolon yüklemesi sırasında streptavidine bağlanmadan kolondan akmış ve bu nedenle saflaştırılması mümkün olmamıştır. Kullanılan tampon solüsyonları ve pH'ta yapılan değişiklikler sonucu değiştirmemiştir. Proteinin üç boyutlu yapısının kolona bağlanmaya olumsuz etkisi olabileceği düşünülerek örneklere üre katılarak denatüre edici koşullarda saflaştırma çalışmaları da sonuç vermemiştir.



Şekil 18. Kuantum Noktacığı kolu olan STII-Gal4'un streptavidin saflaştırma kolonu uygulamasından elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. 1: Kolona yükleme, 2: Yıkama I, 3: Yıkama II, 4: Yıkama III, 5: Yıkama IV, 6: Yıkama V, 7: Elüsyon I, 8: Elüsyon II ve 9: Elüsyon III.

In vitro BRET platformu için gerekli LF ve KN kollarının üretim aşamasındaki sorunlar nedeniyle projeye yeni bursiyerler dahil edilerek alternatif DNA bağlanıcı proteinlerin (Zif268 ve PBSII) klonlanma çalışmaları başlatılmış fakat denemeler olumlu bir sonuç sağlamamıştır. Bunun üzerine EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) deneylerini içeren DNA Bağlanma Çalışmaları iş paketine geçilmemiş ve platform oluşturma stratejisi yenilenerek *in situ* (hücre içi) kapsama taşınmıştır.

4.3 *In Situ* BRET Platformu

Oluşturulması amaçlanan BRET platformunun protein bileşenlerinin yeterli miktarda üretiminin mümkün olmamasına üzerine alternatif bir çözüm olarak tüm platform bileşenlerini hücre içerisinde (*in situ*) bir araya getirme stratejisi uygulamaya konulmuştur. Bu yaklaşımın sağladığı en büyük avantaj, hücre tarafından üretimi yapılacak olan protein bileşenlerinin saflaştırma gerektirmeden doğrudan hücre içerisinde diğer platform bileşenleriyle etkileşime girme imkanı sağlamasıdır.

In situ çalışmaları kapsamında öncelikle platformun protein bileşenlerinin (lusiferaz ve kuantum noktacığ kolları) ve DNA iskelesinin bir memeli hücre ekspresyon vektörü olan pCDNA3.1'e klonlaması yapılmıştır. Lusiferaz kolunu içeren vektöre *in vitro* çalışmalarındaki benzer şekilde CDC (DNA Bağlanıcı Protein), bağlayıcı bölge ve lusiferaz enzimini kodlayan genler yerleştirilmiştir. İkinci vektör (DNA iskelesi) CDC ve Gal4'un bağlanma bölgelerini taşımak amacıyla bölgeler arasında 10 baz çifti uzunluğunda bir aralık

olacak şekilde hazırlanmıştır. Üçüncü ve son vektöre de NanoTag, bağlayıcı bölge ve Gal4 (DNA Bağlanıcı Protein) genleri yerleştirilmiştir. Klonlama çalışmaları ardından oluşturulan üç vektörün ve boş vektörlerin (negatif kontroller) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Uygun kolonilerin seçimi ardından BRET sinyal ölçümleri yapılmıştır (Şekil 19). Lusiferaz aktivitesi 400-600 nm arası limünesans emisyon eğrisinin alanı olarak hesaplanmıştır (Şekil 19 A). Bu aralıkta yapılan emisyonun BRET transferi sonucu kuantum noktacığın uyarmasıyla elde edilen 600-700 nm arası eğri altındaki alan da kuantum noktacığ emisyonunu göstermektedir. Ölçümler, platformun tüm bileşenlerinin bir araya getirildiği örnek (P) ve bileşenlerden birinin sırayla çıkarıldığı kontroller (P-çıkarılan bileşenin kısaltılması) üzerinde yapılmıştır. Platform ve kontrol bileşenleri şu şekildedir:

P: Tüm bileşenleri içeren BRET platformu. (Lusiferaz Kolu + DNA İskelesi + Kuantum Noktacığı Kolu) + Kuantum Noktacığı + Sölenlerazin

