

Stabil İzotop İşaretli İnsan DNA Onarım Protein Standartları ¹⁵N-hPARP1 ve ¹⁵N-hOGG1'in Üretimi

Biyoteknoloji ve Yaşam Bilimleri



Teknik Alan



Proteinler, canlı organizmaların ana yapı taşlarından biridir ve temel bilimlerden klinik araştırmalara kadar en sık kullanılan ölçümlerden biri, proteinlerin miktarlarının belirlenmesidir. Dokuların, organların veya hücrelerin içerisindeki proteinlerin hassas ve özgül bir şekilde ölçülmesi, bu proteinlerin yaşamsal fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda son derece kritiktir.

Üretimi gerçekleştirilecek ürünün ilgili olduğu kullanım alanları sağlık ve fen bilimi alanlarını (kütle spektrometre temelli ölçümler (MS), **DNA onarım proteinleri ölçüm yöntemleri**) kapsamaktadır. **Mevcut buluş, çeşitli kanser türleri ve diğer bazı hastalıklarda protein düzeyinde ekspresyonu değişiklik gösteren, tanı ve tedavide belirleyici rolleri olan DNA onarım proteinlerinden olan insan Poli[ADP-riboz] polimeraz 1'in (hPARP1) ve 8-oksoguanin-DNA glikozilazı'nın (hOGG1) kütle spektrometrik yöntemlerle tanımlanması, mutlak miktarının ölçüm metodlarının geliştirilmesi ve geçerli kılınması için kullanılacak ¹⁵N işaretli iç standart (¹⁵N-hPARP1 ve ¹⁵N-hOGG1) ürünlerinin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgilidir.**

Mevcut buluş ile hPARP1 ve hOGG1 proteinlerinin tüm azotlarının işaretlenmiş birebir analogları üretilmektedir. İnsan genomik DNA'sından rekombinant DNA teknolojisi ile ¹⁵N-hPARP1 ve ¹⁵N-hOGG1'in üretimi sağlandıktan sonra proteinlerin saflaştırılması söz konusudur. ¹⁵N etiketli proteinin karakterizasyonu ve etiketlemenin başarı oranını ölçmek için moleküler kütle ve izotopik saflığın ölçümü ve enzimatik aktivite tayinleri yapılır. Saflaştırılan internal standartların yüksek rezolüsyonlu LC-MS ile ölçümü ve böylece üretilen proteinlerin hPARP1 ve hOGG1 tanımlanması ve mutlak

kantitasyonunda kullanılabilirliği analitik yöntem geçerlilik çalışmalarıyla gösterilecektir.

hPARP1 ve hOGG1 proteinlerinin tamamen stabil izotop işaretli analogunun üretimi ve kullanılması ile proteinin ön analiz aşamasında gerçekleştirilen enzimle kesim basamağında, ölçümü yapılacak proteinle aynı anda işaretli analogu da hidroliz olmaktadır. Böylece analizin ön ekstraksiyon yöntemi de dahil olmak üzere tüm deneysel aşamalarından doğacak değişkenlerin standardize edilmesi söz konusu olmaktadır. Ayrıca ölçümü gerçekleştirilecek proteine spesifik tripsin vb. enzimlerle kesim sonrası elde edilecek peptit sayısı kadar üretimi gerçekleştirilecek stabil izotop işaretli protein iç standardından da peptit elde edilebilmektedir. MS ile ölçüm sonrası endojen proteinin elde edilen peptit spektrumlarının her birine ait iç standart peptit spektrumları da elde edilmektedir. Bu sayede mutlak kantitasyon için seçilen tüm peptitlerin kantitasyonu yapılabilmektedir. İç standart ile tripsin gibi proteolitik bir enzimle kesim sonrası elde edilecek tüm peptitlere spesifik stabil izotop işaretli peptit internal standartları da doğal olarak elde edilmiş olmaktadır. Bu durum LC-MS ile analiz sırasında proteini tanımlayan ve kantitasyonda kullanılacak yoğunluktaki peptitlerin aynı alıkonma zamanına sahip peptit standartlarının da olması sebebiyle rahatlıkla seçilebilmesine ve sadece birkaç peptitin değil istenen tüm peptitlerin aynı anda kantitasyonuna imkân sağlamaktadır. Buluş kapsamında elde edilen stabil izotop işaretli analogların kullanımı ile proteinlerin kantitasyonunda doğruluk, kesinlik artmış ve ön işlem kaynaklı kayıplar normalize edilmiş olmaktadır.