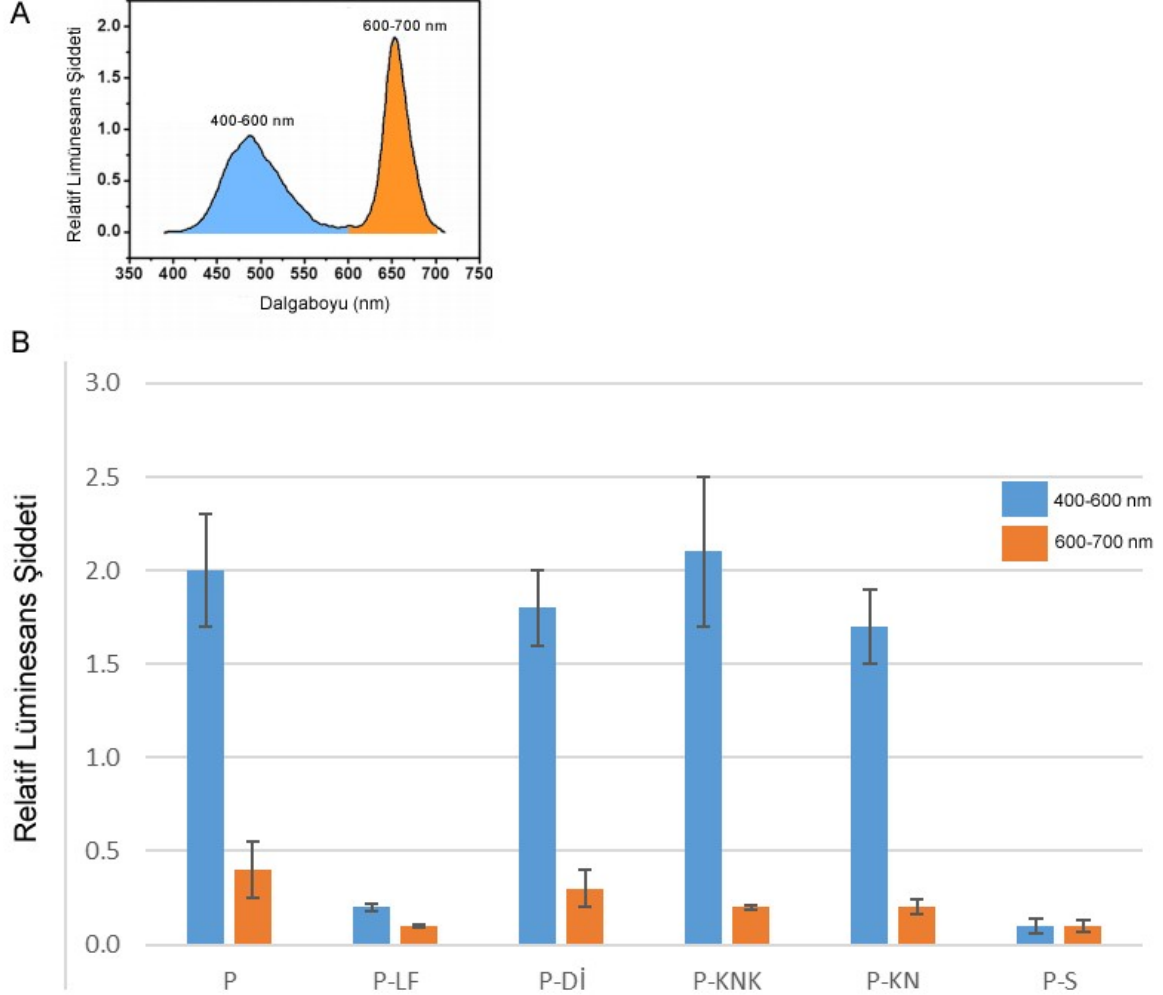
P-LF: Lusiferaz kolunun çıkarıldığı kontrol. (Boş Vektör + DNA İskelesi + Kuantum Noktacığı Kolu) + Kuantum Noktacığı + Sölenlerazin

P-Dİ: DNA iskelesinin çıkarıldığı kontrol. (Lusiferaz Kolu + Boş Vektör + Kuantum Noktacığı Kolu) + Kuantum Noktacığı + Sölenlerazin

P-KNK: Kuantum Noktacığı kolunun çıkarıldığı kontrol. (Lusiferaz Kolu + DNA İskelesi + Boş Vektör) + Kuantum Noktacığı + Sölenlerazin

P-KN: Kuantum Noktacığı eklenmeyen kontrol. (Lusiferaz Kolu + DNA İskelesi + Kuantum Noktacığı Kolu) + Sölenlerazin

P-S: Sölenterazın eklenmeyen kontrol. (Lusiferaz Kolu + DNA İskelesi + Kuantum Noktacığı Kolu) + Kuantum Noktacığı



Şekil 19. In situ BRET platformu lüminesans ölçüm grafiği. A) Lusiferaz enzim aktivitesi ve kuantum noktacığı emisyonunu gösteren dalga boyu eğrileri mavi ve turuncu renklerle gösterilmiştir. B) BRET platformu (P) ve platform bileşenlerinden birinin çıkarıldığı kontrollerden elde edilen lusiferaz ve kuantum noktacığı emisyon eğrisi alan değerleri. Ölçümler üç bağımsız deneyin averajı ve averajın standart hatası (SEM) olarak gösterilmiştir.

Relatif lüminesans şiddeti grafiğinden de görüldüğü gibi BRET platform bileşenleri beklenen şekilde fonksiyonlarını gerçekleştirmiştir. Lusiferaz kolunun (P-LF) ve lusiferaz substratı olan sölenterazının eklenmediği (P-S) kontrollerden önemli sayılabilecek bir lüminesans sinyali



(400-600 nm) alınmamıştır. Buna bağlı olarak bu kontrollerden alınan kuantum noktacığın emisyonu da (600-700 nm) çok düşüktür. Sonuç olarak platformun lusiferaz ile ilgili fonksiyonları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

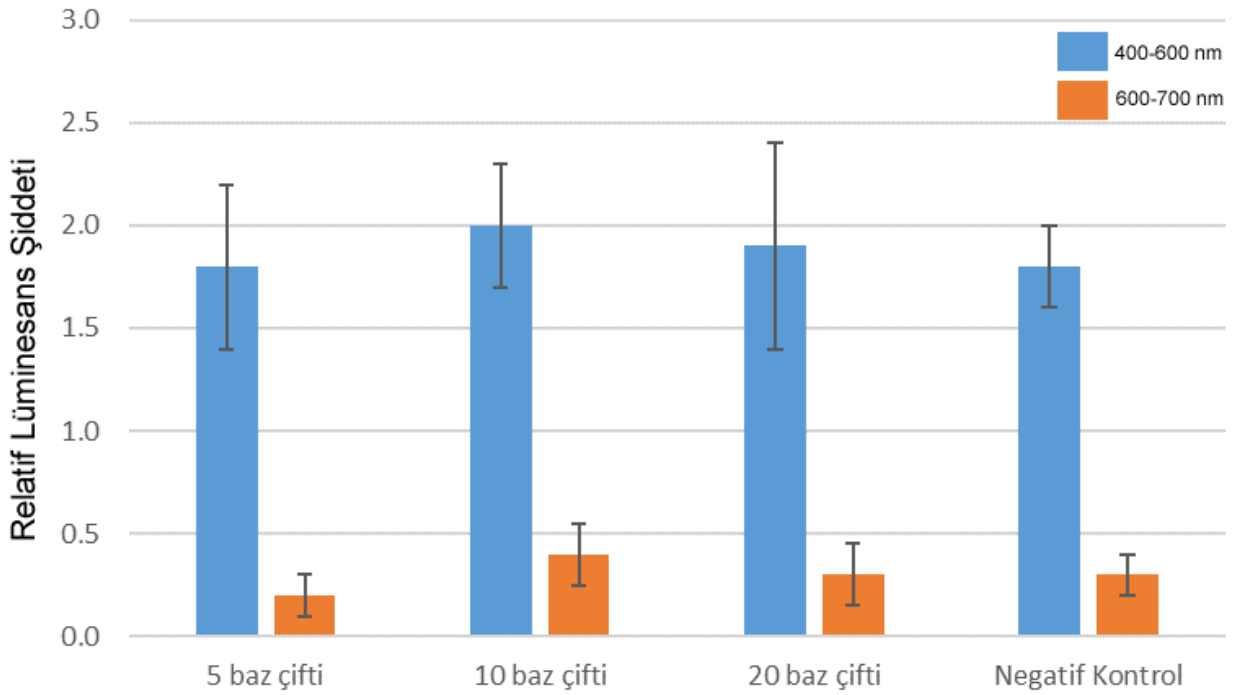
Şekilde gösterilen DNA iskelesi içermeyen kontrolden (P-Dİ) alınan kuantum noktacığın emisyon (600-700 nm) değeri 0.3 ± 0.1 'dir. Kuantum noktacığın kolu ve kuantum noktacığın içermeyen kontrollerden (P-KNK ve P-KN) elde edilen emisyon değeri 0.2 ± 0.04 'tür. Tüm bileşenleri içeren BRET platformunun 600-700 nm emisyon değeri de 0.4 ± 0.15 olarak kaydedilmiştir. Platformdan elde edilen kuantum noktacığın sinyalinin negatif kontrollerden daha yüksek oluşu, projede amaçlanan lusiferaz-kuantum noktacığın rezonans enerji transferinin gerçekleştiğine işaret etmektedir. Öte yandan elde edilen fark, ANOVA testiyle istatistiksel açıdan analiz edildiğinde önemli sayılabilecek kadar yüksek gözükmemektedir. Kuantum noktacığın elde edilen toplam emisyon, lusiferazdan elde edilene bölünerek BRET oranı 0.2 olarak hesaplanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslaması yapıldığında özellikle rezonans enerji transferinin veriminin bir ölçütü olan BRET oranı açısından iyileştirmeye ihtiyacımız olduğu görülmektedir. Rao ve ark. kurdukları BRET sistemlerinde 0.3 - 0.6 arası BRET oranları elde etmişlerdir. Bununla beraber Rao'nun rapor ettiği sistem de dahil olmak üzere literatürdeki benzeri BRET sistemleri ana bileşenlerin kovalent olarak bağlanması prensibine dayalıdır. Projemizde yer alan platform, planlanmış moleküler interaksiyonlar yoluyla kendiliğinden bir araya gelme (self-assembling) stratejisine göre tasarlandığından çok daha zor bir hedefi başarmayı amaçlamıştır. Bu nedenle BRET veriminin kovalent olarak bağlanmış sistemlere göre daha düşük olması kabul edilebilir bir sonuçtur.