Özet

Belirli proteinlerin tekli ya da çoklu ölçümleri farklı immünolojik tekniklerle gerçekleştirilebilir ancak bu yaklaşımların başarısı, yüksek afiniteli ve özgül antikörlerin üretimine ve validasyonuna bağlıdır. İmmünolojik yöntemler sınırlı özgüllük ve yüksek ölçüm varyasyonları nedeniyle, özellikle klinik biyobelirteç olma potansi-

yeline sahip "düşük miktarlarda bulunan proteinlerin" tekli ya da çoklu ölçümlerinde yetersiz kalmaktadır.

Moleküler kütle ölçümü esasına dayalı kütle spektrometri (MS) tekniği, tek bir analizde birden fazla proteinin ölçülebildiği yeni nesil bir platformdur. Bir proteinin kütesinin bilinme hassasiyeti arttıkça, onun muhtelif



Stabil İzotop İşaretli İnsan DNA Onarım Protein Standartları ¹⁵N-hPARP1 ve ¹⁵N-hOGG1'in Üretimi

Biyoteknoloji ve Yaşam Bilimleri

etkileşimlerde aldığı rolü bilme olanağı da artar. Bu nedenle MS, tekli ya da "proteomiks" olarak adlandırılan çoklu protein çalışmalarının temel analitik yöntemidir. Son 20-30 yılda MS temelli proteomik analizler, doğruluk ve kesinlik oranının yüksek olması sebebiyle, özellikle rutin yöntemlerin duyarlılığının yetersiz olduğu düşük miktarlarda bulunan proteinlerin kantitasyonunda referans yöntem olarak klinik laboratuvar uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaya başlamıştır. Özellikle son yıllarda hastalık ve sağlık durumundaki değişikliklerin izlenmesi, risk değerlendirilmesi, klinik tanı, hastalık prognoz tahmini ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi gibi amaçlarla tekli ya da çoklu protein biyobelirteç arama çalışmaları büyük bir ivme ile artmaktadır.

Biyolojik örneklerde bulunan proteinlerin MS temelli kantitasyonunda, ilgilenilen protein/proteinlerin proteolitik enzimlerle kesimi (örneğin tripsin) ile peptitlerine ayrıldıktan sonra, o proteini en iyi temsil eden "proteotipik (vekil) peptitler" aracılığı ile analizlendiği "bottom-up" proteomiks iş akışı kullanılan temel yaklaşımdır. Proteinlerin mutlak kantitasyonu için, MS ile analiz öncesinde "internal (iç) standart" olarak adlandırılan ve ölçümü yapılacak analitin ¹⁵N ve/veya ¹³C işaretli izotopik işaretli peptit iç standardının/standartlarının örneğe ilave edilmesi, böylece örnekteki matriks etkisi, kromatografik kayıplar ve kütle spektrometrik iyonizasyon etkinliğinden doğacak değişkenliklerin standardize edilmesi önem taşımaktadır. Internal standart, analizi yapılacak örnekle aynı kromatografik özelliklere sahip olup, sadece kütle farkı ile endojen analitten ayrılmaktadır. Endojen analite ait vekil peptitler ile konsantrasyonu önceden bilinen internal standartlara ait MS ile elde edilen pik alanları kıyaslanarak mutlak kantitasyon yapmak mümkün olabilmektedir.

İzotopik olarak işaretlenmiş "peptit iç standartlarının", ölçümde kullanımıyla proteinlerin mutlak kantitasyonunda oldukça önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak böyle peptitlerin kullanılmasının ciddi ölçüm problemlerini de beraberinde getirdiği konusunda görüşler mevcuttur. Öncelikle bir proteinin tespiti ve kantitasyonu için aynı anda en az dört/beş peptidin tanımlanması ve işaretlenmesi gereklidir. Diğer yandan biyolojik örneklerdeki ve vücut sıvılarındaki proteinlerin geniş dinamik aralığı göz önüne alındığında kütle spektrometresinde düşük miktarda bulunan proteinlerin duyarlı ve doğru analizi için öncelikle diğer çok bulunan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla ön ekstraksiyon işlemi gereklidir. Bu durumda mutlak kantitasyon için ideal internal standardın sadece kütle spektrometrik analiz basamağında değil, tüm preanalitik örnek işleme basamaklarında da incelenecek protein ile aynı işlemlerden geçiyor olması çok önemlidir. Bu nedenle hedef proteinin izotop işaretli birebir benzeri ideal iç standart özelliklerine sahiptir. Ticari olarak satılan izotopik olarak işaretlenmiş peptit internal standartları, genellikle ölçümü yapılacak hedef proteinin izolasyonu ve tripsin ile kesimi sonrası örnekler eklenir. Bu nedenle proteinin ölçüm öncesi yapılan tüm aşamalarla (ekstraksiyon, tripsin ile hidroliz vb.) ilgili hataya tabidir. Bu peptit standartlarının bir diğer dezavantajı da yüksek maliyetidir. Ayrıca bir proteinin tespiti ve kantitasyonu için aynı anda en az dört-beş peptidin tanımlanmasının gerekli olduğu düşünülürse bu maliyet daha da artacaktır.

Proteinlerin tamamen stabil izotop işaretli analogunun üretimi ve kullanılması ile proteinin ön analiz aşamasında gerçekleştirilen enzimle kesim basamağında, ölçümü yapılacak proteinle aynı anda işaretli analogu da hidroliz olmaktadır. Böylece analizin ön ekstraksiyon yöntemi de dahil olmak üzere tüm deneysel aşamalarından doğacak değişkenlerin standardize edilmesi söz konusu olmaktadır. Ayrıca ölçümü gerçekleştirilecek proteine spesifik tripsin vb. enzimlerle kesim sonrası elde edilecek peptit sayısı kadar üretimi gerçekleştirilecek stabil izotop işaretli protein iç standardından da peptit elde edilebilmektedir. MS ile ölçüm sonrası endojen proteinin elde edilen peptit spektrumlarının her birine ait iç standart peptit spektrumları da elde edilmektedir. Bu sayede mutlak kantitasyon için seçilen tüm peptitlerin kantitasyonu yapılabilmektedir. ¹⁵N işaretli iç standart ile tripsin gibi proteolitik bir enzimle kesim sonrası elde edilecek tüm peptitlere spesifik stabil izotop işaretli peptit internal standartları da doğal olarak elde edilmiş olmaktadır. Bu durum LC-MS ile analiz sırasında proteini tanımlayan ve kantitasyonda kullanılacak yoğunluktaki peptitlerin aynı alıkonma zamanına sahip peptit standartlarının da olması sebebiyle rahatlıkla seçilebilmesine ve sadece birkaç peptidin değil istenen tüm peptitlerin aynı anda kantitasyonuna imkân sağlamaktadır.

Stabil İzotop İşaretli İnsan DNA Onarım Protein Standartları 15N-hPARP1 ve 15N-hOGG1'in Üretimi

Biyoteknoloji ve Yaşam Bilimleri



Hedefli proteomiks çalışmalarının yeterli ekipman olmasına rağmen oldukça sınırlı laboratuvarlarda gerçekleştirilmesinin ana sebebi, kantitasyon için gereken internal standartların oldukça maliyetli şekilde temini ya da bu internal standartların ticari olarak satılmamasıdır.

Önerilen çalışma ile protein yapıdaki stabil izotop işaretli internal standartlar, ülkemizde ilk kez uluslararası standartlara uygun olarak üretilmektedir. Üretim sonrası da ticarileşmesi söz konusu olabilecektir.