Platformun rezonans enerji transferi veriminin düşük olması bileşenler arası uzaklığın yüksek oluşu (10 nm üstü), DNA iskelesi üzerindeki montaj sırasında ortaya çıkan yapısal uyumsuzluklar (sterik çarpışmalar), sistem bileşenlerinin hücre içi stabilitelerinin düşük olması, hücre içerisinde platform bileşenleriyle etkileşime giren moleküller ve kuantum noktacıklarının hücre girişinde endozomlarda hapis kalarak sitoplazmadaki diğer platform bileşenleriyle bir araya gelememesi gibi sebeplere bağlı olabilir. Listelenen problemler arasında bileşenler arası uzaklığın ideal olmayışının en güçlü ihtimal olduğuna karar verilmiştir. Çalışmanın bir sonraki bölümü olan optimizasyon iş paketinde, lusiferaz ve kuantum noktacığın bileşenleri arası uzaklığın BRET verimine etkisi araştırılmıştır.

4.3.1 *In Situ* BRET Platformu Optimizasyon Çalışmaları

BRET platformundan elde edilen kuantum noktacığın emisyon sinyalinin ve buna bağlı BRET oranının artırılması amacıyla platform bileşenleri arası uzaklığın değiştirildiği iki yeni DNA iskelesi oluşturulmuş ve test edilmiştir. Bunlardan ilki, lusiferaz enzimini DNA'ya montajlayan DNA bağlanıcı proteinin (CDC) spesifik olarak tanıdığı tepki elemanı dizilimiyle kuantum noktacığın montajında kullanılan DNA bağlanıcı proteinin (Gal4) tepki elemanı arası uzaklığın 5 baz çiftine düşürüldüğü iskeledir. Klonlaması yapılan diğer iskelede ise tepki elemanları arası uzaklık 20 baz çiftine çıkartılmıştır. Mesafe ayarlamasının BRET sinyaline etkisini anlayabilmek amacıyla bir önceki bölümde rapor edilen sonuçların eldesinde kullanılan 10 baz çiftlik iskele de referans amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Bu üç DNA iskelesinin ve iskele içermeyen boş vektörün (negatif kontrol) kullanıldığı BRET platformlarından elde edilen sonuçlar Şekil 20'de özetlenmektedir.