Özet

Mevcut buluşa konu olan yöntemle üretilmiş, tüm azot atomları işaretlenmiş proteinlerin üretimi sonrası karakterizasyon işlemleri hem buluş basamağı olan ve geliştirilen rezolüsyonu yüksek bir teknik olan yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografi kütle spektrometre (HR-LC-MS) ile gerçekleştirilecek olup hem de üretilen proteinlerin aminoasit analizi, intakt protein analizi, SI izlenebilir değer atama çalışmalarını içeren protein peptit konsantrasyonu belirlenmesi (PICAA) analizleri ile gerçekleştirilmesi söz konusudur. Literatürde bu proteinlerin karakterizasyonu için kullanılan LC-MS/MS yönteminde, çoklu reaksiyon izleme (MRM) veri izleme modunda ölçümün hassasiyeti bir molekülün kütlelerini virgülden sonra bir ya da iki basamak görebilecek düzeydedir. Bu nedenle tanımlama ve karakterizasyon yapmak için proteine spesi-

fik peptidlerin hem ana iyon hem de ürün iyon kütlelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da ölçümün karmaşıklık düzeyini arttırmaktadır. Buluş kapsamında gerçekleştirilen HR-LC-MS yönteminde ise sadece ana iyon kütlelerinden peptit tanımlaması ve kantitasyonu mümkün kılınmaktadır. Bunun nedeni bir molekülün kütlelerini virgülden sonra beş basamak düzeyinde ölçülebilir bir metod geliştirmiş olmamızdır. Bu metod kapsamında, kantitasyon için kullanılacak peptidlere ait kütle doğrulukları <2 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu değer; mevcut buluşa konu olan yöntemle üretilmiş ve tüm azot atomları işaretlenmiş hPARP1 proteininin iç (internal) standart olarak kullanımı dahilinde buluşun çözümü amaçladığı teknik probleme önceki tekniğe dahil olmayan bir çözüm getirildiğini göstermektedir.

Fikri Mülkiyet Hakları



Ulusal patent başvurusu yapıldı, PCT başvurusu yapıldı, süreç devam ediyor.

Başvuru No: TR 2022/020446
PCT Başvuru no: PCT/TR2023/051407



Teknoloji Hazırlık Seviyesi: TRL 2

Tamamlanan Testler:



Buluş kapsamında geliştirilen ve üretimi yapılacak proteinlerin üretimi ve saflaştırılması sonrası karakterizasyonunda kullanılacak olan yüksek HR-LC-MS yönteminde sadece ana iyon kütlelerinden peptit tanımlaması ve kantitasyonu mümkün kılınmaktadır. Bunun nedeni bir molekülün kütlelerini virgülden sonra beş basamak düzeyinde ölçülebilir bir metod geliştirmiş olmamızdır. Kantitasyon için kullanılacak peptidlere ait kütle doğrulukları <2 ppm olarak hesaplanmıştır. Böylece yenilik olarak her iki proteinin tüm azot atomlarının izotop işaretli analoglarının üretimi ve saflaştırılması sonrası proteinlerin HR-LC-MS ile karakterizasyonunda daha hassas bir ölçüm metodu oluşturulmuştur.





Stabil İzotop İşaretli İnsan DNA Onarım Protein Standartları ^{15}N -hPARP1 ve ^{15}N -hOGG1'in Üretimi

Biyoteknoloji ve Yaşam Bilimleri

Tamamlanacak olan testler:

- hOGG1 ve hPARP1'in rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi
- hOGG1 ve hPARP1 transformasyonu yapılan bakterilerin ^{15}N ile işaretlenmesi
- ^{15}N -hOGG1 ve ^{15}N -hPARP1'in ultrasantrifügasyon ve kolon kromatografisi ile saflaştırılması
- ^{15}N etiketli hOGG1 ve hPARP1 proteinlerinin karakterizasyonu ve proteinlerin ^{15}N ile etiketlenmenin başarı oranını ölçmek için moleküler kütle ve izotopik saflık tayini
- ^{15}N -hOGG1 ve ^{15}N -hPARP1'in enzimatik aktivite tayininin gerçekleştirilmesi
- Üretilen ve saflaştırılan ^{15}N -hOGG1 ve ^{15}N -hPARP1 internal standardının HR-LC-MS ile ölçümü