Şekil 20. *In situ* BRET platformu bileşenlerinden CDC ve Gal4 tepki elemanları arası uzaklığın lüminesans sinyaline etkisi. Ölçümler üç bağımsız deneyin averajı ve averajın standart hatası (SEM) olarak gösterilmiştir.

Ölçümler arasındaki deneysel hata oranının yüksek (%10-30) oluşu istatistiksel açıdan güvenilir bir kıyaslama yapılmasını olumsuz etkilemesine rağmen, en yüksek kuantum noktacığın emisyonu tepki elemanları arası uzaklığın 10 baz çifti olduğu DNA iskelesinden



elde edilmiştir (0.4 ± 0.15). Uzaklığın 5 baz çiftine düşürülmesi veya 20 baz çiftine çıkartılması toplam emisyonda bir artış sağlamamıştır. Bu gözlem, rezonans enerji transferi veriminin ağırlıklı olarak bir önceki bölümde belirtilen parametrelere bağlı olabileceğine işaret etmektedir.

5. SONUÇ

Bir ilke ispatı niteliğindeki bu proje kapsamında, Lusiferaz-Kuantum Noktacığı BRET sensör bileşenleri moleküler kendiliğinden düzenlenme prensibine dayanarak DNA Bağlanıcı Proteinler yoluyla bir DNA iskelesi üzerinde bir araya getirilmiş ve Lusiferaz-kuantum noktacığı arasında rezonans enerji transferi sağlanmıştır.

Platformdan elde edilen ve enerjii transfer veriminin bir ölçütü olan BRET oranı literatürde kovalent bağ ile oluşturulan sistemlere göre daha düşüktür. Enerji transferi sağlayan bileşenler arasındaki uzaklığın değiştirilmesi verimi artırmamıştır. Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalar kapsamında platformun iki temel strateji yoluyla geliştirilmesi planlanmaktadır. Bunlardan ilki hücre içerisine endositoz ile alınan kuantum noktacıklarının endozomlar içinde hapis kalarak hücre sitoplazmasındaki platform bileşenlerine erişim sağlayamama ihtimaline karşın, kuantum noktacıkları üzerinde, endozomlardan kaçabilme fonksiyonu kazandıracak biyomodifikasyonlar gerçekleştirmektir. Planladığımız diğer geliştirme stratejisi ise platform bileşenlerini lineer bir DNA iskelesi üzerinde bir araya getirmek yerine geometrik olarak çok daha fazla sayıda etkileşim sağlama potansiyeli olan üç boyutlu bir DNA iskelesi kurmaktır. Literatürdeki DNA origami çalışmalarının bahsi geçen üç boyutlu DNA iskelelerinin oluşturulabilmesi için gerekli teknik bilgiyi sağlayabileceği düşünülmektedir.

Önerilen proje, nanobiyoteknoloji alanında yeni gelişmeler sağlayabilecek bir prensip ispatı olmasının yanı sıra DNaz ve metilaz gibi bir takım DNA modifiye edici enzimlerin varlığını ve aktivitelerini çok hassas RET sinyalindeki değişimlere dayanarak belirleyecek biyonosensörlerin geliştirilmesine olanak sağlayacak bir uygulama potansiyeline de sahiptir.

Proje kapsamında bir doktora, beş yüksek lisans ve iki lisans öğrencisi bursiyer olarak desteklenerek rekombinant protein üretimi ve biyosensörler alanında eğitim almışlardır. Proje kapsamında bir yüksek lisans tezi tamamlanmış, bir doktora tezi de devam etmektedir. Projenin *in situ* platforma taşınması özgün değerini artırmış, bu nedenle fikri hakların korunabilmesi için yayınlanmadan önce ek deneysel verilerle güçlendirilerek patent veya faydalı model başvurusu yapılmasına karar verilmiştir. Proje aynı zamanda yeni bir ar-ge



projesi oluşturulmasını da sağlamıştır. Ekibimiz tarafından, *in situ* BRET sensör platformuna dayalı bir uygulama proje önerisi hazırlığı yapılmaktadır.

Referanslar:

- AKERMAN, M. E., Chan, W. C. W., Laakkonen, P., Bhatia, S. N., Ruoslahti, E., Nanocrystal targeting in vivo, *Applied Biological Sciences*, 99, 20, 12617-12621, (2002).
- ALBERTS, B., *Molecular biology of the cell*, New York: Garland Science, (2002).
- ALIVISATOS, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P., Jr., Schultz, P. G., Organization of nanocrystal molecules using DNA, *Nature*, 382, 609–611, (1996).
- CHOI, Y., Mecke, A., Orr, B. G., Holl, M. M. B., Baker, J. R., DNA-directed synthesis of generation 7 and 5 PAMAM dendrimer nanoclusters, *Nano Letters*, 4,3, 391-397, (2004).
- CONRADO, R. J., Wu, G. C., Boock, J. T., Xu, H., Chen, S. Y., Lebar, T., Turnsek, J., Tomsic, N., Avbelj, M., Gaber, R., Koprivnjak, T., Mori, J., Glavnik, V., Vovk, I., Bencina, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Dueber, J. E., Jerala, R., DeLisa, M. P., DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency, *Nucleic Acid Researches*, 40, 4, 1879-1889, (2012).
- CROOKER, S. A., Hollingsworth, J. A., Tretiak, S., Klimov, V. I., Spectrally resolved dynamics of energy transfer in Quantum-Dot assemblies: Towards engineered energy flows in artificial materials, *Physical Review Letters*, 89, 18, (2002).
- DAHAN, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., Triller, A., Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking, *Science*, 302, 442-445, (2003).
- DEMATTEI, C. R., Huang, B., Tomalia, D., A., Designed dendrimer syntheses by self-assembly of single-site, ssDNA functionalized dendrons, *Nano Letters*, 4,5, 771-777, (2004).
- DOE/Brookhaven National Laboratory, (2008), DNA-guided nanoparticle assembly, *Science Daily*, 4 Mart 2013 tarihinde <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/03/080313202938.htm> sitesinden alınmıştır.
- DUJARDIN, E., Hsin, L. B., Wang, C. R. C., Mann, S., DNA-driven self-assembly of gold nanorods, *Chem. Commun.* 1264-1265, (2001).
- EBENSTEIN, Y., Gassman, N., Kim, S., Antelman, J., Kim, Y., Ho, S., Samuel, R., Michalet, X., Weiss, S., Lighting up individual DNA binding proteins with quantum dots, *Nano Letters*, 4, 1598-1603, (2009).
- GAO, X., Yang, L., Petros, J. A., Marshall, F. F., Simons, J. W., Nie, S., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 63-72, (2005).
- GU, H., Chao, J., Xiao, S. J., Seeman, N. C., A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line, *Nature*, 465, 202-206, (2010).



- HSU, C. Y., Chen, C. W., Yu, H. P., Lin, Y. F., Lai, P. S., Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy, *Biomaterials*, 34, 1204-1212, (2012).
- HUANG, J., Li, X., Hilf, R., Bambara, R. A., Muyan, M., Targeting estrogen responsive elements (EREs): design of potent transactivators for ERE-containing genes, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218, 1-2, 65-78, (2004).
- Invitrogen Life Technologies, Qdot Nanocrystal Technology Overview, 4 Mart 2013 tarihinde <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Qdot/Technology-Overview.html?icid=fr-qdot-1#structure> sitesinden alınmıştır.
- ISRAELACHVILI, J. N., Mitchell, D. J., Nanham, B. W., Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 2, 72, 1525-1568, (1976).
- KAGAN, C. R., Murray, C. B., Nirmal, M., Bawendi, M. G., Electronic energy transfer in CdSe quantum dot solids, *Physical Review Letters*, 76, 9, 1517-1520, (1996).
- KOBAYASHI, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L., Urano, Y., New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging, *Chem. Rev.*, 110, 5, (2010).
- KREBS, J. E., Kilpatrick, S. T., Goldstein, E. S., *Lewin's genes X*, ed: Lewin B., Sudbury, Mass.: Jones ve Bartlett, United States of America, (2011).
- LEWIN, B., *Genes IX*, Sudbury, Mass.: Jones ve Bartlett, (2008).
- LI, X., Huang, J., Yi, P., Bambara, R. A., Hilf, R., Muyan, M., Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ER α / β heterodimer emulates functions of the ER α dimer in genomic estrogen signaling pathways, *Mol. Cell Biol.*, 24, 17, 7681-7694, (2004).
- LIDKE, D. S., Nagy, P., Heintzmann, R., Jovin, D. J. A., Post, J. N., Grecco, H. E., Erijman, E. A. J., Jovin, T. M., Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction, *Nature Biotechnology*, 22, 2, 198-203, (2004).
- MEDINTZ, I. L., Clapp, A. R., Brunel, F. M., Tiefenbrunn, T., Uyeda, H. T., Chang, E. L., Deschamps, J. R., Dawson, P. E., Mattoussi, H., Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates, *Nature Materials*, 5, 581-589, (2006).
- MICHALET, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S., Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics, *Science*, 307, 538-544, (2005).
- MICHELOTTI, N., Buck, A. J., Manzo, A. J., Walter, N. G., Beyond DNA origami: the unfolding prospects of nucleic acid nanotechnology, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4, 2, 139-152, (2012).



- MILAM, V. T., Hiddessen, A. L., Crocker, J. C., Graves, D. J., Hammer, D. A., DNA-driven assembly of bidisperse, micron-sized colloids, *Langmuir*, 19, 10317-10323, (2003).
- MIRKIN, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Storhoff, J. J., A DNA based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, 382, 607–609, (1996).
- MIRKIN, C. A., NIEMEYER, C. M., *Nanobiotechnology: Concepts, applications and perspectives*, Weinheim: Wiley-VCH, (2004).
- MIRKIN, C. A., NIEMEYER, C. M., *Nanobiotechnology II: More concepts and applications*, Weinheim: Wiley-VCH, (2007).
- MITCHELL, G. P., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots, *JACS*, 121, 35, 8122-8123, (1999).
- NIEMEYER, C. M., Koehler, J., Wuerdemann, C., DNA-directed assembly of bienzymic complexes from in vivo biotinylated NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase, *ChemBioChem*, 2, 3, 242-245, (2002).
- NIEMEYER, C. M., Sano, T., Smith, C. L., Cantor C. R., Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA—streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates, *Nucleic Acids Res.*, 22, 5530–5539, (1994).
- PARAK, W. J., Gerion, D., Zanchet, D., Woerz, A. S., Pellegrino, T., Micheel, C., Williams, S. C., Seitz, M., Bruehl, R. E., Bryant, Z., Bustamante, C., Bertozzi, C. R., Alivisatos, A. P., Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots, *Chem. Mater.*, 14, 2113-2119, (2002).
- PATOLSKY, F., Gill, R., Weizmann Y., Mokari, T., Banin U., Willnar I., Lighting-up the dynamics of telomerization and DNA replication by CdSe-ZnS quantum dots, *JACS*, 125, 13918-13919, (2003).
- PAVLETICH, N. P., Pabo, C. O., Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å, *Science*, New Series, 252, 5007, 809-817, (1991).
- PELESKO, J. A., *Self-assembly: the science of things that put themselves together*, New York: Chapman& Hall/CRC, 201, 242, 259, (2007).
- RHYNER, M. N., Smith, A. M., Gao, X., Mao, H., Yang, L., Nie, S., Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging, *Nanomedicine*, 1, 2, 209-217, (2006).
- ROTHEMUND, P.W.K., Folding DNA to create shapes and patterns, *Nature*, 440, 297-302, (2006).
- SEEMAN, N. C., Nucleic acid junctions and lattices, *Journal of Theoretical Biology*, 99, 237-247, (1982).



- SO, M. K., Xu, C., Loening, A. M., Gambhir, S. S., Rao, J., Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging, *Nature Biotechnology*, 24, 3, 339-343, (2006).
- SOTO, C. M., Srinivasan A., Ratna, B. R., Controlled assembly of mesoscale structures using DNA as molecular bridges, *JACS*, 124, 8508-8509, (2002).
- STRYER, L., Haugland, R. P., Energy transfer: a spectroscopic ruler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 2, 719-726, (1967).
- WILNER, O. I., Shimron, S., Weizmann, Y., Wang, Z. G., Willner I., Self-assembly of enzymes on DNA scaffolds: en route to biocatalytic cascades and the synthesis of metallic nanowires, *Nano Letters*, 9, 2040-2043, (2009).
- XIA, Z., Xing, Y., So, M. K., Koh, A. L., Sinclair, R., Rao, J., Multiplex detection of protease activity with quantum dot nanosensors prepared by intein-mediated specific bioconjugation, *Anal. Chem.*, 80, 8649-8655, (2008).
- YAN, H., Park, S. H., Finkelstein, G., Reif, J. H., LaBean, T. H., DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires, *Science*, 301, sayfa 1882–1884, (2003).
- YEZHELYEV, M. V., Al-Hajj, A., Morris, C., Marcus, A. I., Liu, T., Lewis, M., Cohen, C., Zrazhevskiy, P., Simons, J. W., Rogatko, A., Nie, S., Gao, X., O'Regan, R. M., In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots, *Advanced Materials*, 19, 3146-3151, (2007).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. CAN ÖZEN
Proje No:	113M158
Proje Başlığı:	Kuantum Noktacığı-Lüsiferaz Bret Çiftinin Dna Bağlanıcı Proteinler Kullanılarak Dna İskelesi Üzerinde Montajına Dayalı Bir Nanobiyosensör Platformunun Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	MESUT MUJAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2013 - 01/04/2016
Onaylanan Bütçe:	315800.0
Harcanan Bütçe:	280567.63
Öz:	<p>Bir ışık proteiniyle floresan molekül arasında gerçekleşen enerji transferi olarak tanımlanan Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET)?e dayanan biyosensör platformları proteaz aktivitesi ölçümü, nükleik asit tayini, lenfatik görüntüleme ve fotodinamik terapi gibi amaçlar için başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmalarda donör-alıcı ikilisi olarak birbirine kovalent bağ ile bağlanmış lüsiferaz-kuantum noktacığı bileşenleri kullanılmıştır.</p> <p>DNA molekülü sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel özellikleri açısından nanoteknolojik uygulamalar için ideal bir biyopolimer malzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Bu proje kapsamında moleküler kendiliğinden düzenlenme prensibine dayalı olarak BRET donör-alıcı ikilisi olan lüsiferaz-kuantum noktacığını, DNA bağlanıcı proteinler yoluyla bir DNA iskelesi üzerine monte etmek amaçlanmıştır. Alıcı molekül olarak streptavidin kaplı bir kuantum noktacığı kullanılarak, Nano-Tag peptidine bağlı bir DNA bağlanıcı protein yoluyla DNA iskelesi üzerinde konumlandırılmıştır.</p> <p>Proje, DNA bağlanıcı proteinler olan östrojen reseptör bileşeni CDC ve galaktoz metabolizmasından sorumlu Gal4 transkripsiyon faktörlerinin Renilla lüsiferaz enzimi ve Nano-Tag peptidiyle hazırlanan füzyon proteinlerinin üretimiyle başlamış, fakat yeterli miktarda protein sağlanamaması üzerine platform in situ (hücre içi) kapsama taşınmıştır. Sensör bileşenlerini taşıyan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu ilke prensibi ispatına dayalı platformdan BRET sinyali elde edilmiştir. Elde edilen sinyal verimi (BRET oranı 0.2) bileşenlerin kovalent bağlı olduğu sistemlere oranla (0.3-0.6) daha düşüktür.</p> <p>Oluşturulan nanobiyosensör platformu rezonans enerji transfer veriminin iyileştirilmesi durumunda, özellikle DNA bağlanıcı ve modifiye edici moleküllerin (DBPler, Dnazlar, DNA metilazlar, vb.) aktivitelerini belirlemekte kullanılabilecek uygulama potansiyeline sahiptir.</p>
Anahtar Kelimeler:	nanobiyoteknoloji, biyosensör, biyoluminesans rezonans enerji transferi, DNA, kuantum noktacığı
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır