



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROPİPET AFİNİTE KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE
KÜTLE TEMELLİ ALTERNATİF KLİNİK YÖNTEMLER
GELİŞTİRİLMESİ**

ZELAL ZUHAL KAYA
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROPİPET AFİNİTE KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE
KÜTLE TEMELLİ ALTERNATİF KLİNİK YÖNTEMLER
GELİŞTİRİLMESİ**

ZELAL ZUHAL KAYA
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023

Anabilim Dalı:	Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program:	Doktora
Tez Başlığı:	Mikropipet Afinite Kromatografi Yöntemi ile Kütle Temelli Alternatif Klinik Yöntemler Geliştirilmesi
Öğrencinin Adı-Soyadı:	Zelal Zuhul Kaya
Savunma Sınavı Tarihi:	/ /

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Jüri Başkanı)	Ünvanı, Adı-Soyadı	İmza
	Kurumu	
Üye (Tez Danışmanı)	Ünvanı, Adı-Soyadı	İmza
	Kurumu	
Üye	Ünvanı, Adı-Soyadı	İmza
	Kurumu	
Üye	Ünvanı, Adı-Soyadı	İmza
	Kurumu	
Üye	Ünvanı, Adı-Soyadı	İmza
	Kurumu	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

13.01.2023

Zelal Zuhul Kaya

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a

Çalışmamın çeşitli aşamalarında her zaman desteklerini gösteren, yol gösterici olan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Muhittin Serdar ve Prof. Dr. Fehime Aksungar'a

Klinik biyokimya ile ilgili her alanda desteğini esirgemeyen ve hasta örneklerinin toplanmasında sırasında desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Meltem Kilercik ve Prof. Dr. Mustafa Serteser'e

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Programı 'nın değerli anabilim dalı üyelerine ve değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun'a

Çalışmanın çeşitli basamaklarında desteği olan değerli çalışma arkadaşım Emel Akgün'e ve doktora eğitimim süresince manevi desteklerini her zaman gösteren, onlarsız bir lisansüstü eğitimi düşünemediğim sevgili arkadaşlarım Selen Abanuz ve Sevdican Üstün'e

En zor zamanlarımda eğitimim için hep destek olan ve varlığını her an hissettiren Sevgili Ailem'e gönülden teşekkür ediyorum.

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen 118C082 numaralı (Tübitak 2244 Sanayi Doktora Programı), 220S875 numaralı ve 222S169 numaralı (Tübitak 1002 projeleri) projeler kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK ‘a projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca; Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2021/03/03 numaralı proje ile desteklenmiştir. Acıbadem Üniversitesine projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Kromatografik Yöntemler	6
2.1.1 Afinite kromatografisi	6
2.1.1.1 Afinite kromatografi çalışma prensibi	7
2.1.1.2 Afinite kromatografi bileşenleri.....	8
2.1.1.2.1 Afinite kromatografi matrisleri	9
2.1.1.2.2 Afinite kromatografi ligandları.....	11
2.2 Mikropipet Afinite Kromatografi ile Birleştirilmiş Kütle Temelli Yöntem.....	15
2.2.1 Triple quadrupole kütle spektrometrisi	17
2.2.1.1 Triple quadropole kütle spektrometrelerinde peptit analizi	19
2.2.1.1.1 In solution digestion	20
2.2.1.2 Örnek ön hazırlama prosedürü.....	21
2.2.1.3 A1AT proteinin ölçümü için afinite kromatografi ile birleştirilmiş tandem kütle spektrometrisi	22
2.2.2 MALDI-TOF MS	24
2.2.2.1 MALDI-TOF MS'in çalışma prensibi	24
2.2.2.1.1 Numune hazırlama prosedürü	26
2.2.2.1.2 Matris uygulaması ve kristalizasyon	26
2.2.2.1.3 MALDI kaynağında örnek iyonizasyonu	27
2.2.2.1.4 İyon m/z'nin tespiti ve kütle spektrumunun oluşturulması.....	28
2.2.2.2 MALDI-TOF MS ile protein tanımlanması	28
2.2.2.3 Örnek ön hazırlama yöntemleri.....	29
2.2.2.4 Monoklonal gammopati, multipl myeloma ve alzheimer hastalığının teşhisinde immünglobulin ağır ve hafif zincir proteinlerinin ölçümü için afinite kromatografi ile birleştirilmiş MALDI TOF kütle spektrometrisi	29
3 GEREÇ VE YÖNTEM	33

3.1	Çalışma Planı	33
3.2	Gereçler	33
3.3	Yöntemler	36
3.3.1	Klinik testlerde immünfiksasyon elektroforez analizine alternatif mikropipet afinite kromatografi analiz yöntemi geliştirilmesi	36
3.3.1.1	Örnek toplanması	36
3.3.1.2	İmmunoglobulin zenginleştirme	37
3.3.1.3	MALDI-TOF MS analizi	39
3.3.1.4	Veri analizi	39
3.3.1.5	İstatistiksel analiz	40
3.3.1.6	Mikropipet afinite kromatografi sistemi optimizasyon çalışmaları	40
3.3.1.7	Mikropipet afinite kromatografi sistemi validasyon çalışmaları	41
3.3.2	Klinik testlerde immünfiksasyon elektroforez ve serbest hafif zincir (FLC) testlerine alternatif, mikropipet afinite kromatografi ve analiz yöntemi geliştirilmesi	41
3.3.2.1	Örneklerin toplanması	41
3.3.2.2	Freelite ölçümü	41
3.3.2.3	İmmünglobulin zenginleştirme	42
3.3.2.4	MALDI-TOF MS analizi	42
3.3.2.5	Pik Fitting analizi	43
3.3.2.6	İstatistiksel analiz	43
3.3.3	Alzheimer hastalığının teşhisinde mikropipet afinite kromatografi ile analiz yöntemi geliştirilmesi	43
3.3.3.1	Örneklerin toplanması	43
3.3.3.2	İmmunoglobulin zenginleştirme	44
3.3.3.3	MALDI-TOF MS analizi	44
3.3.3.4	Veri analizi	44
3.3.3.5	İstatistiksel analiz	45
3.3.4	Klinik testlerde mevcut alfa-1 antitripsin analizine alternatif mikropipet afinite kromatografi ve analiz yöntemi geliştirilmesi	46
3.3.4.1	Örneklerin toplanması	46
3.3.4.2	Nefelometri ile A1AT ölçümü	46
3.3.4.3	A1AT izolasyonu	46
3.3.4.4	A1AT proteinin peptitlerine ayrıştırılması	47
3.3.4.5	LC-MS/MS analizi	47
3.3.4.6	Genotipleme analizi	48
4	BULGULAR	49
4.1	Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	49
4.2	Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez ve Serbest Hafif Zincir (FLC) Testlerine Alternatif, Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	79
4.3	Alzheimer Hastalığının Teşhisinde Mikropipet Afinite Kromatografi ile Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	87
4.3.1	LC zirvelerinin tespiti ve κ LC/ λ LC oranlarının karşılaştırması	87
4.3.2	AD teşhisinde κ LC/ λ LC oranının biyobelirteç olarak performansı	92

4.4 Klinik Testlerde Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	96
5 TARTIŞMA.....	103
5.1 Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	103
5.2 Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez ve Serbest Hafif Zincir (FLC) Testlerine Alternatif, Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	105
5.3 Alzheimer Hastalığının Teşhisinde, Mikropipet Afinite Kromatografi ile Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	108
5.4 Klinik Testlerde Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi	111
6 SONUÇ	115
7 KAYNAKLAR.....	116
8 EKLER	132
EK 1 ETİK KURUL ONAYI	132
EK 2 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	133
EK 3 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	135
EK 4 ETİK KURUL ONAYI	136
EK 5 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	137
EK 6 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	139
9 ÖZGEÇMİŞ	140

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

α- CHCA	Alfa-siyanohidroksisinamik asit
A1AT	Alfa-1-Antitripsin
A1ATD	Alfa-1-Antitripsin Eksikliği
AD	Alzheimer Hastalığı
AP	Afinite Saflaştırma
AP-MS	Afinite Saflaştırma Kütle Spektrometrisi
AUC	Eğri altında kalan alan
BSA	Bovin Serum Albümin
CE	Kapiller Elektroforez
C_H1	Ağır zincirin sabit kısmı
CID	Çarpışma Kaynaklı Ayırışma
CI	Güven Aralığı
C_L	Hafif zincirin sabit kısmı
CNBr	Siyanojen Bromür
DBC	Dinamik Bağlama Kapasitesi
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
DTT	Ditiyotretol
ELISA	Enzim-bağlı immün assay
Fab	Antijen bağlayan fragman
Fc	Kristalize olabilen fragment
FLC	Serbest hafif zincir
FPLC	Hızlı protein sıvı kromatografisi
FWHM	Yarı yüksekliğindeki tam genişlik
HCl	Hidroklorik asit
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IAA	İyodoasetamid
IAC	İmmünafinite kromatografi
IEC	İyon değişim kromatografisi
IEF	İzoelektrik odaklama

IFE	İmmüfiksasyon elektroforez
Ig	İmmunoglobulin
IgA	İmmünglobulin A
IgG	İmmünglobulin G
IgM	İmmünglobulin M
IT	İmmünotipleme
κ	Kappa
λ	Lambda
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LOQ	Kantitasyon limiti
MM	Multiple Myeloma
MS	Kütle Spektrometrisi
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
M-protein	Monoklonal protein
m/z	Kütle/yük
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCD	Plazma hücre hastalıkları
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pi	Proteinaz inhibitörü
PMF	Peptit kütle parmak izi
PTM	Post-translasyonel modifikasyon
r	Pearson korelasyon katsayısı
Q1	Birinci quadrupole
q2	Çarpışma hücresi
Q3	Üçüncü quadrupole
QC	Kalite kontrol
ROC	Alıcı işlem karakteristikleri
SA	Sinapinik Asit
SPEP	Serum Protein Elektroforez
SRM	Seçilmiş Reaksiyon İzleme
TFA	Trifloroasetik asit

TOF	Uçuş zamanlı
UV	Ultraviyole
V_HH	Ağır zincirin değişken alanı



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Afinite kromatografi iş akışı	8
Şekil 2. Substratın destek ortamına bağlanma reaksiyonları	10
Şekil 3. MS tabanlı iki proteomik yaklaşımın iş akışı	16
Şekil 4. Afinite saflaştırması ve kütle spektrometrisi (AP-MS).	17
Şekil 5. Proteolitik substrat ölçümü için seçilmiş reaksiyon izleme (SRM).....	19
Şekil 6. MS/MS peptit parçalanma modeli.	19
Şekil 7. Yaygın olarak kullanılan iki proteomik strateji	20
Şekil 8. In solution parçalanmanın iş akışı	21
Şekil 9. MALDI-TOF MS metodolojisi.....	25
Şekil 10. İmmunoglobulin molekülünün yapısı	30
Şekil 11. Çalışmanın çalışma tasarımı ve iş akışı.	38
Şekil 12. M-proteini içermeyen (Poliklonal) hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	50
Şekil 13. IgG kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	51
Şekil 14. IgG lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	51
Şekil 15. IgA kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	52
Şekil 16. IgA lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	52
Şekil 17. IgM kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	53
Şekil 18. IgM lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü.....	53
Şekil 19. PeakFit 4.12 yazılımındaki pik uydurma algoritmaları	54

Şekil 20. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı	55
Şekil 21. M-proteini içermeyen kontrol örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	56
Şekil 22. IgG kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	57
Şekil 23. IgG lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	57
Şekil 24. IgA kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	58
Şekil 25. IgA lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	58
Şekil 26. IgM kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	59
Şekil 27. IgM lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.....	59
Şekil 28. Poliklonaliteye sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü	60
Şekil 29. IgG kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü.....	61
Şekil 30. IgG kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü.....	62
Şekil 31. IgA kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü.....	63
Şekil 32. IgA lambda monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü.....	64
Şekil 33. IgM kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel ve pik fitting görüntüsü. A) kappa ve lambda rezin ile B) M-rezin ile yapılan immün-zenginleştirme.....	65
Şekil 34. IgM lambda monoklonitesine sahip spektrum, jel ve pik fitting görüntüsü. A) kappa ve lambda rezin ile B) M-rezin ile yapılan immün-zenginleştirme.....	66
Şekil 35. Kappa hafif zincir monoklonalitesine sahip spektrum görüntüsü	67
Şekil 36. IgG kappa ve IgG lambda biklonalitesine sahip spektrum görüntüsü	68

Şekil 37. Zayıf IgG kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü.....	69
Şekil 38. İki yöntem (IFE ve MALDI-TOF MS) arasındaki uyum grafiği.....	71
Şekil 39. Poliklonal serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	72
Şekil 40. IgG kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	73
Şekil 41. IgG lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	74
Şekil 42. IgA kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	75
Şekil 43. IgA lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	76
Şekil 44. IgM kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	77
Şekil 45. IgM lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	78
Şekil 46. Ek şekiller FLC'nin $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ yükü için m/z dağılımlarını göstermektedir.....	80
Şekil 47. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı	81
Şekil 48. Serbest kappa/lambda oranları arasındaki korelasyon analizi.	83
Şekil 49. Serbest kappa değerleri arasındaki korelasyon analizi.	84
Şekil 50. Serbest lambda oranları arasındaki korelasyon analizi.	85
Şekil 51. Alıcı işletim karakteristiği eğrisi (ROC) analizi.	86
Şekil 52. Bir M-proteini içeren kontrol ve hasta numunelerinin temsili olarak üst üste bindirilmiş spektrumları.....	89
Şekil 53. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı	91
Şekil 54. Temel bileşenler analizi (PCA).....	93
Şekil 55. Değişken trend grafiği	94

Şekil 56. Alıcı işletim karakteristiği eğrisi (ROC) analizi.	95
Şekil 57. Sentetik peptitler ile MRM analizinin verifikasyonu	97
Şekil 58. Proteotipik peptit için kalibrasyon eğrisi	97
Şekil 59. Mutant Z peptit için kalibrasyon eğrisi	98
Şekil 60. Mutant S peptit için kalibrasyon eğrisi	98
Şekil 61. Normal A1AT konsantrasyonu sahip serum örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	99
Şekil 62. M/M homozigota ait kromatogram görüntüsünün referans kromatogramı ile karşılaştırılması	100
Şekil 63. Z/Z homozigota ait kromatogram görüntüsünün referans kromatogramı ile karşılaştırılması	101
Şekil 64. Z mutasyonu için dizi analizi	102
Şekil 65. S mutasyonu için dizi analizi	102

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Yaygın kullanılan matriksler ve özellikleri	11
Tablo 2. Afinite kromatografisinde kullanılan tipik ligandlar ve hedef molekülleri	12
Tablo 3. CaptureSelect™ Afinite Rezinleri	14
Tablo 4. Yaygın MALDI matrisleri ve uygulama alanları.....	27
Tablo 5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve firmaları	33
Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	34
Tablo 7. Çalışmada kullanılan CaptureSelect™ afinite rezinleri.....	38
Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen örneklerin IFE sonuçları.....	49
Tablo 9. İki yöntem arasındaki uyum oranları (IFE ve MALDI-TOF MS).....	70
Tablo 10. Tanımlayıcı İstatistik Verileri.....	79
Tablo 11. Serum κ/λ oranları ölçümlerinin iki yöntem (sFLC ve MALDI-TOF MS) arasındaki uyumu	82
Tablo 12. MALDI-TOF MS ve sFLC belirteçleri arasındaki korelasyon analizi	83
Tablo 13. ROC Eğrisi Parametrelerinin Özet Tablosu.....	86
Tablo 14. Tanımlayıcı istatistik verileri	88
Tablo 15. LC-MS/MS deneyinde izlenen sentetik peptitlerin MS/MS geçişleri.	96

ÖZET

Mikropipet Afinite Kromatografi Yöntemi ile Kütle Temelli Alternatif Klinik Yöntemler Geliştirilmesi

Mikropipet afinite kromatografi yöntemi, bir numune içindeki belirli hedeflerin ayrılması ve analizi için tersine çevrilebilir bir biyolojik etkileşimden yararlanan sıvı kromatografik bir teknik olarak tanımlanır. Selektif rezinlerle birleştirilen immünafinite kromatografisi istenen hedefle seçici olarak etkileşime girerek yüksek hedef saflığı oluşturmaktadır. Bu çalışmada, belirli hastalıkların tanı ve teşhisinde kullanılan rutin klinik yöntemlere alternatif olarak selektif rezinlerle birleştirilmiş mikropipet afinite kromatografi yöntemi ile kütle temelli alternatif klinik yöntemler geliştirildi. Geliştirilen bu yöntemlerle beraber mevcut yöntemlerin maliyetini ve süresini ciddi oranda azaltan, doğru, hassas ve güvenilir metotlar geliştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kütle spektroskopisi, Selektif rezin, İmmün-zenginleştirme, Mikropipet afinite kromatografisi, Metot geliştirme

ABSTRACT

Development of Mass-Based Alternative Clinical Methods with Micropipette Affinity Chromatography Method

The micropipette affinity chromatography method is defined as a liquid chromatographic technique that utilizes a reversible biological interaction for the separation and analysis of specific targets within a sample. Immunoaffinity chromatography combined with selective resins interacts selectively with the desired target, resulting in high target purity. In this study, mass-based alternative clinical methods were developed with the micropipette affinity chromatography method combined with selective resins as an alternative to the routine clinic methods used in the diagnosis and diagnosis of certain diseases. Along with these developed methods, accurate, sensitive, and reliable methods have been developed that significantly reduce the cost and time of existing methods.

Keywords: Mass spectroscopy, Selective resin, Immunoenrichment, Micropipette affinity chromatography, Method development

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Her biyo-akışkan, çok çeşitli bolluk ve moleküler ağırlıklara sahip binlerce proteoformdan oluşan karmaşık ve dinamik bir proteome sahiptir. Yıllar geçtikçe, karmaşık numuneden ilgili hedef proteinleri veya peptitleri zenginleştirmek ve saflaştırmak için otomatik yüksek verimli numune işleme ve ön fraksiyonlama teknikleri gelişmiştir. Bu yöntemler, iyi kalitede kütle spektrumlarının üretilmesinden protein tanımlamasına kadar, geliştirilmiş analitik performansla sonuçlanan protein karmaşıklığının azaltılmasını sağlarlar. Numunenin özelliklerine ve zenginleştirilecek protein fraksiyonuna bağlı olarak halihazırda farklı ön işleme yöntemleri kullanılmaktadır (1).

İnsan plazma örneğinde, toplam protein içeriğinin %99'u albümin, immünglobulinler, haptoglobin, hemopeksin gibi proteinlerden oluşur. Biyolojik matris etkisini hafifletmek için ayırma ve zenginleştirme stratejileri geliştirilmiştir (2). Mikro-pipetlere entegre edilen afinite ligandları, tek bir saflaştırma adımında artan saflık ve verim sağlar ve biyofarmasötik ilaç geliştirmede ve klinik çalışmalarda iş akışlarını basitleştirmek ve zaman ve maliyeti azaltmayı sağlamaktadır. Ayrıca, afinite rezinleri tarafından sağlanan yüksek seçicilik nedeniyle, antikorların ve antikor fragmanlarının saflaştırılması, memeli, bitki veya mikrobiyal bazlı ekspresyon sistemlerinden plazma, serum veya asit gibi ham vücut sıvılarına kadar her türlü ortamda gerçekleştirilebilir. Tüm CaptureSelect™ afinite rezinleri, tek kullanımlık spin (mikropipet) kolonlar kullanılarak pratik antikor saflaştırması için de kullanılabilir (3). CaptureSelect™ afinite rezinleri kullanılarak hem insan plazmasında ve serumunda bol miktarda bulunan proteinlerin izolasyonu hem de bu proteinlerin uzaklaştırılması ile orta ve düşük bolluğa sahip proteinlerinin etkin izolasyon kapasitesini önemli ölçüde artırabilir.

Afinite saflaştırmasını MS'ye bağlayarak, etkileşimler farklı koşullar altında incelenebilir ve böylece protein-protein etkileşimlerinin çok daha dinamik bir görünümü sağlanır. Kütle spektrometresi ile birleştirilmiş afinite saflaştırması (AP-MS), afinite tabanlı bir testtir. Spesifikliğı ve duyarlılığı, büyük ölçüde ilgili proteinler

arasındaki etkileşimin gücüne ve kararlılığına ve en önemlisi de hedef proteinlerinin mutlak ve göreceli bolluğuna bağlıdır (4). AP-MS'de, ilgilenilen tek bir protein veya molekül, bir matris içinde immobilize edilir. Daha sonra matristen bir protein karışımı geçirilir ve etkileşim halindeki ortaklar hedef proteini tarafından yakalanır. Daha sonra yakalanan proteinleri tanımlamak için kütle spektrometrisine (MALDI, LC-MS/MS, vb.) dayanan herhangi bir teknik kullanılır.

Alfa-1-Antitripsin (A1AT), nötrofil elastazın inhibisyonunda önemli rol oynayan bir serpin proteinidir (5). Elastaz A1AT'nin birincil hedefidir ve bu serpinin insan lökosit elastazı tarafından proteolitik yıkıma karşı korur (6). Alfa-1 antitripsin eksikliği (A1ATD), A1AT genindeki mutasyonların neden olduğu çocuklukta karaciğer hastalıklarının ve erişkinlerde akciğer amfizeminin en sık görülen genetik nedenidir (5). A1ATD teşhisi için nefelometri, genotipleme ve/veya fenotipleme yöntemlerinin kombinasyonu kullanılır. A1ATD teşhisi için geleneksel yöntem, nefelometri ile düşük serum AAT konsantrasyonunun belirlenmesi ve daha sonra izoelektrik odaklama (IEF) ile hastalıkla ilişkili spesifik varyantın tanımlanmasını içerir (7). Son çalışmalarda A1AT fenotiplemesinde LC-MS/MS yaklaşımı kullanılmıştır (5,7–9). LC-MS/MS, yüksek özgüllük ile kolayca otomatikleştirilmiş bir analitik iş akışı sunar ve protein fenotiplemesi için umut verici bir araçtır. Mevcut yöntemlere kıyasla A1AT proteinin karakterize etmek için AP-MS yöntemi alternatif haline gelmektedir. LC-MS/MS tabanlı bir testin malzeme maliyetleri, bir IEF testinin maliyetlerinden yaklaşık 10 kat daha düşük olduğundan, prototip oluşturmanın IEF'ye göre önemli mali avantajları vardır (5). A1AT gibi orta ve düşük bolluğa sahip proteinler için LC-MS/MS ile birleştirilmiş afinite saflaştırması, hedeflenen A1AT proteinin etkin izolasyonunu sağlayarak çözünürlük ve kütle ölçüm doğruluğundaki artış sağlayacaktır.

Serum ve idrarda bulunan sağlam immünglobulinler ve immünoglobulin serbest hafif zincirlerin saptanmasının, bazı hastalıkların tanısında, prognozunda ve tedavisinin izlenmesinde önemli bir biyobelirteç olduğu bilinmektedir (10–12). Bu hastalıklar arasında; monoklonal gammopatiler arasında anlamı bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS), multipl miyelom (MM), smoldering multipl

miyelom (SMM), plazma hücre lösemi, sekretuar olmayan miyelom, soliter plazmositom (kemik veya ekstremiteler), POEMS (osteosklerotik miyelom), Waldenström makroglobülinemisi (WM), ağır zincir hastalıkları (HCD) ve primer sistemik amiloidoz (AL) hastalıkları ve bazı nörodejeneratif hastalıkları (Alzheimer Hastalığı, Multiple Skleroz vb.) vardır (13). Klinik laboratuvarlarda M-proteinlerinin saptanmasında çeşitli metodolojiler kullanılmaktadır. Kılcal elektroforez (CE), jel bazlı yöntemler (SPEP, IFE) ve sadece serbest hafif zincir analizine izin veren FLC testleri bu metodolojiler arasındadır (14). Ancak, bu testlerdeki çözünürlük ve analitik hassasiyetteki sınırlamalar ek testlerin kullanılmasını gerektirir. Bu durum maliyetin artmasına, test karmaşıklığının artmasına ve daha zayıf test kullanımına yol açabilir (11,15). Alternatif olarak, M-proteinleri saptamanın analitik duyarlılığını ve özgüllüğünü geliştirmek için, serum ve idrardaki M-proteinleri ölçmek için AP-MS tabanlı yöntemler mevcuttur (16–18). Doğrusal dinamik aralıktaki artışların yanı sıra çözünürlük ve kütle ölçüm doğruluğundaki artışlar, bu cihazları, geleneksel protein jel elektroforezi bazlı yöntemlere kıyasla proteinleri karakterize etmek için alternatif haline getirmektedir.

Bu çalışmada, M-proteinlerle karakterize olan belirli hastalıkların ve A1AT eksikliği hastalığının tanı ve teşhisinde kullanılan rutin yöntemlere alternatif olarak CaptureSelect™ afinite rezinlerinin enkapsüle edildiği mikropipet afinite kromatografi yöntemi ile kütle temelli alternatif klinik yöntemler geliştirilerek hızlı, ucuz ve daha hassas tanı yöntemlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu metodların geliştirilmesiyle, mevcut yöntemlerin maliyetini ve süresini ciddi oranda azaltabilecek, doğru, hassas ve güvenilir metodlar geliştirilmiş olacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler hem rutin hem de araştırma laboratuvarlarında klinik analiz için yaygın uygulamalardan biridir (19). Klinik analiz, hızlı, yüksek verimli ve güvenilir yöntemler gerektirir. Rutin klinik uygulamalarda kullanılan analizlerdeki düşük verim ve duyarlılık ve spesifik olmayan etkileşimler bu tekniklerin güvenilirliğinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak günümüzde geleneksel yöntemlere göre daha spesifik analizler tercih edilmelidir (20). Kromatografik teknikler, son yıllarda hem rutin hem de araştırma laboratuvarlarında daha popüler hale gelmiştir (19).

Kromatografik teknikler, genel olarak klinik analizde, terapötik ilaç izleme, laboratuvar temelli tanı amaçlı biyobelirteç analizi ve klinik toksikoloji alanlarında kullanılır. Biyobelirteçler, normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin ve farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak işlevsel hale getirilebilen biyolojik bileşiklerdir. Bunlar düşük moleküler ağırlıklı metabolitleri, vitaminleri, hormonları, lipidleri, peptitleri ve proteinleri içerir. Bunlar özellikle hastalığın erken teşhisi, hastalık sürecinin değerlendirilmesi, ilaç yanıtının izlenmesi ve terapötik müdahale için önemlidir (19). Bu analizlerde tam kan, serum, plazma, idrar, dışkı ve dokular gibi biyolojik materyaller ile lipidler ve proteinler gibi makromoleküller kullanılmaktadır (21,22).

2.1.1 Afinite kromatografisi

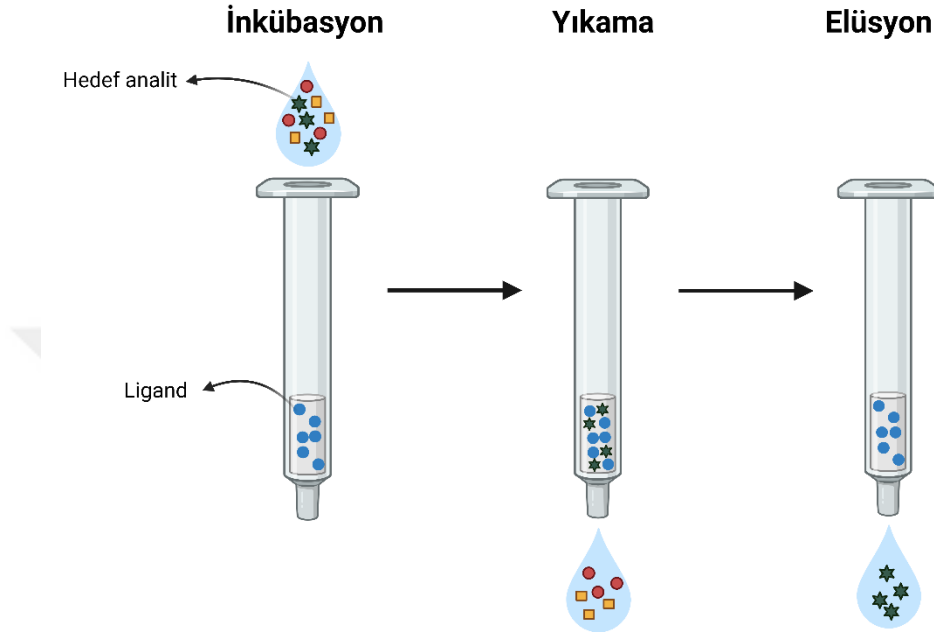
Afinite kromatografisi, bilimsel keşif, klinik araştırma ve teşhiste ve daha yakın zamanda terapötik proteinlerin hazırlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (23). Afinite kromatografisi, reseptör ve ligand arasındaki benzer oldukça spesifik bir etkileşime dayalı olarak biyokimyasal karışımı ayırmak için bir yöntemdir. Afinite kromatografisi (afinite saflaştırması), moleküller arasındaki spesifik bağlanma etkileşimlerini kullanır. Biyomoleküllerin (analitlerin) belirli ligandları spesifik ve

geri dönüşümlü olarak bağlama yeteneği ilgili analitin karmaşık bir karışımdan ayrılması için kullanılır. 1990'ların sonunda yapılan ilk protein-protein etkileşimi çalışmalarından, afinite ayrımları proteomikte gerçek bir rönesans yaşamıştır (24,25). Afinite matrisleri ve afiniteye dayalı deneysel yaklaşımlar geliştirilmiştir; bu, yüksek oranda bol proteinlerin çıkarılmasından ilaç hedef profillerinin çalışmasına ve çeviri sonrası değişikliklerin büyük ölçekli haritalanmasına kadar çok sayıda uygulama bulmuştur. Klasik kurulumda, ilgili bir ligand katı, inert bir reçineye bağlanır ve bir afinite sabit fazı (afinite matrisi) oluşturur. İstenen analiti içeren bir numune bu tür afinite matrisinden geçirildiğinde, liganda spesifik bağlanma afinitesine sahip analit, diğer moleküller ayrı kalırken matris tarafından bağlanır ve tutulur. Diğer istenmeyen moleküller yıkandıktan sonra, bağlı analit afinite matrisinden sıyrılarak orijinal numuneden saflaştırılmasıyla sonuçlanır (26). Bu ilke, Cuatrecasas ve Wilchek tarafından Staphylococcal nükleaz ve avidinin saflaştırılmasına uygulanarak keşfedilmiştir (27,28). Keşfedilmelerinden bu yana, çok sayıda özel afinite saflaştırma tekniği ortaya çıktı, ancak özellikle bugün bile bunların %90'ından fazlası 1968'de rapor edilenle aynı genel prensipleri uygulamaktadır (29). Her afinite sistemi, kendi koşul setini gerektirir ve belirli bir araştırma amacı için kendi özel zorluklarını sunmaktadır (30).

2.1.1.1 Afinite kromatografi çalışma prensibi

Afinite kromatografisi, bir protein ile onun aynı kökenli ligandı arasındaki tersinir ve spesifik bağlanmaya dayanan sıvı kromatografisinin en seçici ve çok yönlü biçimidir. Örneğin; bir hormonun reseptörü ile bağlanması, bir enzimin substratı ile etkileşimi ve bir antikorun hedef antijeni ile bağlanması (31–33). Etkileşimin bu özgüllüğü, afinite kromatografisinde, "afinite ligandı" olarak adlandırılan etkileşimli ajanlardan birinin sabit bir faz desteği olarak kolon üzerinde hareketsiz hale getirilmesiyle kullanılır. Hedef protein, afinite ligandı üzerinde seçici absorpsiyon ile karmaşık bir karışımdan ayrıştırılır. Hedef proteini içeren kompleks karışım (örneğin plazma veya bakteri kültürü), diğer bileşenler geçerken hedef proteinin afinite ligandı ile bağlanması için doğru bileşime ve pH'a sahip bir mobil fazda uygulanır. Tutulan hedef daha sonra sütundan ayrıştırılır. Hedef elüsyonu için seçim yöntemi, hedef ve

ligand etkileşiminin afinitesine göre değişir. Elüsyonun ardından, bir sonraki numunenin uygulanmasından önce kolonun yenilenmesine izin verilir (34,35) (Şekil 1).



Şekil 1. Afinite kromatografi iş akışı (BioRender.com ile oluşturuldu)

2.1.1.2 Afinite kromatografi bileşenleri

Afinite kromatografisi, farklı tipte bağlayıcı ajanlar (ligandlar) ve katı faz destekleri (matrisler) kullanır. Spesifiklik, seçicilik, tekrar üretilebilirlik, konjugasyon kimyaları ve bu bileşenlerin maliyet etkinliği gibi çeşitli özellikleri optimize ederek, bu yöntem, ürünün istenen verimini ve saflığını elde etmek için antikorların büyük ölçekli saflaştırılması için uygulanabilir (35,37). Yıllar boyunca, ekonomik ve verimli bir şekilde istenen antikorun saflığını ve verimini artırmak amacıyla, afinite kromatografisi için etkili metodolojilerin geliştirilmesine yardımcı olmak için kaliteli matrisler ve afinite ligandları bulma veya üretme konusunda önemli çabalar sarf edilmiştir.

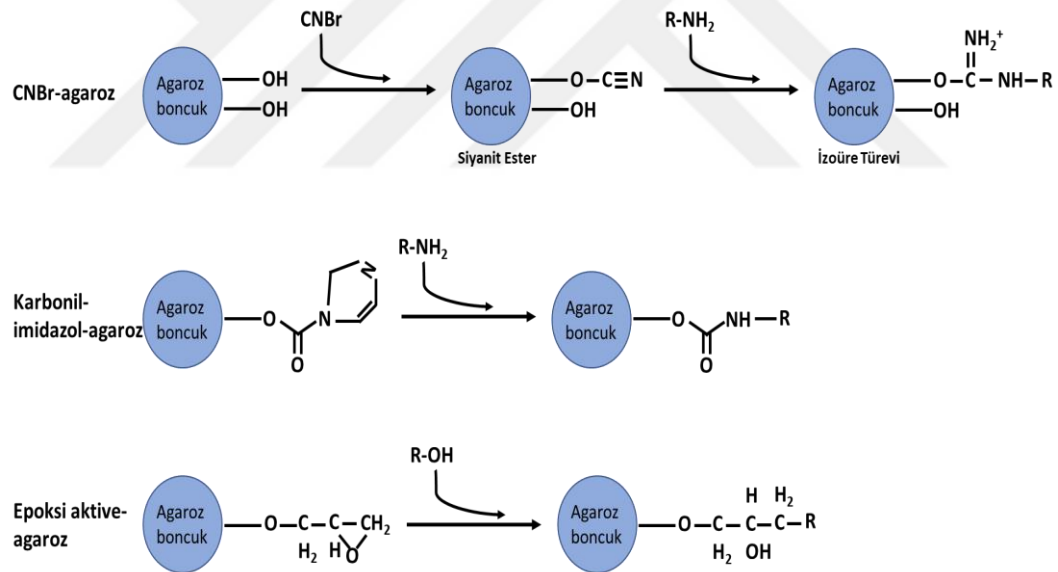
2.1.1.2.1 Afinite kromatografi matrisleri

Uygun bir matris, afinite kromatografisi için bir ön koşuldur. Ligand için destekleyici bir malzeme görevi görür. Kromatografi yönteminin geliştirilmesinin ilk aşamasında, doğal bileşikler hem destek hem de bağlayıcı ajanlar olarak, özellikle enzimin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Bunlar arasında, amilazın destek ve bağlayıcı madde olarak nişasta, alginik asidin poligalakturonaz, pepsinin edestinin kristal formu ve elastazın elastin ile saflaştırılması yer alır (38–41). Daha sonraki yıllarda, ilgilenilen biyomoleküllerin aralığı genişledi, ancak doğal kaynaklardan sağlanan ligand ve destek sistemleri yetersiz kaldı. Bu durum, alternatif kaynaklardan destekleyici materyaller arayışına yol açmıştır.

İdeal bir matris uniform, makro gözenekli, hidrofilik, kimyasal ve mekanik olarak kararlı, seçici, minimum spesifik olmayan absorpsiyon sergilemeli, saflaştırmada kullanılan solventte çözünmeyen, ideal akış özelliklerine sahip olmalı ve ligand bağlanması için geniş bir yüzey alanı sağlamalıdır. Ek olarak, bir matris kimyasal aktivasyonu kolaylaştırarak gerekli ligandları bağlanmasını kolaylaştırmalıdır. İdeal bir matris malzemesi elde etmek için farklı destek malzemeleri ve konjugasyon kimyaları araştırılmıştır. 1936'da Landsteiner ve van der Scheer, haptenerleri tavuk eritrosit stromasına bağlamak için diazo birleştirme yöntemini kullanarak hareketsizleştirilmiş haptenerlere bağlanabilecek antikorları izole etmiştir (42). 1951'de başka bir grup, bovin serum albümin (BSA) ile aşılınmış tavşanın serumundan anti-BSA antikorlarının izolasyonu için BSA'nın immobilizasyonu için aktive edilmiş selüloz kullanmıştır (43). Daha sonra, birkaç grup, enzim veya antikorların saflaştırılması için antijen immobilizasyonu için poliaminostiren ve cam boncuklar gibi katı desteklere bağlı bağlayıcı ajanlar kullanmıştır (44,45). Bununla birlikte, iki büyük çığır açan keşif, kromatografi matrisinin gelişme şeklini değiştirdi.

İlk olarak 1964'te boncuklu agaroz geliştirildi, bunu 1967'de siyanojen bromür (CNBr) immobilizasyon yönteminin geliştirilmesi izledi. Bu ilerlemeler, peptitleri ve proteinleri polisakkarit bazlı malzemelere kovalent olarak bağlamak için uygun araçların geliştirilmesine yol açtı (46,47). CNBr bazlı birleştirme yöntemi, afinite

kromatografisinde çeşitli kullanım alanlarında yer almıştır, ancak toksik yapısı nedeniyle sağlık tehlikesine neden olmuştur. Bu nedenle, karbodiimid, tresil klorür, glutaraldehit ve fosforil klorür gibi başka birleştirme reaktifleri geliştirilmiştir (48). Ancak, bu matrislerin aktivasyonları yetersiz kalmıştır. Bu nedenle, önceden aktive edilmiş matrisler geliştirilmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuştur (34). Aktive edilmiş matrisler, ligandları kovalent olarak matrislere bağlamak için birincil aminler, sülfidril, aldehytler, hidroksiller ve karboksilik asitleri içeren kimyalar kullanılarak geliştirilmiştir (34,35). Aminoheksanoik asit-agaroz (CH-agaroz, aminlerle reaksiyon için) ve diaminoheksan-agaroz (AH-agaroz, karboksilik asitlerle reaksiyon için) nispeten uzun metilen zincirlerine sahiptir ve ligandı jel boncuklarından önemli bir mesafede tutar. Aminleri bağlamak için alternatif bir reaktif, karbonildiimidazol-agarozdur ve alkol için epoksi ile aktive edilmiş agaroz kullanılır (49) (Şekil 2).



Şekil 2. Substratın destek ortamına bağlanma reaksiyonları

Afinite kromatografisinde kullanılan matrisler, doğal, sentetik ve inorganik olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Agaroz, dekstroze ve selüloz tanecikleri, yaygın olarak kullanılan doğal matrislerdir (34). Sentetik destekler arasında akrilamid, polistiren ve polimetakralat türevleri bulunurken (50–52), gözenekli silika ve cam sıklıkla bildirilen inorganik matrislerden bazılarıdır (53,54) (Tablo 1).

Tablo 1. Yaygın kullanılan matriksler ve özellikleri

Matrix	Özellikleri
Agaroz	Hidrofilik, neredeyse hiç spesifik olmayan bağ yok, protein saflaştırması için altın standart
Silika Jel	Nano gözenekli (spesifik olmayan bağlara yol açar), silan yoluyla fonksiyonel hale getirilir, silanlar alkalın tampon tarafından yıkanır → azaltılmış stabilite sağlar
Alüminyum Oksit	Asidik yüzey, aminleri geri dönüşümsüz olarak bağlar, belirli maddelerin miktarını azaltmak için kullanılır
Akrilat	Kısmen hidrofobik (spesifik olmayan sınırlar mümkün), tek dağılımlı parçacıklar, hücre ayırımı için kullanılır
Organik Polimerler	Kısmen hidrofobik (spesifik olmayan bağlar mümkündür), monodispers partiküller ligand eşleşmesi için kullanılabilir, spesifik olmayan bağlar nedeniyle protein saflaştırması için önerilmez

2.1.1.2.2 Afinite kromatografi ligandları

Afinite ligandları, başarılı bir afinite kromatografik kurulumun temel bileşenidir. Afinite kromatografisi için uygun bir ligandın tipik nitelikleri arasında hedefe afinite, özgüllük, immobilizasyon fizibilitesi, sert yıkama ve elüsyon koşullarında stabilite ve matrise eklendikten sonra hedef bağlama kapasitesinin muhafaza edilmesi yer alır. Gelişmiş protein saflaştırması için bu ligandları geliştirmek ve onarmak için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, bu ligandlardan sadece birkaçı, antikor saflaştırması için tutarlı kullanım bulmuştur. Bu ligandlar üç geniş grupta sınıflandırılır: biyospesifik ligandlar, psödobiyospesifik ligandlar ve sentetik ligandlar (31,35). Afinite kromatografisinde yaygın kullanılan ligandlar ve hedef molekülleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Afinite kromatografisinde kullanılan tipik ligandlar ve hedef molekülleri (55)

Ligand	Hedef
Antikor	Antijen
Enzim	Substrat analogu, inhibitör, kofaktör
Nükleik asit	Tamamlayıcı baz dizisi, nükleik asit bağlayıcı protein
Avidin	Biyotin
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey proteini
Glutasyon	GST
Protein A ve G	İmmünglobulinler
Poli (A)	Poli(U) dizileri içeren RNA
Kalmodulin	Kalmodulin-binding molekül

2.1.1.2.2.1 Afinite kromatografisinde kullanılan aldehit aktive agaroz bazlı ligandlar

Staphylococcus aureus protein A 1970'lerin başında birçok IgG antikorunun Fc alanı ile etkileşime giren bakteri kaynaklı bir afinite ligandı olarak keşfedilmiştir (56). Bu keşiften sonra, protein A bazlı afinite kromatografisi, antikor saflaştırma için en yaygın kullanılan teknik olarak yer aldı ve insan IgG-bazlı terapötiklerin aşağı yönde işlenmesi için büyük çapta uygulanmıştır (57,58). Protein G ve L gibi diğer bakteriyel proteinler, ya IgG Fc alanının (protein G) ya da belirli kappa alt sınıflarına (protein L) ait olan antikor hafif zincirlerinin tanınması yoluyla antikor bağlanmasında yüksek seçicilik göstermektedir (59,60). Bununla birlikte, afinite bağlanması, bu afinite ligandlarından herhangi biri tarafından tanınan bir epitopa sahip antikorlar veya antikor fragmanları ile sınırlı olduğundan dolayı böyle bir epitopa sahip olmayan antikor molekülleri afinite kromatografi uygulamalarından dışlanmıştır. İyon değişimine (IEC) veya hidrofobik etkileşimlere (HIC) dayanan diğer kromatografik yöntemler, hedef antikor için daha az seçicidir ve immünoafinite kromatografinin (IAC) aksine tek adımlı bir işlemde yüksek saflığı engeller (3).

CaptureSelect™ afinite rezinleri, antikorların, antikor fragmanlarının, rekombinant ve plazma proteinlerinin ve viral vektörlerin saflaştırılmasını sağlar.

CaptureSelect™ afinite rezinleri, Camelidae'da bulunan ağır zincir antikorlarından türetilir (61,62). Bu ağır zincir antikorları, geleneksel antikorlarda bulunan tüm hafif zincir ve C_{H1} alanından yoksundur. Bu nedenle, antijenler yalnızca ağır zincirin değişken alanı (V_HH) tarafından bağlanır. Bu değişken alan, tek bir polipeptit zinciri olarak var olduğundan, ana ağır zincir antikorumun tam antijen bağlama aktivitesini koruyan, son derece kararlı ve üretilmesi kolay bir antikor fragmanıdır (63,64). Bu özellikler, IAC uygulamalarında bağlayıcı ajanlar olarak kullanıldığında avantaj sağlar, çünkü antikor orijini sayesinde yüksek hedef seçiciliğini, çoklu bağlanma, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına dayanabilen küçük boyutlu bir afinite ligandı olarak işlev görür (65–70). Araştırmacılar ve üreticiler için hemen hemen her antikor formatının IAC tabanlı saflaştırılmasını kolaylaştırmak için benzersiz bir antikor alt etki alanı paneline yönelik bir dizi CaptureSelect™ afinite rezinleri geliştirilmiştir. Bazı CaptureSelect™ afinite rezinleri için bağlama özellikleri ve uygulamaları hakkında ayrıntılı bilgi Tablo 3'te özetlenmiştir. CaptureSelect™ afinite rezinlerinin protein A, G veya L bazlı ürünlerle farklılıkları vardır. Örneğin, fare veya sığır antikorlarına karşı çapraz reaktivite olmadan özellikle insan antikorlarına bağlanan CaptureSelect™ afinite rezinleri, farklı türlerden antikorları ayırt etme yeteneğine sahiptir. Bu özellik Kuroiwa ve ark. otolog sığır IgG antikorlarını birlikte eksprese eden transgenik sığırlardan alınan insan poliklonal antikorlarını spesifik olarak saflaştırma işlemine afinite reçinelerini dahil etmiştir (65). Afinite reçineleri yelpazesi ayrıca IgM ve IgA gibi IgG olmayan izotiplerin saflaştırılmasına yönelik araçları da içerir. Antikor Fab fragmanları için, protein A, G veya L'den farklı olarak, ağır zincirinde (C_{H1}) veya hafif zincirinde (C_L) bulunan bir Fab fragmanının sabit alanlarını hedefleyerek Fab saflaştırması için jenerik bir yaklaşım sağlayan çeşitli yöntemler kullanılabilir hale gelmiştir.

Tablo 3. CaptureSelect™ Afinite Rezinleri (71)

CaptureSelect™ Resin	Sub-domain	Antibody formats	Elution Buffer	Binding capacity
IgG-Fc	Fc	Whole IgG Fc fragments	0.1 M glycine, pH 3.0	>25 mg/mL
IgA	Fc	IgA Fc fragments	0.1 M glycine, pH 3.0	~8 mg/mL
IgM	Fc	IgM Fc fragments	0.1 M glycine, pH 3.0	>5 mg/mL
KappaXL	CL-kappa	IgG, A, M, D, E Fab fragments	20 mM citric acid, pH 3.5	29–38 mg/mL
LambdaXL	CL-lambda	IgG, A, M, D, E Fab fragments	25 mM sodium acetate, pH 3.5	>30 mg/mL
AAT-XL		AAT	20 mM Tris, 2.0 M MgCl ₂ , pH 6.0	15 mg /mL

Tüm CaptureSelect™ afinite rezinleri, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) uygulamaları için tipik olan akış hızlarına ve basınçlara dayanabilen agaroz bazlı katı desteklere kovalent olarak bağlıdır. FPLC'nin yanı sıra bu reçineler, tek kullanımlık spin (mikropipet) veya yerçekimi akışlı kolonlar kullanılarak pratik antikor saflaştırması için de kullanılabilir (3). Mikropipetlere entegre edilen afinite ligandları, tek bir saflaştırma adımında artan saflık ve verim sağlar ve biyofarmasötik ilaç geliştirmede ve klinik çalışmalarda iş akışlarını basitleştirmek ve zaman ve maliyeti azaltmayı sağlamaktadır. Ayrıca, afinite reçineleri tarafından sağlanan yüksek seçicilik nedeniyle, antikorların ve antikor fragmanlarının saflaştırılması, memeli, bitki veya mikrobiyal bazlı ekspresyon sistemlerinden plazma, serum veya asit gibi ham vücut sıvılarına kadar her türlü ortamda gerçekleştirilebilir.

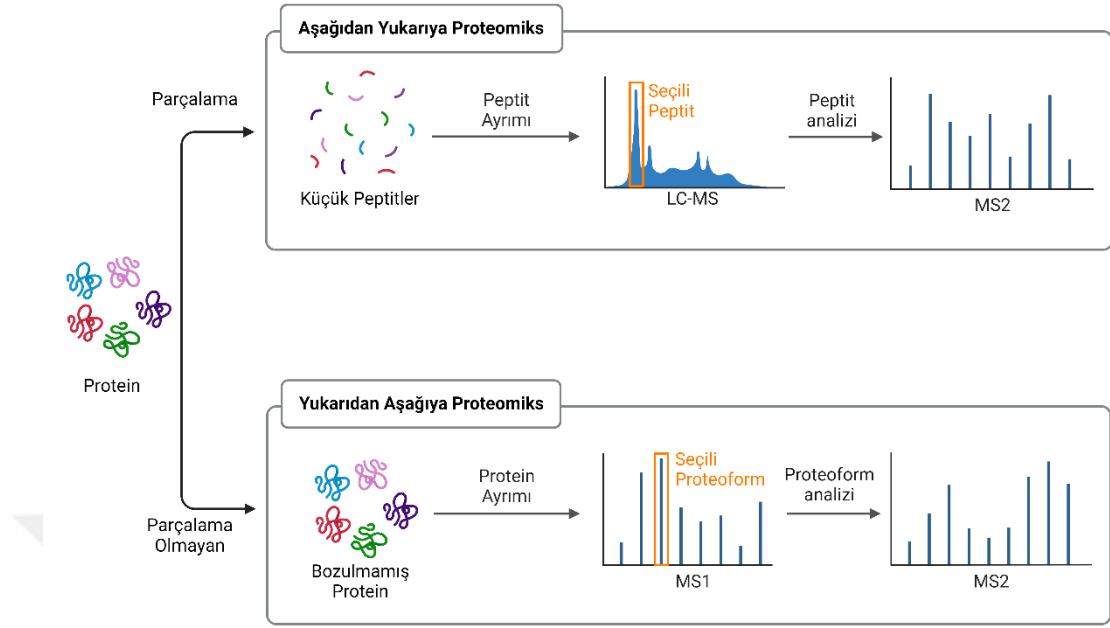
2.1.1.2.2.2 Mikropipet afinite kromatografisinde afinite ligandlarının kullanımı

Mikropipet afinite kromatografi platformu, az literatür örneği ile nispeten yeni bir tekniktir. Mikropipet afinite kromatografi, afinite ligandlarının (mikrolitre miktarlarda) bir pipet ucunun dibine sabitlendiği bir yöntemdir. Numune veya mobil faz, yükleme süresini artırmak için tipik olarak çoklu aspirasyon ve dağıtma

döngüleriyle kolon boyunca çift yönlü (yukarı, aşağı) pipetlenmektedir. Geleneksel dolgulu yataklarda olduğu gibi, mobil fazın dinamik akışı mikropipet kolon aracılığıyla kullanılır, ancak geleneksel bir kromatografi kolonunda görülen çoklu plakalar (ayırma aşamaları) yoktur. Mikropipet afinite kromatografi, paketlenmiş adsorbanın küçük bir yatak yüksekliğinden iki yönlü (yukarı, aşağı) akışla çalıştırılır. Mikro uç formatının diğer mikro ölçekli kromatografik tekniklere göre önemli bir avantajı, diğer yaklaşımlar için gerekli olan şekilde karıştırarak ve süzerek gevşek adsorban bulamaçlarını manipüle etme gereksinimi olmaksızın tam otomatikleştirme için basit bir yol sağlamaktadır. Sonuç olarak hem kolonda kalma süresi hem de temas süresi (toplam yükleme süresi) dikkate alınması gereken temel operasyonel parametrelerdir ve bunlar da aspirasyon-dağıtma döngü sayısı, numune hacmi, kolon boyutu ve akış hızının bir fonksiyonudur (72).

2.2 Mikropipet Afinite Kromatografi ile Birleştirilmiş Kütle Temelli Yöntem

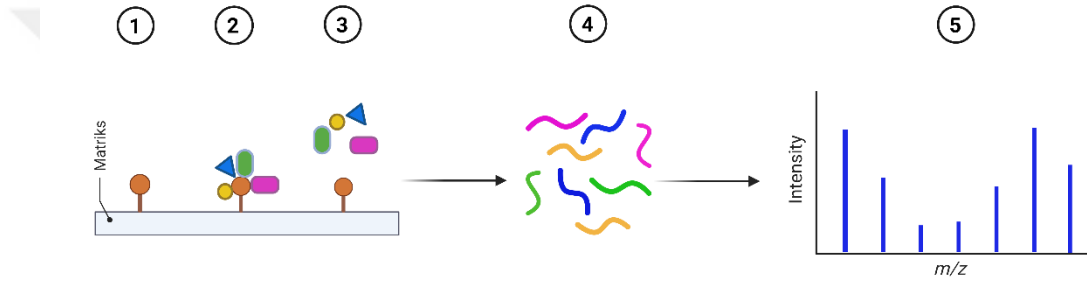
Kütle spektrometrisi (MS) tabanlı proteomik, karmaşık biyolojik numunelerdeki proteinlerin tanımlanması, ölçülmesi ve karakterizasyonu için güçlü bir araçtır (73). MS tabanlı iki proteomik yaklaşımı vardır: aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya proteomik (Şekil 3). Her biri proteinlerin ve protein etkileşimlerinin tanımlanması, protein ölçümünde önemlidir. Aşağıdan yukarıya proteomikte, proteinler önce parçalanır ve elde edilen peptitlerin MS analizi yoluyla elde edilen bilgiler, numunede bulunan proteinlerin kimliğini, miktarını ve modifikasyon durumunu anlamak için kullanılır (74,75). Yukarıdan aşağıya proteomikte, bozulmamış proteinler, numune karmaşıklığını azaltan (proteolitik parçalamanın bir sonucu olarak numune karmaşıklığının arttığı aşağıdan yukarıya MS'nin aksine) peptitler yerine bozulmamış proteinler analiz edilir ve bozulmamış proteinle ilgili (PTM'ler ve mutasyonlardan, kesilmelerden ve alternatif ekleme olaylarından kaynaklanan dizi varyasyonları dahil) tüm bilgileri korur (76,77). Ne yazık ki, bozulmamış proteinlerin fizikokimyasal çeşitliliği peptitlerinkinden çok daha fazla olduğundan, bozulmamış proteinlerin büyük ölçekli ayrımı zordur ve bu nedenle, geleneksel yukarıdan aşağıya çalışmalar öncelikle afinite saflaştırması (AP) yoluyla tek veya az sayıda proteinin analizine odaklanmıştır (78–80).



Şekil 3. MS tabanlı iki proteomik yaklaşımın iş akışı (BioRender.com ile oluşturuldu).

MS'den önce, duyarlılığı artırmak için belirli proteinlerin veya peptitlerin zenginleştirilmesi ve yakalanması, AP kullanılarak gerçekleştirilebilir (81,82). Protein komplekslerinin afinite saflaştırması ve ardından MS tarafından proteinlerin tanımlanması, protein-protein etkileşimlerinin ve komplekslerin hücrel konumlarının bir haritasını oluşturmak için güçlü bir araç olarak hizmet eder (83,84). Afinite saflaştırması gibi zenginleştirme stratejileri, karmaşık numunelerdeki bir protein alt kümesini incelemek için niteliksel ve niceliksel kütle spektrometrisi iş akışlarıyla birleştirilebilir. Afinite zenginleştirme, ilgilenilen proteinleri izole etmek için moleküller arasındaki spesifik bağlanma etkileşimlerini kullanır. Bu yaklaşımda, afinite saflaştırma kütle spektrometresi, protein kompleksleri içindeki spesifik protein-protein etkileşimlerini incelemek veya protein komplekslerine bakmak için kullanılabilir. Afinite saflaştırmasını MS'ye bağlayarak, etkileşimler farklı koşullar altında incelenebilir ve böylece protein-protein etkileşimlerinin çok daha dinamik bir görünümü sağlanır (85) (Şekil 4).

Kütle spektrometresi ile birleştirilmiş afinite saflaştırması (AP-MS), afinite tabanlı bir testtir. Spesifikliği ve duyarlılığı, büyük ölçüde ilgili proteinler arasındaki etkileşimin gücüne ve kararlılığına ve en önemlisi de hedef proteinlerinin mutlak ve göreceli bolluğuna bağlıdır (4). AP-MS'de, ilgilenilen tek bir protein veya molekül, bir matris içinde immobilize edilir. Daha sonra matrinden bir protein karışımı geçirilir ve etkileşim halindeki ortaklar hedef proteini tarafından yakalanır. Daha sonra yakalanan proteinleri tanımlamak için kütle spektrometrisine (MALDI, LC-MS/MS, vb.) dayanan herhangi bir teknik kullanılır.

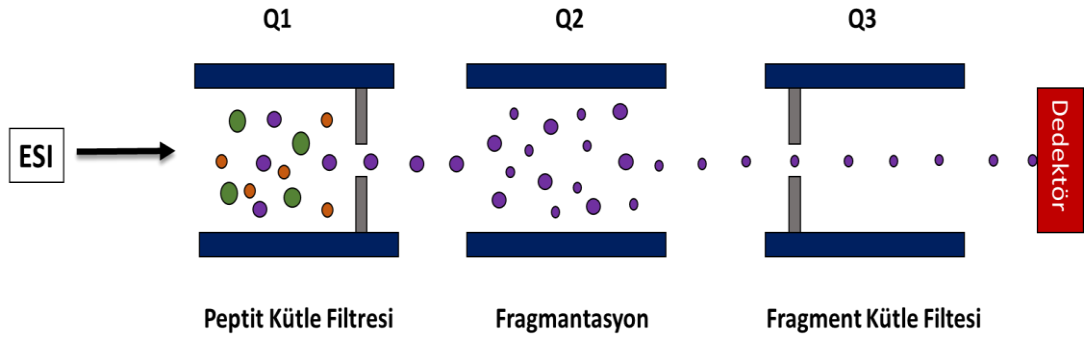


Şekil 4. Afinite saflaştırması ve kütle spektrometresi (AP-MS). Ligand proteini (turuncu) bir matris üzerinde immobilize edilmiştir [1]. Bir protein karışımı içinden geçirilir ve sadece etkileşen proteinler tutulur [2]. Sonraki adımda hedef proteinler elüe edilir [3]. Bir proteaz ile kesilir [4] ve elde edilen peptitler MS ile analiz edilir [5] (BioRender.com ile oluşturuldu).

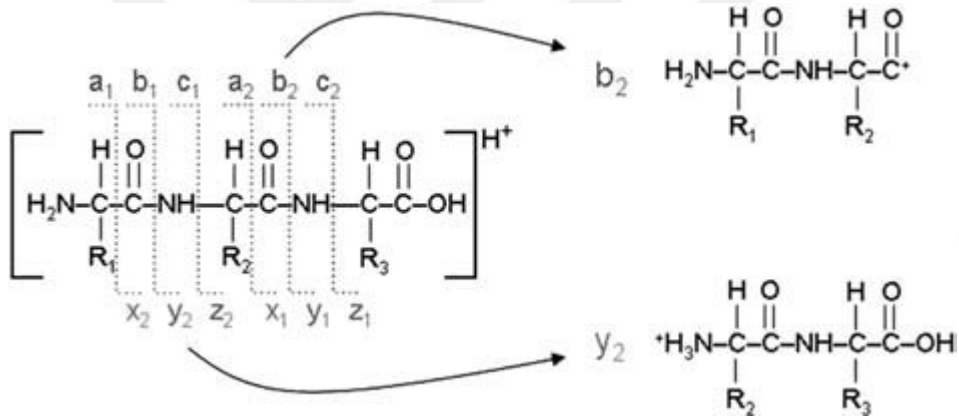
2.2.1 Triple quadrupole kütle spektrometresi

Triple Quadrupole kütle spektrometresi teknolojisi, 1970'lerin sonunda Christie G. Enke ve Richard A. Yost tarafından icat edildi (87). Triple Quadrupole kütle spektrometreleri seri olarak düzenlenmiş dört metal çubuğa periyodik bir voltaj uygulanarak moleküler iyonları belirli bir m/z ile iletir (88). Bu cihazlar, öncü peptit iyonlarını parçalamak ve yavru iyonları oluşturmak için çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) kullanarak analizin seçiciliğini artırır (89,90). Triple Quadrupole kütle spektrometresi, 4 tarama modunda çalışacak şekilde tasarlanmıştır: öncü iyon taraması, nötr kayıp taraması, ürün iyon taraması ve MRM/SRM.

Triple Quadropole kütle spektrometreleri ile birleştirilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM), insan plazması ve serumu gibi karmaşık biyolojik karışımlardaki spesifik peptitleri tespit etmek için geliştirilmiştir (91). MRM veya SRM MS, tek bir deneyde yüzlerce ile birkaç bin arasındaki hedefli peptitin eş zamanlı nicelemesi için oldukça hassas, spesifik ve uygun maliyetli analiz sunar (92,93). MRM, MS'nin yalnızca ilgilenilen belirli kütle/yük oranı (m/z) değerlerini izleyecek şekilde ayarlanmasını gerektirir ve bu nedenle düşük seviyeli peptitlerin saptanmasına izin verir (94). Bu tandem aletlerinin birinci kütle analizörü (Q1), bir hedef analitin bozulmamış iyonlarına karşılık gelen belirli bir kütle-yük oranındaki (m/z) iyonları seçici olarak iletebilir; bu iyonlara öncü iyonlar denir. Öncü iyonlar daha sonra uygun aletsel ayarlarda nötr gazla doldurulmuş bir çarpışma hücreinde (q2) çarpışma kaynaklı ayrışmaya (CID) tabi tutulur. Bu işlem, hedef analitin fragman iyonlarını üretir. Yüksek iyon yoğunluğuna ve özgüllüğüne sahip fragman iyonları, bir kez daha, bir kütle analizörü aracılığıyla seçici olarak iletilir. Ancak bu sefer ikinci kütle analizöründe (Q3) olur. İletilen iyonlar sonuç olarak kütle spektrometrelerinde iyon dedektörüne ulaşır ve tespit edilen sinyaller öncü-parça iyon çifti için bir iyon kromatogramı olarak kaydedilir (2) (Şekil 5). Peptit bağları nispeten zayıf olduğundan, tercihen CID işleminde bölünürler ve biri N-terminal ucunu ve diğeri peptitin C-terminal ucunu içeren iki peptit parçası ile sonuçlanır. Peptitin N-terminal ucunu içeren fragman iyonu "b-iyon" olarak adlandırılırken, C-terminal ucunu içeren fragman iyonu "y-iyon" olarak adlandırılır. Temel olarak, izole edilmiş bir peptit içindeki tüm peptit bağları bölünebilir; bu nedenle, yüklü peptitlerin parçalanması genellikle iki tamamlayıcı b- ve y-iyon serisinin üretilmesiyle sonuçlanır. b- ve y-iyonları, amino asit dizisi bilgisini sağlayan bir parçalanma modeli ile sonuçlanır (89) (Şekil 6).



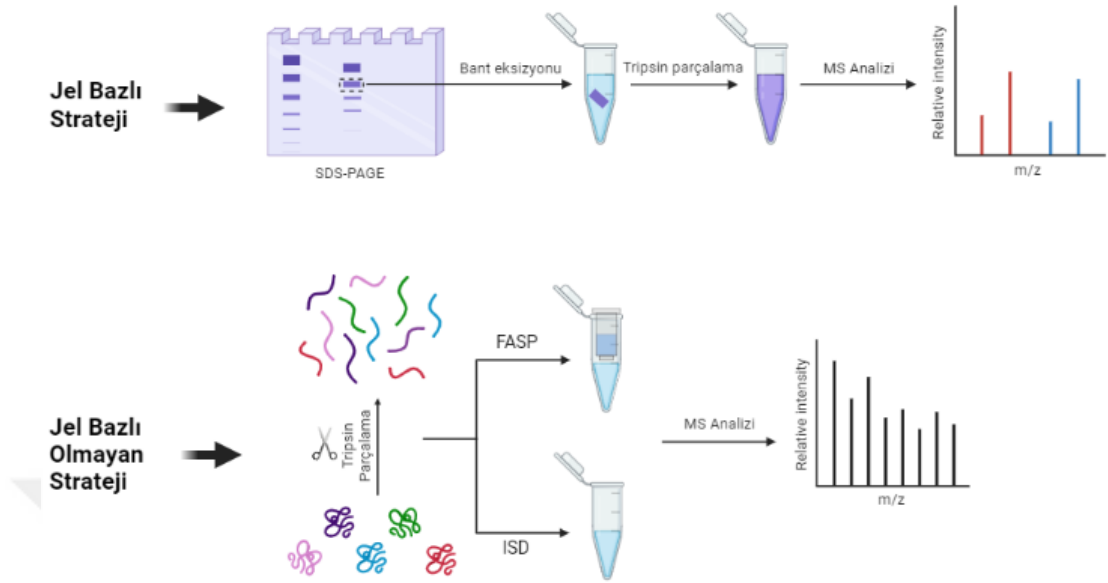
Şekil 5. Proteolitik substrat ölçümü için seçilmiş reaksiyon izleme (SRM). SRM için kullanılan triple quadrupole kutuplu (Q1–Q2–Q3) kütle spektrometresinin şematik diyagramı. ESI, elektrosprey iyonizasyon, sıvı kromatografi kolonundan kütle spektrometresine taşınan iyonize peptitleri temsil eder.



Şekil 6. MS/MS peptit parçalanma modeli. Parça iyonları, N-terminal parçası üzerinde yük taşıyan a, b ve c iyonları ile etiketlenir. Yüke sahip x, y ve z iyonları C-terminal parçasında tutulur (96).

2.2.1.1 Triple quadrupole kütle spektrometrelerinde peptit analizi

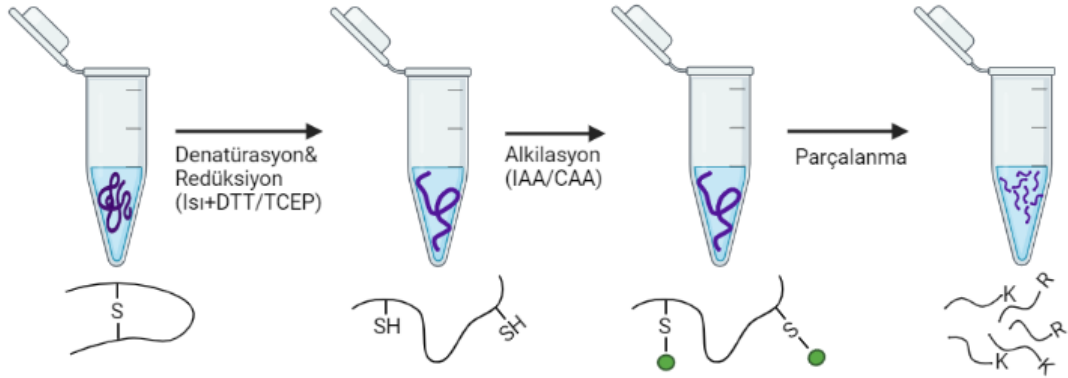
Proteinlerin enzimatik kesimi ya “in gel digestion” (jel içinde) ya da “in solution digestion” (çözelti içinde) gerçekleştirilir (97) (Şekil 7). Genel olarak, jel içi parçalama metodolojisi, 2-D elektroforez ile ayrılan proteinler için rutin hale gelirken, solüsyon içi parçalama genellikle LC-MS/MS analizinde kullanılır. Protein, karakteristik kütlesi ve modeli ile proteinin tanımlanmasına izin vermek için enzimatik olarak sınırlı sayıda daha kısa parçalara veya peptitlere kesilir (98).



Şekil 7. Yaygın olarak kullanılan iki proteomik strateji (BioRender.com ile oluşturuldu)

2.2.1.1.1 In solution digestion

In solution digestion yönteminde, potansiyel olarak proteinde bulunan sistinlerin veya sisteinlerin indirgenmesinde ve alkilasyonunda, proteinlerin disülfid bağları geri döndürülemez bir şekilde parçalanır ve üçüncül yapının optimal açılımı elde edilir. Bu kimyasal modifikasyon, yüksek sayıda disülfid bağına sahip proteinler için başarılı tanımlamanın yanı sıra en yüksek peptit verimine ve dizi analizine izin verir (100) (Şekil 8).



Şekil 8. In solution parçalanmanın iş akışı (BioRender.com ile oluşturuldu)

Peptitler, yüksek bolluklarına ve MS çalışmalarında tekrarlanan tanımlamalarına ve ayrıca ilgili protein için dizi özgüllüğüne göre seçilir (94). Kontrol peptitleri proteotipiktir ve ilgili bozulmamış proteinin temsili olarak işlev görür (102,103). Proteolitik enzim tripsin en sık kullanılanıdır ve avantajlıdır, çünkü triptik peptitlerde C-terminal ucu her zaman bir Lys- veya bir Arg-artığıdır (globin zincirinin C-terminal peptiti hariç). Lys ve Arg, amino asidin yan zincirinde bir amino grubu içeren temel amino asitlerdir. Bu amino grubu protonasyon ile yüklenir ve sıklıkla MS ile gözlemlenebilen belirgin çift yüklü y-iyonlarına yol açar (89).

2.2.1.2 Örnek ön hazırlama prosedürü

Tandem MS ile hedefli proteomik analizlerinde, analiz verimini önemli ölçüde iyileştirmenin bir yönü, numune ön hazırlık aşamasıdır. Plazma ve serum numunelerinin ön işleme yoluyla protein biyobelirteçlerinin zenginleştirilmesi, numune yükleme kapasitesini, LOQ'yu ve proteinlerin hedeflenen miktar tayini için doğrusal dinamik aralığı da önemli ölçüde iyileştirebilir. Plazma ve serum gibi insan proteom numuneleri için hazırlama teknikleri arasında yüksek miktarda protein tükenmesi, ön fraksiyonlama ve hedef analit zenginleştirilmesi yer alır (104,105). Bir insan plazma örneğinde, toplam protein içeriğinin %99'u albümin, immünglobulinler, haptoglobin, hemopeksin gibi proteinlerden oluşur. Biyolojik matris etkisini

hafifletmek için ayırma ve zenginleştirme stratejileri geliştirilmiştir. Afinite materyalleri kullanılarak insan plazmasında ve serumlarında bol miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması orta ve düşük bolluğa sahip proteinler için örnek yükleme kapasitesini önemli ölçüde artırabilir (2).

2.2.1.3 A1AT proteinin ölçümü için afinite kromatografi ile birleştirilmiş tandem kütle spektrometrisi

Alfa-1-Antitripsin (A1AT), nötrofil elastazın inhibisyonunda önemli rol oynayan 52-kDa'lık bir serpin proteinidir (serin proteaz inhibitörü) (5). Elastaz A1AT'nin birincil hedefidir ve bu serpinin insan lökosit elastazı tarafından proteolitik yıkıma karşı alt solunum yolunun korunmasında fizyolojik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (6). A1AT'yi (SERPINA1) kodlayan gen, kromozom 14'te bulunur ve ekspresyon başlıca hepatositlerde, ayrıca monositlerde ve makrofajlarda meydana gelir (106,107). Alfa-1 antitripsin eksikliği, A1AT genindeki mutasyonların neden olduğu çocuklukta karaciğer hastalıklarının ve erişkinlerde akciğer amfizeminin en sık görülen genetik nedenidir. A1AT eksiklikleri (A1ATD'ler), SERPINA1 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (5). A1AT eksikliği ile ilişkili hastalığın patogenezi ve şiddeti, SERPINA1 varyantlarının sayısına ve tipine bağlıdır. Bu genin 100'den fazla alel sapması tanımlanmış olmasına rağmen, çoğu patoloji (>%95), Z veya S fenotipleriyle sonuçlanan mutasyonlarla ilişkilidir (108). S veya Z fenotipleri olan kişilerde akciğer hastalığı (panasiner amfizem ve bronşektazi) gelişme riski yüksektir. Z tipi A1AT, karaciğer hepatositleri tarafından zayıf bir şekilde atılır ve bu, dolaşımda fonksiyonel A1AT kaybına yol açar. Aksine, S aleli eksiklikleri, A1AT'nin hızlandırılmış hücre içi bozulmasına bağlanır (5).

A1ATD teşhisi için nefelometri, genotipleme ve/veya fenotipleme yöntemlerinin kombinasyonu kullanılır. A1ATD teşhisi için geleneksel yöntem, nefelometri ile düşük serum AAT konsantrasyonunun belirlenmesi ve daha sonra izoelektrik odaklama (IEF) ile hastalıkla ilişkili spesifik varyantın tanımlanmasını içerir (7). A1AT'nin IEF ile fenotiplenmesi ilk olarak 1970'lerin sonunda başladı ve o zamandan beri SERPINA1 hedefli genetik testler ortaya çıktı. Bunlar arasında hedeflenen

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) erime eğrisi deneyleri, hedefli PCR floresansı ve tam gen dizilimi yer alır (109–111). IEF, geleneksel olarak proteinlerin pH 4-5 jeldeki migrasyon özellikleriyle görselleştirilen proteinaz inhibitörü (Pi) fenotipine göre adlandırılır (6,112). Ancak, izoelektrik noktadaki küçük farklılıkları ayırt edebilen yüksek çözünürlüklü bir yöntem olsa da , mutasyona uğramış varyantları normal alellerden ayırt etmek, yük durumlarında bir fark gerektirir. Çoğu, IEF yoluyla M hareketliliği olarak karakterize edilen bir proteinle sonuçlanan birkaç normal alel mevcuttur. Bu normal alellerin büyük çoğunluğu, IEF yoluyla geçişte küçük farklılıklar gösteren M1, M2, M3 ve M4 olarak adlandırılan varyantları kodlar. Buna göre, IEF kullanılarak bu alelleri ayırt etmek zordur ve bunlar genellikle topluca M alelleri olarak anılır (8). Ayrıca, IEF kolayca otomatikleştirilemeyen birkaç manuel adım gerektirir. S ve Z varyantları, azalmış S-A1AT seviyeleri ve hastalık ile en yaygın şekilde ilişkili iki varyanttır. S varyantını kodlayan alel, kodon 288'de (SERPINA1: c.863A > T, p.Glu288Val) ve Z varyantını kodlayan alel, kodon 366'da (SERPINA1 :c.1096G > A, p.Glu366Lys) bir glutamik asit-lizin ikamesine neden olan bir yanlış anlam mutasyonu içerir (113–115). Son çalışmalarda A1AT fenotiplemesinde LC-MS/MS yaklaşımı kullanılmıştır. LC-MS/MS, yüksek özgüllük ile kolayca otomatikleştirilmiş bir analitik iş akışı sunar ve protein fenotiplemesi için umut verici bir araçtır (5,7–9). LC-MS/MS tabanlı bir testin malzeme maliyetleri, bir IEF testinin maliyetlerinden yaklaşık 10 kat daha düşük olduğundan, prototip oluşturma IEF'ye göre önemli mali avantajları vardır. Bu maliyet tasarrufları, özellikle sağlık hizmetleri maliyet bilincinin arttığı bir çağda dikkate alınmaya değerdir (5).

Kütle spektrometrisine ek olarak hedef proteini içeren afinite kromatografi kullanılarak insan plazma ve serumunda bol miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması sağlanır. Böylece, A1AT gibi orta ve düşük bolluğa sahip proteinler için LC-MS/MS ile birleştirilmiş afinite saflaştırması, hedeflenen A1AT proteinin etkin izolasyonunu sağlar. Bu yöntem, analizin spesifikliğini ve duyarlılığını önemli ölçüde artırabilir.

2.2.2 MALDI-TOF MS

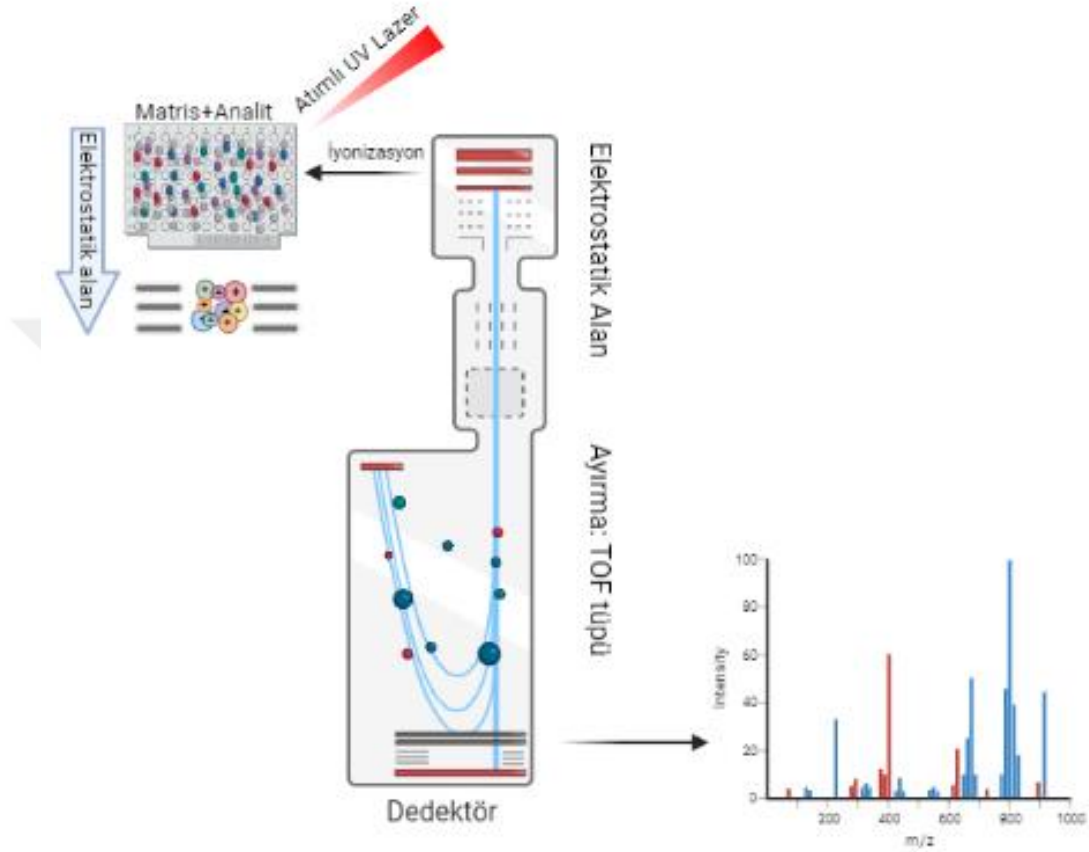
1980'lerde icat edilen matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), nispeten karmaşık numunelerdeki peptitleri ve proteinleri analiz etmek için kullanılan tekniklerden biridir (116,117). İlk olarak 1985 yılında Michael Karas ve arkadaşları tarafından büyük biyomoleküllerin analizi için tanımlanmıştır (118). MALDI-TOF MS'nin önemi, başarılı protein iyonizasyonunun gösterilmesi ile 2002 Nobel Kimya Ödülü'nün K. Tanaka'ya verilmesiyle kabul edilmiştir (116).

2.2.2.1 MALDI-TOF MS'in çalışma prensibi

Birçok metodolojik protokol olmasına rağmen, tüm MALDI-TOF MS analizi aşağıdaki adımlarda özetlenebilir: numune hazırlamanın çevrimdışı prosedürü; organik matrisin uygulanması ve birlikte kristalleşme, MALDI kaynağında örnek iyonizasyonu ve bir Uçuş Süresi (TOF) analizöründe üretilen iyonların hızlandırılması; iyonların kütle/yük oranlarına (m/z) dayalı olarak saptanması ve bir kütle spektrumunun oluşturulması (119).

Kısaca, numune, küçük organik bileşiklerin (matris) kristal yapısına gömülür ve iletken bir numune desteği üzerinde biriktirilir. Kokristaller, örneğin 266 veya 337 nm dalga boyuna sahip bir ultraviyole (UV) lazer gibi bir nanosaniye lazer ışını ile ışınlanır (120). Girilen enerjiler $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ W/cm² aralığındadır. Lazer enerjisi, ışınlanmış kristalin yapısal bozunmasına neden olur ve iyonların bir elektrik alanı tarafından özütlendiği bir parçacık bulutu oluşturur. Desorpsiyon sürecinin arkasındaki mekanizma tam olarak anlaşılmamakla birlikte lazer enerjisinin kristal moleküllerin titreşimsel salınımına dönüşümü olarak tanımlanabilir. Bu durum, kristalin parçalanmasına neden olur. Elektrik alanı boyunca ivmeyi takiben, iyonlar “field-free” bir yol boyunca sürüklenir ve son olarak detektöre (örneğin, bir ikincil elektron çoğaltıcı veya kanal plakası) ulaşır. İyon kütleleri (kütle-yük oranları [m/z]) tipik olarak, daha büyük moleküller için daha küçük olanlardan daha uzun olan TOF'ları ölçülerek hesaplanır (başlangıç enerjilerinin aynı olması şartıyla). Ağırlıklı olarak tek yüklü, parçalanmamış iyonlar üretildiğinden, ana iyon kütleleri, karmaşık

veri işlemeye gerek kalmadan elde edilen spektrumdan kolayca belirlenebilir. Kütlelere doğrudan işleme ve sonraki analizler için sayısal veriler olarak erişilebilir. Tipik bir MALDI deneyi sırasında ölçülen TOF'ler, birkaç mikro saniye aralığındadır (121) (Şekil 9).



Şekil 9. MALDI-TOF MS metodolojisi. Numune, numune hedefi üzerindeki matris ile birlikte kristalleştirilir ve MALDI iyon kaynağı (ultraviyole lazer vs.) tarafından desorbe edilir ve iyonize edilir. Mikrobiyal peptitler/proteinler dahil olmak üzere iyon molekülleri, elektrik alanı tarafından TOF analiz cihazına doğru hızlandırılır. Tüm iyonlar, m/z oranına ve bir kütle spektrumuna uygun olarak TOF ile ayrılır (BioRender.com ile oluşturuldu).

2.2.2.1.1 Numune hazırlama prosedürü

Güvenilir sonuçlar için numune kalite değerlendirmesi ve uygun numune hazırlama esastır. Çoğu durumda analitleri yakalamak veya tuzlar ve lipidler gibi interferansları gidermek için ön işlemler veya zenginleştirme adımları gerektiren farklı tipte numuneler (biyolojik sıvılar, hücreler, dokular, biyopsiler) analiz edilebilir. MALDI-TOF MS deneylerinde, herhangi bir numune hazırlama prosedürü MS analizinden bağımsızdır (123).

2.2.2.1.2 Matris uygulaması ve kristalizasyon

Biyolojik örneklerden ekstrakte edilen ve saflaştırılan proteinler veya peptit karışımı, tipik olarak UV bölgesinde lazer dalga boyunda güçlü bir optik absorpsiyon ile karakterize edilen matris olan uygun bir organik bileşik ile karıştırılır. Karışım bir hedef plaka (genellikle çoklu numunelerin uzamsal olarak ayrılmasına izin veren çok kuyulu bir destek olarak düzenlenen paslanmaz çelik bir plaka) üzerine spotlanır ve matris ile kristalleşir (havayla kurutur). Numune/matris karışımı plaka üzerinde kurduğunda, MS analizi başlayabilir. Bazı organik matrisler MS laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır: bozulmamış proteinleri analiz etmek için sinapinik asit ilk tercihtir, a-siyano-4-hidroksisinamik asit peptitler için ve Süper-DHB (DHB ve 2-hidroksi-5-metoksibenzoik asit karışımı) glikan analizi için genellikle kullanılmaktadır (124,125). Bu matrislerle ilgili ayrıntılı bilgi tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Yaygın MALDI matrisleri ve uygulama alanları (126)

Matris	Analit
Pikolinik asit (PA)	DNA, RNA
3-Hidroksipikolinik asit (HPA)	DNA, RNA
3-Aminopikolinik asit (APA)	DNA, RNA
Dihidroksibenzoik asit (DHB)	Oligosakkarit
α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit (α CHCA)	Peptit, lipid, oligonükleotit
Sinapinik asit (SA)	Protein
2-4-hidroksifenilazobenzoik asit (HABA)	Polimer
2,4,6-Trihidroksiasetofenon (THAP)	Polimer, glikopeptit, oligonükleotit
6,7-Dihidroksikumarin	Lipid

2.2.2.1.3 MALDI kaynağında örnek iyonizasyonu

MALDI kaynağı, TOF analizörleri için çok uygundur; MALDI-TOF MS, klinik proteomikte kullanılan en yaygın konfigürasyondur. TOF analizörü, iyonların “uçuş tüpü” adı verilen serbest alan bölgesinden yönlendirilmesine ve dedektöre doğru hızlandırılmasına olanak tanır (127). Kısaca, analit matris kristalleri, kristallerin desorpsiyonunu indükleyen bir lazer darbesi ile ısıtılır. Buhar fazında, matristen analite bir proton transferi meydana gelir. MALDI kaynağında üretilen yüklü iyonlar, sabit bir elektrik alan tarafından hızlandırılır ve benzer bir kinetik enerji kazanırlar. Daha sonra serbest alan uçuş tüpünden dedektöre doğru hareket ederler. Ayırma m/z 'lerine göre gerçekleşir. Sabit bir kinetik enerjide, farklı m/z 'ye sahip iyonlar, kütleleriyle ters orantılı olan farklı hızlarla hızlandırılır, böylece küçük iyonlar dedektöre önce ulaşır. Bu temel yapılandırma lineer mod olarak bilinir.

Kütle analizörünün önemli bir özelliği, cihazın küçük bir kütle farkıyla iyonları tespit etme yeteneğine bağlı olan çözünürlük gücüdür. Bir TOF analizöründe çözünürlük, spektrum zirvesinin Yarı Yüksekliğindeki Tam Genişlik (FWHM) olarak tanımlanır. Enstrümantal çözünürlüğü artırmak için etkili bir çözüm, Reflectron olarak da adlandırılan elektrostatik reflektörle donatılmış MALDI-TOF'un kullanılmasıdır (128,129). Bir iyon aynası görevi gören bu cihaz, iyonları saptıran ve onları uçuş

tüpünden geri gönderen bir geciktirici alan sağlar. Aynı m/z oranına ancak farklı kinetik enerjiye sahip iyonlar, elektrik alanında daha derine nüfuz edebilir ve böylece yansıtıcı içinde daha büyük bir mesafeyi kaplayabilir. Tersine çevrildikten sonra, sürüklenme bölgesinde belirli bir noktada daha yavaş iyonlara ulaşırlar ve aynı anda tespit edilirler. Bu alım modu, küçük peptitlerin ve moleküllerin (400-4,000Da) tespiti için daha yüksek çözünürlük ve daha yüksek kütle doğruluğu sağlar (119).

2.2.2.1.4 İyon m/z'nin tespiti ve kütle spektrumunun oluşturulması

İyon tespiti, MS analizinde son adımdır. Kısaca, algılama sistemi, genellikle bir elektrik sinyaline dönüştürülen ikincil elektronlar üreterek iyonların etkisini artıran mikro kanal plakaları olarak tasarlanmış bir İkincil Elektron Çarpanıdır. Dedektör, daha sonra analogdan dijitale dönüştürücüye yönlendirilen ve analiz için bir PC'ye iletilen çıkış voltajını sağlar. m/z oranları, iyonların uçuş tüpünde kaynaktan dedektöre gitmeleri için geçen süre ölçülerek hesaplanır. Kayıtlı iyonlar genellikle tek başına $[M+H]^+$ yüklüdür. MS numune profilleri, yatay ekseninde m/z değeri ve dikey ekseninde bu iyonun nispi bolluğu ile karakterize edilen tepe noktalarına sahip bir kütle spektrumu ile gösterilir. Bu farklı kazanımlar, klinik çalışmalarda büyük ölçüde kullanılan farklı proteomik stratejilerin temelini oluşturur. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile hem yukarıdan aşağıya hem de aşağıdan yukarıya proteomik yapmak mümkündür. “Yukarıdan aşağıya” stratejisi (proteinden peptit düzeyine), bozulmamış proteinlerin, proteoformlarının ve PTM'lerinin doğrudan analizi için kullanılır (75). “Aşağıdan yukarıya” stratejisi (peptitten protein seviyesine), genellikle proteaz enzimleri tarafından kesilen bir proteinden türetilen bir peptit karışımının analizine dayanır ve peptit dizisi hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir.

2.2.2.2 MALDI-TOF MS ile protein tanımlanması

Protein tanımlaması, bir proteinden türetilen bir peptit karışımının doğru kütle ölçümüne dayanan “peptit kütle haritalaması” adı verilen yöntemle gerçekleştirilir. Aşağıdan yukarıya bir yaklaşımla, peptit kütleleri MALDI-TOF MS tarafından saptanır. Spektrum, bu spesifik protein için benzersizdir (Peptit Kütle Parmak İzi,

PMF). Tanımlama, bilinen protein dizileri tarafından hesaplanan proteolitik peptit kütlelerinin bir veri tabanına (NCBI, SwissProt, TrEMBL, vb.) karşı peptit kütle değerlerinin araştırılmasıyla tamamlanır. Öte yandan, bozulmamış proteinler için yukarıdan aşağıya, klinik uygulamalarda MALDI-TOF kullanımıyla ilgili çekici bir stratejidir. Enzimatik parçalama gerekli olmadığından, analiz süresi büyük ölçüde azalır ve hassasiyet potansiyel olarak artar (74,130).

2.2.2.3 Örnek ön hazırlama yöntemleri

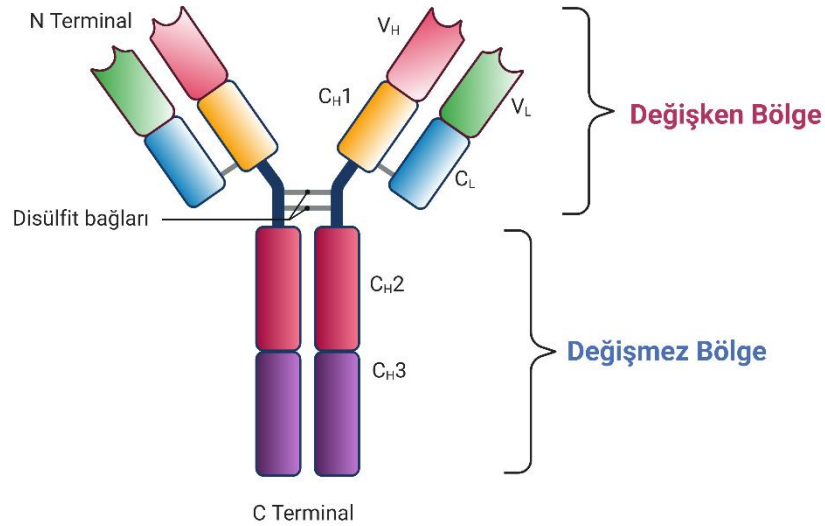
Serum/plazma proteomunun incelenmesi için, İnsan Proteom Organizasyonu (HUPO), daha az bol bulunanların saptanmasına müdahale eden yüksek oranda bol proteinlerin (örneğin albümin) çıkarılmasını tavsiye eder (131). Biyo-akışkanların, özellikle kan proteomunun karmaşıklığını azaltmak için, immün afinite kitleri ticari olarak temin edilebilir. Uygun dahili standartlar kullanılarak, MALDI-TOF MS ile birleştirilmiş immün afinite teknikleri, kantitatif biyobelirteç analizi için uygun araçlardır. Bununla birlikte hem numune hazırlamadaki hem de MALDI sürecindeki değişkenliği ve protein-protein etkileşimi ve numune hazırlamanın yüksek maliyeti gibi diğer faktörleri düzeltmek ve değerlendirmek için mevcut ve kullanışlı olan birkaç dahili standart, klinikte MALDI immünolojik testlerinin uygulanmasını azaltır. Boncuklar üzerindeki immün-zenginleştirmeye dayalı olarak, biyo-akışkanlardaki proteinleri ve peptitleri ölçmek için otomatik immün MALDI yöntemi (iMALDI) gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, diğer immün-MS testlerine kıyasla hem kolay numune hazırlamayı hem de hızlı MALDI ölçümünü sağlar (132).

2.2.2.4 Monoklonal gammopati, multipl myeloma ve alzheimer hastalığının teşhisinde immünglobulin ağır ve hafif zincir proteinlerinin ölçümü için afinite kromatografi ile birleştirilmiş MALDI TOF kütle spektrometrisi

Plazma hücre bozuklukları (PCD'ler), tek bir plazma hücresi klonunun çoğalması ile karakterize edilen bir grup bozukluktur (13,133). Çoğu PCD'nin teşhisi ve izlenmesinin merkezinde, genellikle genişleyen plazma hücre klonu tarafından aşırı üretilen monoklonal immünglobulin bileşenlerinin saptanması yer alır. Bu aşırı

üretileen monoklonal immünglobulinler (genellikle bir M-proteini veya paraprotein olarak anılır) polimerler, monomerler, serbest hafif zincirler ile ağır zincirlere ait immünglobulin zincirleri veya immünglobulin fragmanları olabilir (134).

Her M proteini, aynı sınıftaki iki ağır polipeptit zincirinden (IgG'de γ , IgA'da α , IgM'de μ , IgD'de δ ve IgE'de ϵ olarak belirtilen) ve iki hafif zincirden (κ veya λ) oluşur (Şekil 10). Monoklonal gammopatiler arasında anlamı bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS), multipl miyelom (MM), smoldering multipl miyelom (SMM), plazma hücre lösemi, sekretuar olmayan miyelom, soliter plazmositom (kemik veya ekstramedüller), POEMS (osteosklerotik miyelom), Waldenström makroglobülinemisi (WM), ağır zincir hastalıkları (HCD) ve primer sistemik amiloidoz (AL) hastalıkları yer alır (13). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda bazı nörodejeneratif hastalıkların (Alzheimer Hastalığı, Multiple Skleroz vb.) teşhisinde de M-proteinlerin etkisi gösterilmiştir. Bu nedenle serum ve idrarda bulunan sağlam immünglobulinler ve immünoglobulin serbest hafif zincirlerin saptanmasının, bu hastalıkların tanısında, prognozunda ve tedavisinin izlenmesinde önemli bir biyobelirteç olduğu bilinmektedir (10–12).



Şekil 10. İmmunoglobulin molekülünün yapısı (BioRender.com ile oluşturuldu)

M-proteini belirli bir hastada homojen ve tipik olarak sabitken, hastadan hastaya M-proteinlerinin heterojenliği önemlidir ve bu nedenle M-proteinlerini karakterize etmek ve tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Klinik laboratuvarlarda M-proteinlerinin saptanmasında çeşitli metodolojiler kullanılmaktadır. Kılcal elektroforez (CE), jel bazlı yöntemler (SPEP, IFE) ve sadece serbest hafif zincir analizine izin veren FLC testleri bu metodolojiler arasındadır. Serum protein elektroforezi (SPEP), M-proteininin saptanmasını ve göreceli olarak ölçülmesini sağlarken, serum immünfiksasyon elektroforezi (IFE), M-protein izotipinin oluşturulmasını sağlar (14). Ancak bu yöntemler belirli sınırlamalara sahiptirler. SPEP, monoklonal proteinlerin tespiti için en sık kullanılan laboratuvar testidir. Serum proteinleri bir jele veya bir kılcal tüpe yüklenir ve yük ve boyuta göre bir elektrik akımı ile ayrılır. Proteinler daha sonra görüntüleme için boyanır. Proteinler beş bölgeye veya fraksiyona göç eder (136). Ancak, tüm monoklonal proteinler, birlikte göç veya boya doygunluğu sorunları nedeniyle SPEP tarafından doğru bir şekilde ölçülemez. IgA, IgM gibi monoklonal proteinler, küçük olmaları ve diğer serum protein zirveleri ile göç edebilmeleri nedeniyle tanısız zorluğu yol açar. Bu da tespiti ve doğru miktar tayinini zorlaştırır (137–139). Ek olarak, SPEP üzerindeki M-bandı sadece bir M proteinini gösterir, ancak izotipleri ayırt etmez. Türü bulmak için immünfiksasyon gereklidir (136). Ek olarak, monoklonal gammopatiyi tanımlamada, SPEP analizinin tespit oranı %79,0 sensitiviteye sahiptir (140). M protein analizinde kullanılan IFE tekniği birçok klinik laboratuvarında kullanılmakla birlikte semi- kantitatif bir yöntemdir. IFE'nin optimum çözünürlüğün elde edilmesi için antiserum miktarının her hasta örneğine göre ayarlanması gerekliliği, elde edilen küçük bantların sonuçları klinik olarak yorumlamada zorlaştırması, tekrarlanabilirlik güçlüğü ve gerekli olan yüksek kalite antikor miktarının maliyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır (11,15). Ancak IFE, plazma hücre bozukluklarının tanımlanması için kullanılan en manuel laboratuvar testlerinden biri olmaya devam etmektedir. IFE'nin duyarlılığı, 0.1 g / dl monoklonal protein saptama sınırına sahiptir. Monoklonal gammopatiyi tanımlamada, serum IFE analizinin tespit oranı %87 sensitiviteye sahiptir. Ekstra reaktifler maliyeti IFE'yi daha az uygun hale getirir (136,140). CE ise jel bazlı yöntemlere (SPEP, IFE) bir alternatiftir. CE, UV detektörü kullanılarak görüntülenen proteinleri ayırmak için küçük delikli (10-100 lM), silika kılcal tüpler ve mikroakışkanlar kullanır (141).

Ancak CE sınırlı analitik duyarlılığa, zayıf çözünürlüğe sahiptir ve komigrasyon maddelerinde zorluklarla karşılaşmaktadır (142). CE bazlı izotipleme, immüntipleme (IT) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir, ancak bu yöntemler analitik olarak IFE'den daha az duyarlıdır (143). sFLC testi olarak bilinen Freelite testi (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, İngiltere) ise dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. FLC'ler, Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu kılavuzlarında tarif edildiği gibi miyelom ve ilişkili bozuklukların tanı ve tedavisinde kullanılan cevap kriterlerinden biridir. Bununla birlikte, bu yöntemin yararlılığına rağmen, reaktiflerin lot to lot değişkenliği, antijen fazlalığı, tanınmayan epitoplar ve aşırı polimerizasyon dahil olmak üzere analitik problemlerle karşılaşmaktadır Freelite testi, son derece yüksek FLC konsantrasyonu olan hastalarda antijen fazlalığına bağlı yanlış negatif sonuçlar gösterme olasılığının yanı sıra zayıf post-seyreltme doğrusallığı ve göreceli kesinsizlik sınırlamalarına sahiptir (144).

Alternatif olarak, M-proteinleri saptamanın analitik duyarlılığını ve özgüllüğünü geliştirmek için, serum ve idrardaki M-proteinleri ölçmek için MS tabanlı yöntemler mevcuttur (17,18,145). Doğrusal dinamik aralıktaki artışların yanı sıra çözünürlük ve kütle ölçüm doğruluğundaki artışlar, bu cihazları, geleneksel protein jel elektroforezi bazlı yöntemlere kıyasla proteinleri karakterize etmeye mantıklı bir alternatif haline getirmektedir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Planı

Bu tez çalışmasında, 4 farklı hastalık grubunun teşhisinde kullanılan yöntemlere alternatif olarak kütle spektrometrisi ile eşleştirilmiş mikropipet afinite kromatografi yöntemi uygulanmıştır.

3.2 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve firmaları

Kullanılan Sarf Malzeme	Firma-Kod
Mikro-spin kolon	Biorad, Thermo Scientific
CaptureSelect kappa (Hu) afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect lambda (Hu) afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect IgG-CH1 afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect IgG-CH3 afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect IgA afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect IgM afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
CaptureSelect A1AT afinite matrisi	Thermo Fischer Scientific
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Gibco
LC-grade su	Merck
Asetik asit	Supelco
Tris [2-karboksietil] fosfin (TCEP)	Sigma
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
DTT	GE Healthcare
IAA	GE Healthcare

Tablo 5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve firmaları (Devamı)

Kullanılan Sarf Malzeme	Firma-Kod
Tripsin	Promega
A-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA)	Bruker Daltonics
Trifloroasetik asit (TFA)	Sigma
Asetonitril	Merck
Formik Asit	Sigma
Amonyum bikarbonat	Merck
Protein standardı (MALDI)	Bruker Daltonics
Metanol	Supelco
Etanol	Supelco
Propanol	Merck

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz ve Aletler	Marka/Model
MALDI TOF Kütle Spektrometresi	Bruker Rapiflex TM
Triple Quadrupole Kütle Spektrometresi	Thermo Fischer Scientific
Laminer Kabin	Heraeus Instruments Lamin Air
Laminer Kabin	Tessan Laf kabini laf-00189
Derin Dondurucu Buzdolabı (+4 ⁰ C ve -20 ⁰ C)	Arçelik, Indesit
Concentrator plus	Eppendorf
Derin dondurucu (-80 ⁰ C)	VWR symphony
Hassas Analitik Terazî	Ohaus PIONEER
İnkübasyon Cihazı	VWR INCU-Line
pH Metre	Mettler Toledo

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri
(Devamı)

Kullanılan Cihaz ve Aletler	Marka/Model
Vorteks Lab dancer	IKA
Santrifüj Mikro 220R	Hettich Zentrifugen
Santrifüj	NUVE NF 048
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	AXYPET
Mikrosantrifüj Combi-Spin	Peqlab FVL-2400N
Su Banyosu	VWR Ultrasonic Cleaner USC-TH
Distile Su Cihazı	AquaMed Storm JR-İ NATİLUS
Çalkalayıcı	Grant-bio PMS-1000İ
Thermo Shaker	Grant-bio HC24N 24x1.5ml

3.3 Yöntemler

3.3.1 Klinik testlerde immünfiksasyon elektroforez analizine alternatif mikropipet afinite kromatografi analiz yöntemi geliştirilmesi

3.3.1.1 Örnek toplanması

IFE'yi içeren rutin klinik testler için Acıbadem Sağlık Grubu Laboratuvarı'na gönderilen serum örnekleri, her bir örnekten IFE analizi için gereken belli bir miktar alınarak, kalan örnekler ise 200 ul'lık hacimler halinde aliquatlarak MALDI-TOF MS analizine kadar -80 dolaplarda saklandı. İmmunoglobulin analizi için toplanan serum örneklerinin etiketlenmesi, depolanması ve örnek takibi amacıyla sistem oluşturuldu. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi İnsan Bilimsel ve Etik İnceleme Komitesi (Onay No: 2021-02 / 18) çalışmanın yürütülmesini onayladı. IFE analizi sonuçlarına göre gruplandırılarak, her bir grup /alt gruptan 50 serum örneği olmak üzere toplamda 350 örnek rastgele olarak seçildi. Seçilen örneklemin ait olduğu evreni temsil etmesi için rastgele (olasılıklı) seçim yapıldı. Bu nedenle rastgele seçim için online randomize sayı üreten bir web sitesi kullanıldı (<https://www.calculatorsoup.com/calculators/statistics/number-generator.php>).

Cinsiyete yönelik biası önlemek için her gruptan kadın (K) ve erkek (E) oranları eşit seçildi. Örnek seçiminde dışlama kriteri bulunmamaktadır. Gruplarla ilgili patolojik bilgiye göre dışlama kriteri bulunmamasının sebebi; monoklonal gammopatiler, plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması nedeniyle immünglobulinlerin aşırı üretilmesi sonucu meydana gelen bir grup hastalıktır ve bu nedenle monoklonal gammopati değerlendirilmesinde, patolojik durumun nedeninden bağımsız olarak ölçüm gerçekleştirilmektedir. Monoklonal gammopatinin altında yatan patolojik durumun nedeni ileriki değerlendirme yöntemleriyle netlik kazanmakla beraber, monoklonalitenin ölçümünü etkilememektedir.

Gruplar aşağıda belirtilmiştir:

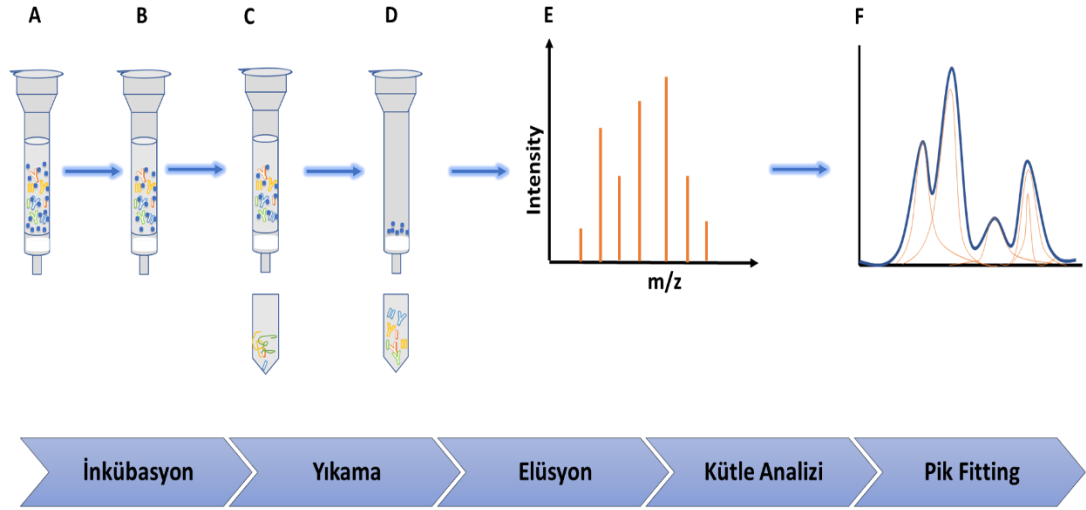
- 1) Poliklonal (kontrol grubu) (50 örnek)
- 2) Monoklonal (hasta grubu) (300 örnek)

- a.) IgG kappa (50 örnek)
- b.) IgG lambda (50 örnek)
- c.) IgA kappa (50 örnek)
- d.) IgA lambda (50 örnek)
- e.) IgM kappa (50 örnek)
- f.) IgM lambda (50 örnek)

Bu örnekler, klinik jel bazlı IFE yöntemine kıyasla MALDI-TOF MS bazlı yöntemin performansını karşılaştırmak için kullanıldı. Kontrol numuneleri sağlıklı bir şekilde immünglobulinlerin m / z dağılımlarını tanımlamak ve değişen M-proteinleri olan hastalardan üretilenlerle karşılaştırmak için referans kütle spektrumları oluşturmak için kullanıldı.

3.3.1.2 İmmunoglobulin zenginleştirme

Serum numuneleri, daha önceden tanımlanmış ve revize edilen bir prosedürle immünoglobulin grupları için immün-zenginleştirildi (17). İşlem sırasında mikropipet kolonları ve afinite rezinleri kullanıldı (Şekil 11). Kısaca, 1 uL kappa (κ) ve 1 uL lambda (λ) afinite rezin karışımı (κ ve λ 'nın birlikte izolasyonu için), mikro-pipet kolonlarında 250 uL PBS ile seyreltilmiş 50 uL serum örneği ile oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra mikro-pipet kolonlarındaki rezinler iki kez 200 uL PBS ile yıkandı. İmmünglobulinler, 50 mmol/L Tris [2-karboksietil] fosfin (TCEP) içeren 40 uL asetik asit (%5) kullanılarak elüe edildi. Elüsyon, LC ve HC arasındaki disülfid bağlarının bölünmesiyle sonuçlandı.



Şekil 11. Çalışmanın çalışma tasarımı ve iş akışı. A) İlk olarak serum örnekleri rezinle enkapsüle edilen mikropipetlere eklenir. B) Karışım inkübe edilir. Böylece rezinler, serumdaki insan kappa ve lambda hafif zincirleri üzerindeki sabit alana bağlanır. C) Daha sonra bağlayıcı olmayan proteinler yıkanarak uzaklaştırılır. D) TCEP içeren elüsyon tamponu, LC ve HC arasındaki disülfid bağlarının bölünmesine neden olur. E) Numuneler, kütle analizi için MALDI-TOF MS ile analiz edilir. F) Son olarak, veriler pik çözümleme ile değerlendirilir.

Çalışmada insan λ ve κ hafif zincirlerinin sabit alanını hedefleyerek izolasyonlarını sağlayan LC-lambda (Hu) ve LC-Kappa (Hu) CaptureSelect™ reçinelerini kullandık. Bu reçineler, insan κ ve λ hafif zincirlerinin (LC) sabit alanında korunan bir epitopa bağlanır. Ayrıca bu bağlanma, immünoglobulin ağır zincirinin alt sınıfından veya izotipinden bağımsızdır. Bu nedenle reçineler, κ ve λ hafif zincirlerini ve bunların Fab parçalarını içeren insan Ig'lerini (IgG, IgA, IgD, IgE ve IgM) saflaştırmak için tasarlanmıştır (Tablo 7) [37, 38].

Tablo 7. Çalışmada kullanılan CaptureSelect™ afinite rezinleri

CaptureSelect™ Resin	Sub- domain	Antibody formats
KappaXL	CL-kappa	IgG, A, M, D, E Fab fragments
LambdaXL	CL-lambda	IgG, A, M, D, E Fab fragments

3.3.1.3 MALDI-TOF MS analizi

İmmün-zenginleştirilmiş örnekler daha önceden tanımlanmış ve revize edilen bir prosedürle MALDI-TOF MS ile analiz edildi (17). Matris çözeltisi, 1:1 asetonitril/su karışımı içinde %0,1 trifloroasetik asit içinde çözölmüş 10 mg/ml a-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) içeriordu. 0,6 ul örnek ve 0,6 ul matris solösyonu bir çelik hedef plaka (Bruker Daltonics) üzerine spotlandı ve MALDI-TOF MS (Bruker Rapiflex™ Ltd) analizinden önce oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Toplam immünglobulin profili, uygun lazer yoğunluğu ile pozitif iyon lineer modda MALDI-TOF MS kullanılarak yapıldı. 8400 ila 32000 m/z aralığında veri alımı gerçekleştirilmiştir. Kütle analizi sırasında, spektrum başına 300 atış yapılmıştır. Analiz sonuçları, Flex Analysis yazılımı (Bruker) kullanılarak görüntölendi.

3.3.1.4 Veri analizi

İmmünglobulinlere spesifik pikler, farklı Ig oranlarından dolayı sabit bir yapı teşkil etmediğinden, analiz sonrası Ig tanımlama işleminin gerçekleştirilebilmesi için, spektroskopi ve kromatografi analizleri için doğrusal olmayan bir tepe ayırma yazılımı olan ve ticari olarak satın alınan PeakFit 4.12 yazılımı (Systat Software Inc, Richmond, CA) kullanılarak piklerin yarı yüksekliğindeki genişliği (FWHM) ve piklerin altındaki alanlar (AUC) belirlendi. PeakFit yazılımı, karmaşık, örtüşen sinyalleri parçalarına ayırmak için kullanıldı. Gürültüyü azaltmanın ve tepe noktalarını ölçmenin en doğru yolu, doğrusal olmayan bir eğri uydurma yapmaktır. Çünkü omuzlu veya gizli tepe noktaları, çok fazla gürültü veya önemli bir arka plan sinyali olduğunda yanlış sonuçlara yol açabilir. Buna göre ilk adım olarak ASCII formatındaki tepe verileri PeakFit'e alınmış ve seçilen fit fonksiyonları girdi olarak eklenmiştir. Arka plan farklı bir lineer, polinom, sabit, üstel, logaritmik, hiperbolik, güç, parametrik olmayan, kübik veya ikinci dereceden bir model olarak uygun olabilir. Best D2 sekmesi ile her numune spektrumuna uygun bir arka plan belirledik. Bu uygun taban çizgisi daha sonra her bir tepe karakterizasyon verisi (alanlar gibi) hesaplanmadan önce çıkarıldı ve daha doğru sonuçlar verdi. Daha sonra, ayrı ve örtüşen Gauss tepe noktalarının eğrilerinin altındaki alanlar, yinelemeli bir en küçük kareler eğri uydurma prosedürü kullanılarak

hesaplandı. Arka plan çıkarma ve yinelemeli en küçük kareler eğri uydurma, κ ve λ piklerinin yarı yüksekliklerindeki genişlikleri (FWHM) hesaplamak için kullanıldı. PeakFit programında gizli tepe noktaları otomatik olarak yerleştirmek için Artıklar prosedürünü kullandık. Son olarak, Kalıntılar prosedürü kullanıldı. Bu prosedürle, tepeler ilk olarak Savitzky-Golay algoritması tarafından düzleştirilmiş bir veri akışında yerel maksimumlar bulunarak yerleştirildi. Standart hata, belirleme katsayısı (R^2), %95 güven aralığı (CI) ve uyum için F istatistikleri gibi eğri uydurma kriterleri gösterildi.

3.3.1.5 İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki kıyaslama ve ileri analizler için Analyze-it for Microsoft Excel Method Comparison Edition (v30.2, Analyze-it Software Ltd., Leeds, UK) yazılımı kullanıldı. İki yöntemin uyumunu değerlendirmek için Cohen's kappa coefficient (κ) kullanıldı.

3.3.1.6 Mikropipet afinite kromatografi sistemi optimizasyon çalışmaları

Biyolojik materyallerdeki komplekslik ve içerik farklılıkları, izolasyon basamaklarındaki etkinliklerin farklı olmasına neden olmaktadır. Her bir örnek çeşidinin, oluşturulan immünglobuline özgü test afinite kromatografisi ile etkin izolasyonu için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Farklı solvent karışımları, basamaklardaki işlemlerin tekrar sayısı ve sürelerinin izolasyonun performansına etkisi incelendi, en etkin izolasyonu sağlayacak şekilde optimize edildi. Bu şekilde örnekten örneğe insan kaynaklı muhtemel varyasyonlar elimine edildi. Yazılım optimizasyonu için, veri setinin anlamlandırılmasına yönelik analizler gerçekleştirildi ve bir yöntem optimizasyonu yapıldı. Buna göre, rastlantısal oranlarda hazırlanan (fakat karıştırılan miktarlar bilinen) immünoglobulin karışımları MALDI-TOF/TOF ile okundu; elde edilen değerler ölçülen ve gerçek değerler olarak raporlanarak ve bir veri seti oluşturuldu. Bu veri seti bir eğitime veri seti (training dataset) olarak değerlendirildi.

MALDI-TOF MS analizi sonucunda elde edilen Ig spesifik m/z spektrasının alınarak, peak fitting algoritmasını kullanan yazılımın optimizasyonu sağlandı.

3.3.1.7 Mikropipet afinite kromatografi sistemi validasyon çalışmaları

Yöntemin analitik uygulamaların gereksinimlerini karşılayıp karşılamadığını değerlendirmek için yöntemin doğrusallığı, LoD, LoB, seçiciliği, doğruluğu ve kesinliğini değerlendirilmek için kalitatif testler için kullanılan uluslararası kılavuzlardaki (CLSI EP12-A2-User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition) yönergeler takip edildi (146).

3.3.2 Klinik testlerde immünfiksasyon elektroforez ve serbest hafif zincir (FLC) testlerine alternatif, mikropipet afinite kromatografi ve analiz yöntemi geliştirilmesi

3.3.2.1 Örneklerin toplanması

Freelite analizini içeren rutin klinik testler için Acıbadem Sağlık Grubu Laboratuvarı'na gönderilen 110 serum örneği çalışmaya dahil edildi. Serum örneklerinden Freelite analizi için gereken belli bir miktar alındı ve kalan örnekler 200 ul'lık hacimler halinde alikvatlarak MALDI-TOF-MS analizine kadar -80 dolaplarda saklandı. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi İnsan Bilimsel ve Etik İnceleme Komitesi çalışmanın yürütülmesini onayladı.

3.3.2.2 Freelite ölçümü

Serum numunelerindeki κ -FLC ve λ -FLC konsantrasyonları, üreticinin talimatlarına göre serbest hafif zincir immünassay (Freelite, The Binding Site, Birmingham, UK) ile BN ProSpec® sistemi (Siemens Healthcare Diagnostics) kullanılarak nefelometri ile analiz edildi.

3.3.2.3 İmmünglobulin zenginleştirme

Serum numuneleri, Mills ve ark. tarafından daha önce tanımlanmış bir prosedüre uygun olarak immünglobulin için immünglobulin afinite rezinleri kullanılarak immün-zenginleştirmeye tabi tutuldu (17). Her bir serum örneğine ayrı ayrı 2 benzersiz immünglobulin zenginleştirme yapıldı. Ig zenginleştirme, serbest kappa ve lambda immünglobulinlerin sabit alanlarına karşı yönlendirilen spesifik immünglobulin afinite rezinleri (kappa ve lambda) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, mikropipetlere enkapsüle edilen immünglobulin afinite rezinleri, PBS içerisinde seyreltilmiş serum ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Üst faz çıkarılarak, rezinler 2 kez PBS ile yıkandı. Son aşamada, %5 asetik asit kullanılarak elüte edildi.

3.3.2.4 MALDI-TOF MS analizi

Analiz, Mills ve ark. tarafından daha önce tanımlanmış bir prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi (17). Ancak prosedür laboratuvar altyapımıza göre revize edilmiştir. Bu amaçla, immüno-zenginleştirilmiş her örnek için, ilk olarak 1% trifloroasetik asit (TFA) içeren asetonitril:su (50:50) karışımı içerisinde çözülmüş α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA, 10 g / L) matriksi ile karıştırıldı ve 384 oyuklu çelik Bruker hedef plakası (Bruker Daltonics) üzerindeki her kuyuya hazırlanan matriks çözeltisinden spotlanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminin ardından, matriks çözeltisi eklenen kuyulara immün-zenginleştirilmiş örneklerden eklenerek tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Analize hazırlanan hedef plaka, kalibrasyonları tamamlanmış MALDI-TOF kütle spektrometresi (Bruker Rapiflex™) cihazına yerleştirildikten sonra, pozitif iyon modunda, uygun lazer atışı ile iyonizasyon gerçekleştirildi. Analiz süresince, immünglobulinlere spesifik 9000-32000 m / z aralığına karşılık gelen kütle spektrası elde edildi.

3.3.2.5 Pik Fitting analizi

MALDI analizinden sonra, spektrum Flex Analysis yazılımı (Bruker) kullanılarak görüntülendi. Ig hafif zincir proteinlerinin oluşturduğu veri, spektrum pikleri olarak gözlemlendi. Bu pikler farklı kappa ve lambda oranlarından dolayı sabit bir yapı teşkil etmediğinden, analiz sonrasında tanımlama işleminin gerçekleştirilebilmesi için peak-fitting algoritması geliştirildi. Ig serbest hafif zincir proteinlerine spesifik piklerin yarı yüksekliğindeki genişliği (FWHM) ve piklerin altındaki alanlar (AUC), hastaları ve kontrolleri değerlendirmek için spektroskopi ve kromatografi analizleri için doğrusal olmayan bir tepe ayırma yazılımı olan PeakFit 4.12 yazılımı (Systat Software Inc, Richmond, CA) ile belirlendi.

3.3.2.6 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Analyse-it for Microsoft Excel Method Comparison Edition (v30.2, Analyse-it Software Ltd., Leeds, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Yöntemler ile elde edilen sonuçlar arasındaki uyumu değerlendirmek için kappa (κ) katsayısı hesaplandı. Kappa katsayısının değerlendirilmesinde, κ katsayısı = 0,81–1 neredeyse mükemmel uyum, 0,61–0,8 olduğunda iyi bir uyum, 0,41–0,60 orta düzeyde uyum, 0,21–0,40 zayıf düzeyde uyum, 0,01–0,20 önemsiz düzeyde uyum, <0 uyuşma olmadığını belirtmektedir (147).

3.3.3 Alzheimer hastalığının teşhisinde mikropipet afinite kromatografi ile analiz yöntemi geliştirilmesi

3.3.3.1 Örneklerin toplanması

Toplam 43 denek çalışmaya dahil edildi. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan sağlıklı kontrol (n=21) ve hasta (n=22) serum örnekleri alındı. Sağlıklı koşullarda referans kütle spektrumları üretmek için LC m/z dağılımlarının tanımlanmasında kontrol örnekleri kullanıldı. Böylece, farklı M-proteinleri olan hastalardan üretilen kütle

spektrumları ile karşılaştırıldılar. Hasta serum örnekleri, revize edilmiş Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü ve Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Derneği (NINCDS-ADRDA) kriterlerine göre dahil edilen örneklerden seçildi (148). Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi İnsani Bilimsel ve Etik İnceleme Kurulu bu çalışmanın yapılmasını onayladı.

3.3.3.2 İmmunoglobulin zenginleştirme

Hastalar ve kontrol serum örnekleri, hafif zincirler için immüno-zenginleştirildi. İşlem sırasında mikro-pipetlere enkapsüle edilen afinite reçineleri kullanıldı. Kısaca, 1 uL kappa (κ) ve 1 uL lambda (λ) afinite reçineleri karışımı (κ ve λ 'nın birlikte izolasyonu için) 50 uL serum ile oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandı. Ardından, mikropipet kolonlarında 250 μ L PBS ile seyreltildi. Daha sonra mikropipet kolonlarındaki rezinler iki kez 200 uL PBS ile yıkandı. LC immünglobulinleri, 50 mmol/L Tris [2-karboksietil] fosfin (TCEP) içeren 40 uL asetik asit (%5) kullanılarak ayrıştırıldı. Elüsyon, LC ve HC arasındaki disülfid bağlarının bölünmesiyle sonuçlandı.

3.3.3.3 MALDI-TOF MS analizi

İmmün-zenginleştirilmiş numuneler MALDI-TOF MS analiz edildi. 1:1 asetonitril/su karışımı içinde %0,1 trifloroasetik asit içinde çözülmüş 10 mg/ml asiyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) içerecek şekilde matris çözeltisi hazırlandı. 0.6 ul numune ve matris solüsyonu bir çelik hedef plaka (Bruker Daltonics) üzerinde spotlandı ve MALDI-TOF-MS (Bruker Rapiflex™ Ltd) analizinden önce oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. LC profillemeye, uygun lazer yoğunluğu ile pozitif iyon lineer modda MALDI-TOF MS kullanılarak yapıldı. 8400 ila 32000 m/z aralığında veri alımı gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.4 Veri analizi

Kappa ve lambda piklerinin altındaki alanlar, hastaları ve kontrolleri değerlendirmek için spektroskopi ve kromatografi analizleri için doğrusal olmayan bir

pik ayırma yazılımı olan PeakFit 4.12 yazılımı (Systat Software Inc, Richmond, CA) tarafından belirlendi. PeakFit yazılımı, karmaşık, örtüşen sinyalleri parçalarına ayırmak için kullanıldı. Gürültüyü azaltmanın ve tepe noktalarını ölçmenin en doğru yolu, doğrusal olmayan bir eğri uydurma yapmaktır. Çünkü omuzlu veya gizli tepe noktaları, çok fazla gürültü veya önemli bir arka plan sinyali olduğunda yanlış sonuçlara yol açabilir. Buna göre ilk adım olarak ASCII formatındaki tepe verileri PeakFit'e alınmış ve seçilen fit fonksiyonları girdi olarak eklenmiştir. Arka plan, farklı bir doğrusal, polinom, sabit, üstel, logaritmik, hiperbolik, güç, parametrik olmayan, kübik veya ikinci dereceden bir model olarak uygun olabilir. Best D2 sekmesi ile her numune spektrumuna uygun bir arka plan belirledik. Bu uygun taban çizgisi, daha doğru sonuçlar veren her bir tepe karakterizasyon verisi (alanlar gibi) hesaplanmadan önce çıkarıldı. Daha sonra, ayrı ve örtüşen Gauss tepe noktalarının eğrilerinin altındaki alanlar, yinelemeli bir en küçük kareler eğri uydurma prosedürü kullanılarak hesaplandı. Arka plan çıkarma ve yinelemeli en küçük kareler eğri uydurma, κ/λ oranlarının tanımını basitleştirdi. PeakFit programında gizli tepe noktaları otomatik olarak yerleştirmek için Artıklar prosedürünü kullandık. Son olarak, Kalıntılar prosedürü kullanıldı. Bu prosedürle, tepeler ilk önce Savitzky-Golay algoritması tarafından düzleştirilmiş bir veri akışında yerel maksimumlar bulunarak yerleştirildi. Daha sonra, kalıntı piklerin meydana geldiği kenarlara gizli pikler eklenmiştir. Standart hata, belirleme katsayısı (R^2), %95 güven aralığı (CI) ve uyum için F istatistikleri gibi eğri uydurma kriterleri gösterildi. Sonuç olarak hasta ve kontrol örneklerinin eğri alanları PeakFit yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve ardından veriler istatistiksel analiz ile değerlendirilmiştir.

3.3.3.5 İstatistiksel analiz

Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren verilerle kontrol ve hasta grupları arasındaki karşılaştırmalar, bağımsız örnekler t-testi kullanılarak yapıldı. Veriler daha sonra temel bileşen analizi (PCA) ve değişken trend analizi için EZinfo 3.0 yazılımı (MassLynx v4.1, Waters) ile analiz edildi. AD ve sağlıklı kontroller arasında ayırım yapmada serum κ/λ LC oranının sensitivite ve spesifitesini incelemek için Alıcı-işletim karakteristik (ROC) analizi

yapıldı. ROC eğrisi altındaki alan (AUC), tanısal etkinliği ve serum κ/λ LC oranının farklı kesme noktalarını değerlendirmek için kullanıldı. Optimum cut-off noktası Youden indeksi ile belirlendi (149). Ayrıca optimal kesme noktasına göre sensitivite, spesifite değerleri hesaplandı. Analizler sırasında istatistiksel anlamlılık için $p<0,05$ kabul edildi. İstatistiksel analizler 15.8 (MedCalc Software BVBA, Belçika) ve PASW Statistics for Windows, Version 18 (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak yapıldı.

3.3.4 Klinik testlerde mevcut alfa-1 antitripsin analizine alternatif mikropipet afinite kromatografi ve analiz yöntemi geliştirilmesi

3.3.4.1 Örneklerin toplanması

A1AT eksikliğinin değerlendirilmesi için Acıbadem Sağlık Grubu Laboratuvarı'na gönderilen hasta ve sağlıklı serum örnekleri çalışmaya dahil edildi. Serum örneklerinden A1AT ölçümü ve genotiplemesi için gereken belli bir miktar alındı ve kalan örnekler 200 μ l'lik hacimler halinde aliquatlararak LC-MS/MS ile fenotipleme analizine kadar -80 dolaplarda saklandı. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi İnsan Bilimsel ve Etik İnceleme Komitesi (Onay No: 2021-11/03) çalışmanın yürütülmesini onayladı.

3.3.4.2 Nefelometri ile A1AT ölçümü

A1AT konsantrasyonları, ticari olarak temin edilebilen reaktifler ve standartlar ile prospektüse uygun olarak Human A1AT'e Antiserum kullanılarak bir Siemens BN II analiz cihazında ölçüldü. Sağlıklı deneklerde A1AT için normal referans aralığı 90-200 mg/dl'dir. Tüm numuneler analizden önce 4°C'de saklandı. Tüm tahliller üreticinin talimatlarına göre yapıldı.

3.3.4.3 A1AT izolasyonu

Serum numuneleri, A1AT proteinine özgü afinite rezini kullanılarak ayrıştırıldı. Bu amaçla, mikro-pipetlere enkapsüle edilen A1AT proteinine özgü afinite rezin, PBS

içerisinde seyreltilmiş serum ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Üst faz çıkarılarak, rezinler 2 kez PBS ile yıkandı. Son aşamada, 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) kullanılarak elüte edildi.

3.3.4.4 A1AT proteinin peptitlerine ayrıştırılması

A1AT proteinin peptitlerine ayrışması için “in solution digestion” yöntemi uygulandı. İlk olarak, örnekler 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözölmüş 20 mM ditiyotritol çözeltilisinden (indirgeme tamponu) 2 ul eklendi ve örnekler 95°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere 2ul 50 mM İyodoasetamit (alkilasyon tamponu) eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tüm örnek tüplerine 1ug Tripsin eklendi ve 37°C'de gece boyunca inkübe edildi.

3.3.4.5 LC-MS/MS analizi

Hasta serum numuneleri, peptitler oluşturmak için tripsin ile enzimatik olarak kesildi. Kesimden sonra, ticari olarak satın alınan izotopik olarak işaretilenmiş beş peptit, seruma eklendi. Bu dahili standart peptitler, bilinen A1AT parçalanma ürünlerine özdeş izotopik olarak etiketlenmiş amino asit dizilerine sahipti ve bu, bunların kromatografik alıkonma süreleri belirlendi. Beş etiketli peptit, tüm A1AT alellerinde ortak olan bir triptik peptitten (proteotipik peptit) ve mutasyona uğramış S ve Z alelleri için peptitlerden (S ve Z peptitleri) ve aynı bölgeden karşılık gelen vahşi tip M peptitlerinden oluşuyordu (S ve Z olmayan peptitler). Serum örnekleri, bir elektrosprey iyonizasyon kaynağına bağlı TSQ Quantum Access Max triple quadrupole kütle spektrometresi (Thermo Scientific) üzerinde seçici reaksiyon izleme (SRM) kullanılarak yapıldı. Peptitleri bir su/asetonitril (%0,1 formik asit) doğrusal gradyan içinde 0,15 mL/dk akış hızı ile ayırmak için bir Hypersil Gold C18, 50x3 mm, 5 um partikül boyutu kolonu (Thermo) kullanıldı. Peptit başına bir geçiş izlendi. Tüm numuneler analizden önce 4°C'de saklandı.

3.3.4.6 Genotipleme analizi

İki bölge için birer çift primer eşliğinde Sanger dizileme yapıldı. Kısaca, tam kandan DNA izolasyonu yapıldı ve daha sonra PCR amplifikasyonuna ve Sanger dizilimine tabi tutuldu. SERPINA1 geni için E264V (S) ve E342K (Z) alellerinin görüntülenmesi FinchTV kullanılarak yapıldı. Cihazdan alınan işlenmemiş veri referans dizi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.



4 BULGULAR

4.1 Klinik Testlerde İmmünifikasyon Elektroforez Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

İmmunoglobulin türüne özgü immün-zenginleştirmeyi içeren MALDI-TOF MS tabanlı yöntem, 350 serum numunesi için rutin serum IFE testi sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Çalışmaya dahil edilen numunelerin IFE sonuçları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen örneklerin IFE sonuçları

Kontrol*	IgG kappa	IgG lambda	IgA kappa	IgA lambda	IgM kappa	IgM lambda
n=50	n=50	n=50	n=50	n=50	n=50	n=50

* monoklonal bant içermeyen

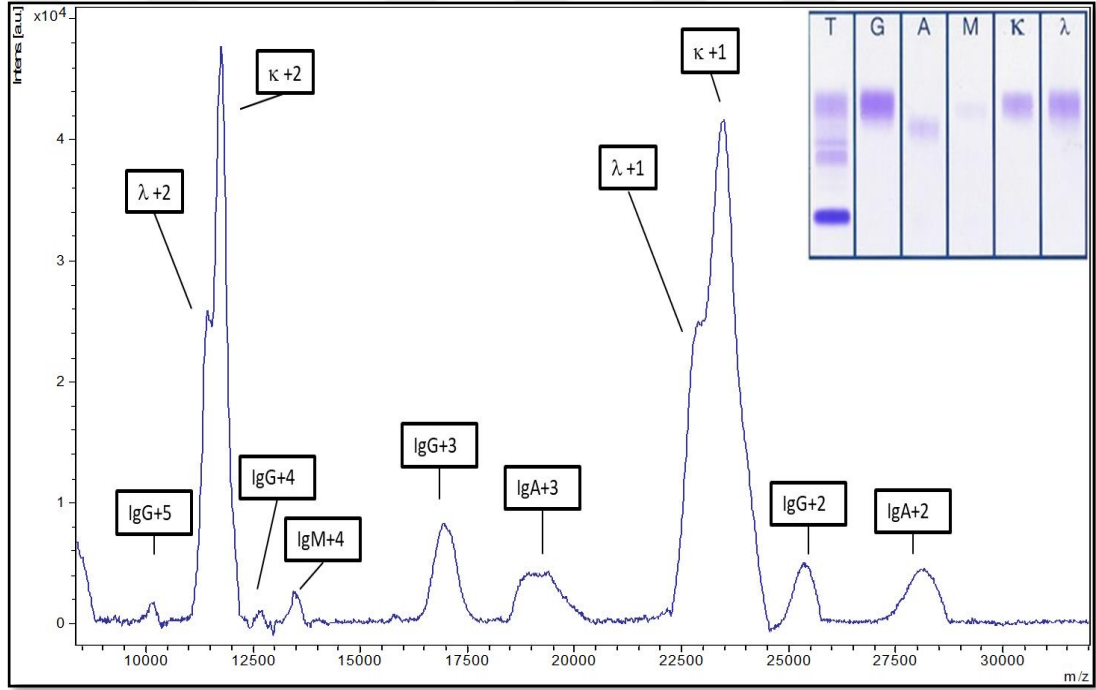
Geliştirilen yöntem, hedef proteinlerin afinite rezinleri ile saflaştırılmasını ve M-proteinlerini saptamak ve ölçmek için saflaştırılmış proteinlerin MALDI-TOF-MS ile analizini içerir. Afinite rezinleri ile gerçekleştirilen immünoglobulin izolasyonu için gerekli adımlar şunları içerir:

- numuneyi spin kolonlarına yüklemek,
- hedef immünglobulinlerin CaptureSelect rezinlerine bağlanması,
- bağlı olmayan bileşenlerin uzaklaştırılması için yıkama adımları
- rezin bağlı immünglobulinlerin elüsyonu.

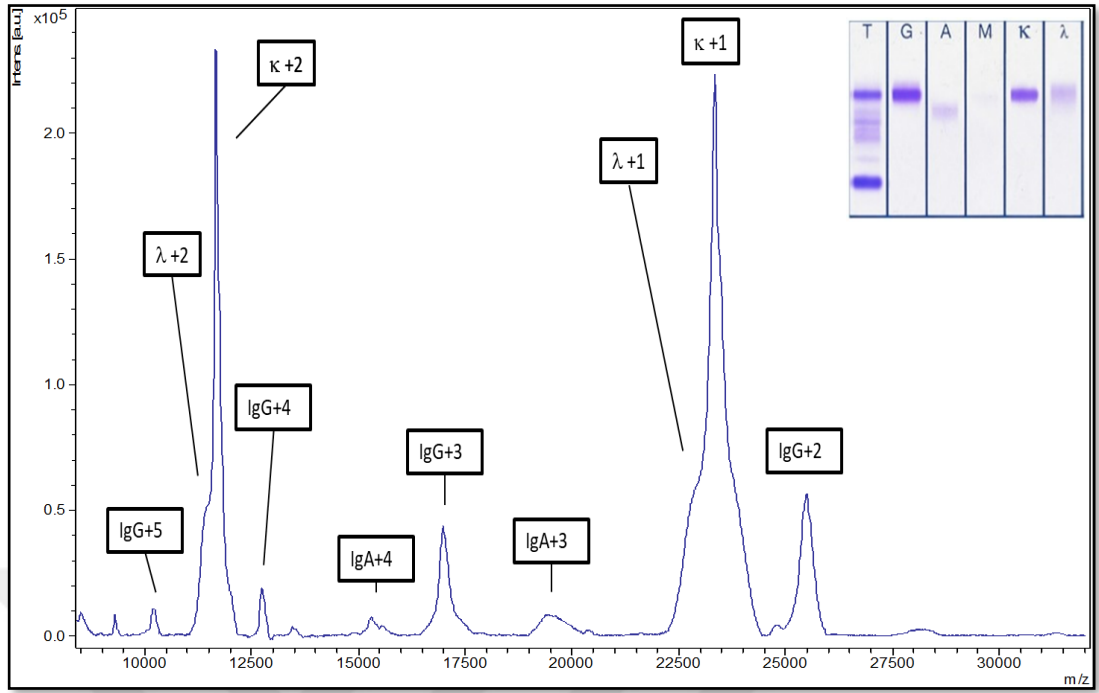
Bu adımların her biri, etkili izolasyon için büyük öneme sahiptir. En etkili izolasyon için farklı solvent karışımlarının etkilerini, tekrar sayısını ve işlem süresi optimize edildi. Bu işlem ile numuneden numuneye insan kaynaklı olası varyasyonlar elimine edilmiştir. Multipleks çalışma için uygun bir yöntem elde etmek için farklı rezin oranları karıştırılmış ve optimum rezin karışımını belirlemek için serum örneklerinde immünoglobulin proteinlerinin ayrılması analiz edilmiştir. Analiz maliyetini azaltmak için minimum miktarda rezin (1 μ L κ ve 1 μ L λ rezinler) kullanıldı. Ig proteinlerini teşhis etmek için kullandığımız rezin miktarı, MALDI-

TOF-MS cihazında etkili protein izolasyonu ve tespiti sağladı. Bu nedenle, her biri için uygun rezin miktarı optimize edildi.

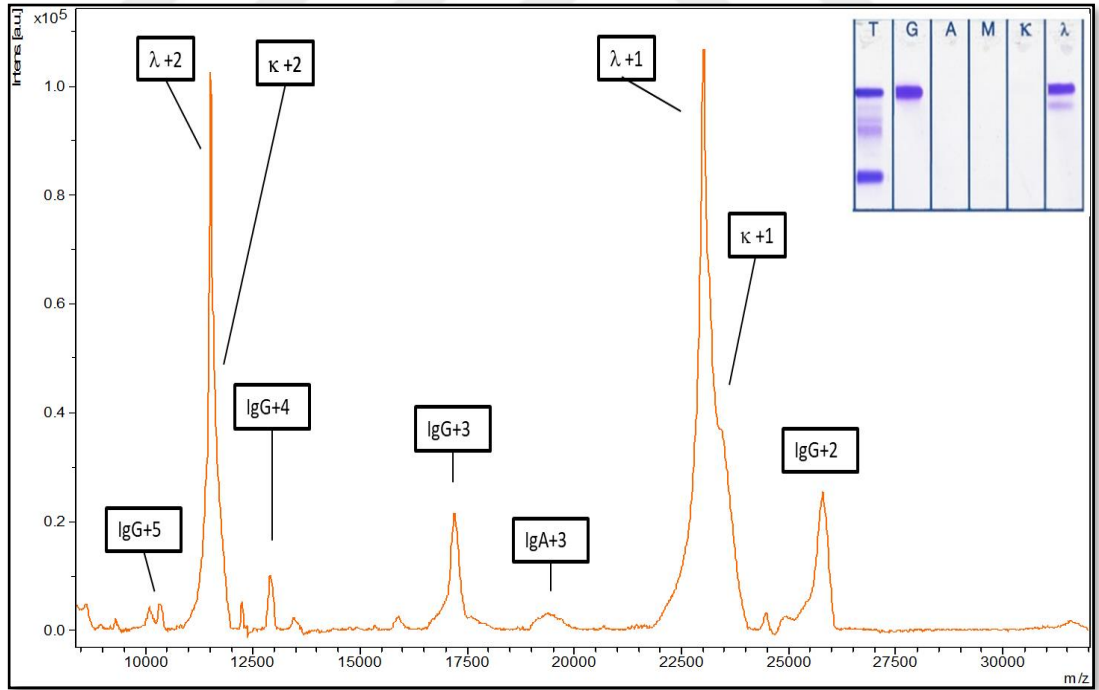
8400 ve 32000 arasındaki m/z aralığında ağır ve hafif zincir proteinlerinin pik noktalarının fragmanları tespit edildi. Hafif ve ağır zincirlerin Gauss m/z dağılımı, Flex analiz yazılımı (Bruker) ile iyonlaşmış formlarındaki pikleri belirlemek için kontrol edildi ve sınıflandırıldı (Şekil 12-13-14-15-16-17-18). M-protein ağır zincir tiplendirilmesi yapılırken monoklonal bant içermeyen (poliklonal) serum örneklerine ait spektrum görüntüleri ile karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca her bir gruba ait spektrum görüntüleri ile serum örneklerine ait jel görüntüleri kıyaslanmıştır.



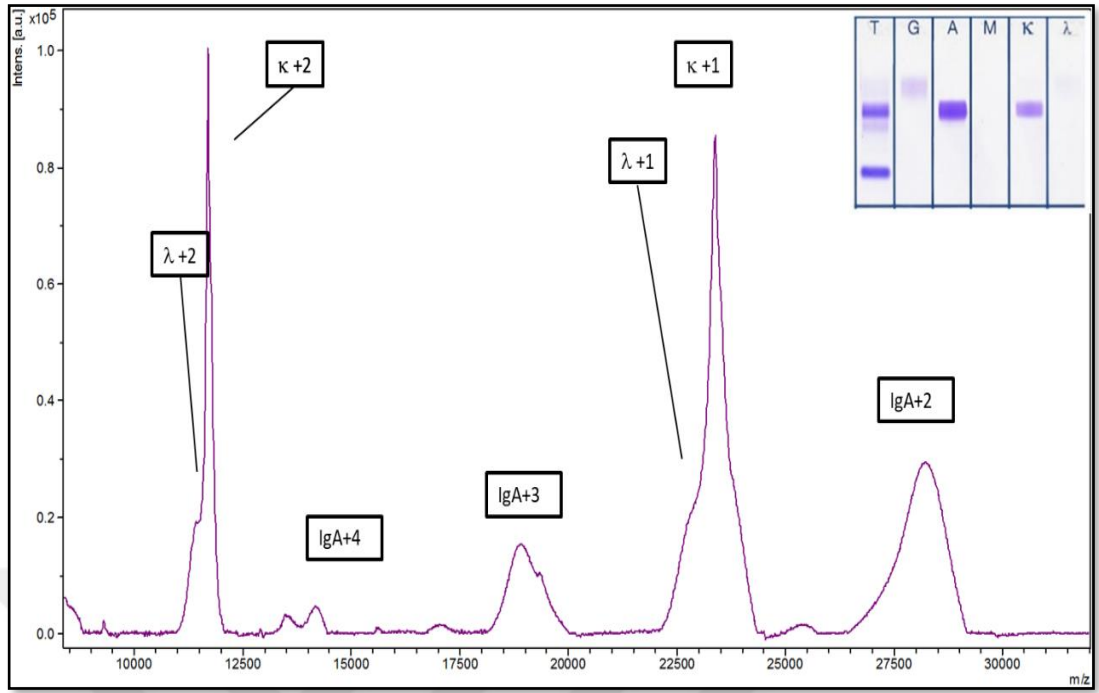
Şekil 12. M-proteini içermeyen (Poliklonal) hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü



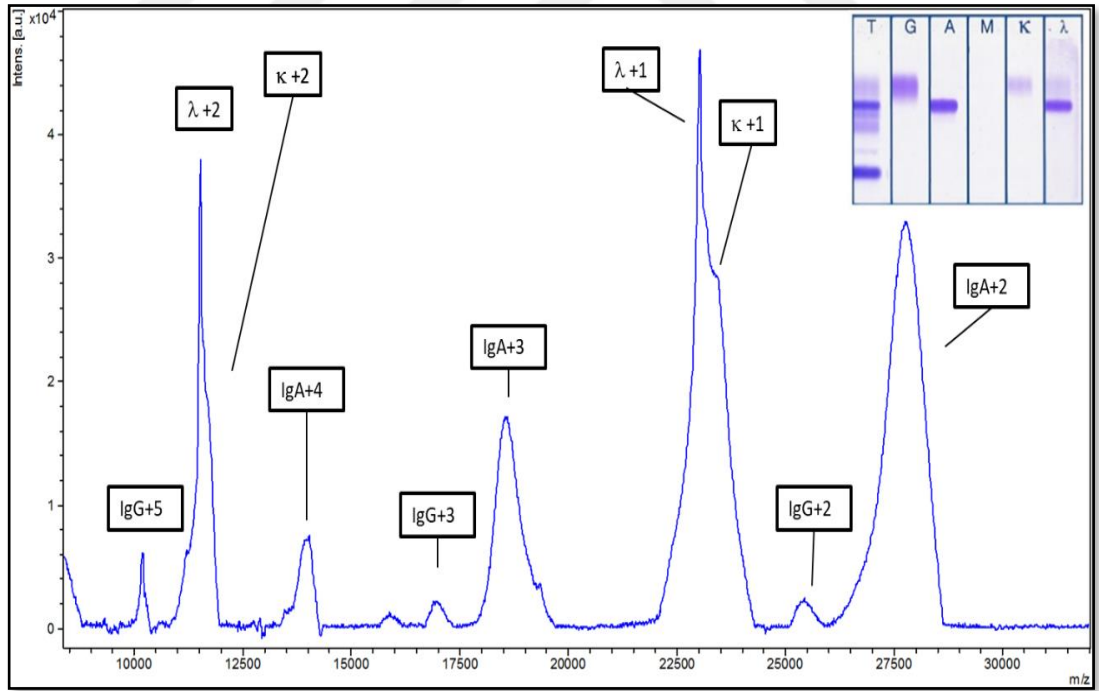
Şekil 13. IgG kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü



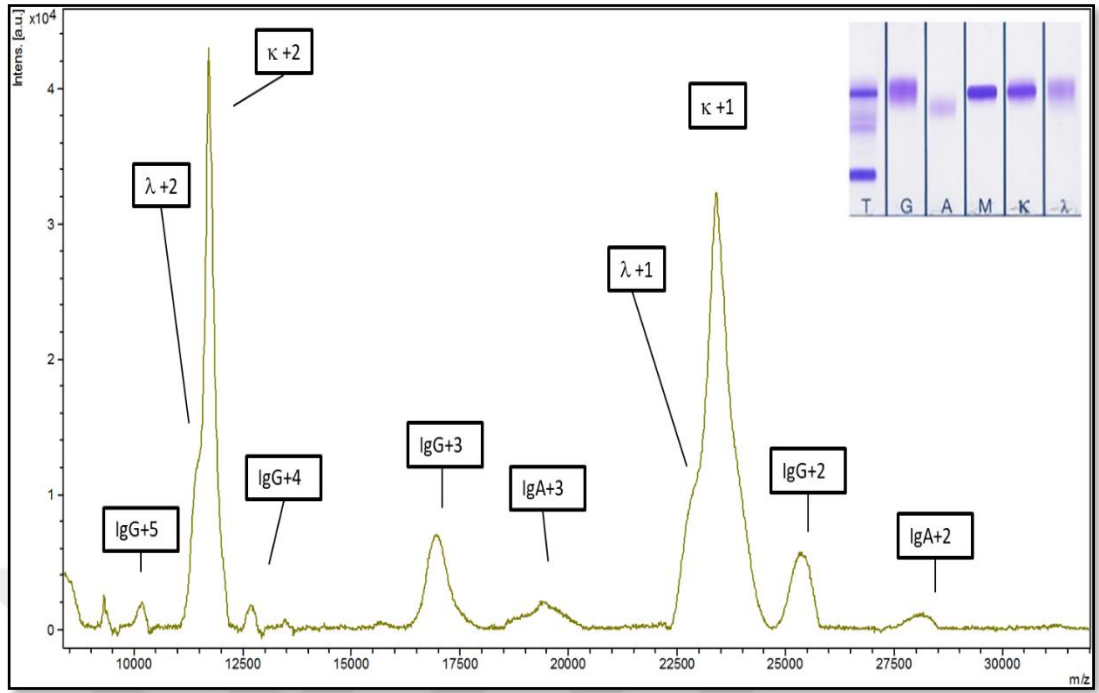
Şekil 14. IgG lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü



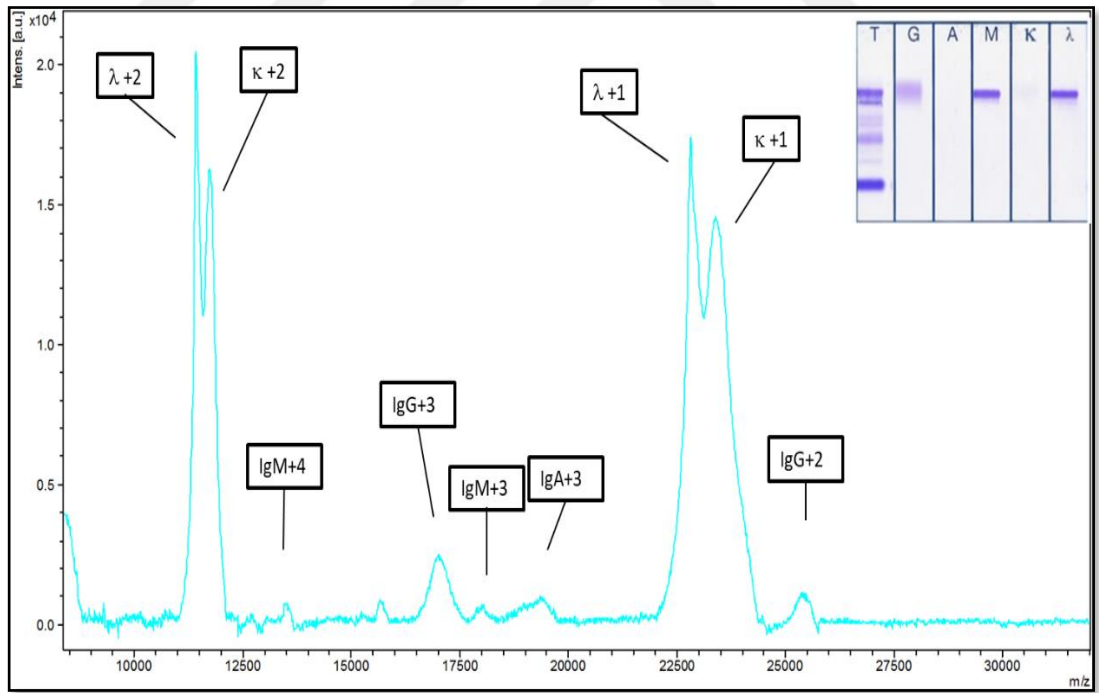
Şekil 15. IgA kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü



Şekil 16. IgA lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü

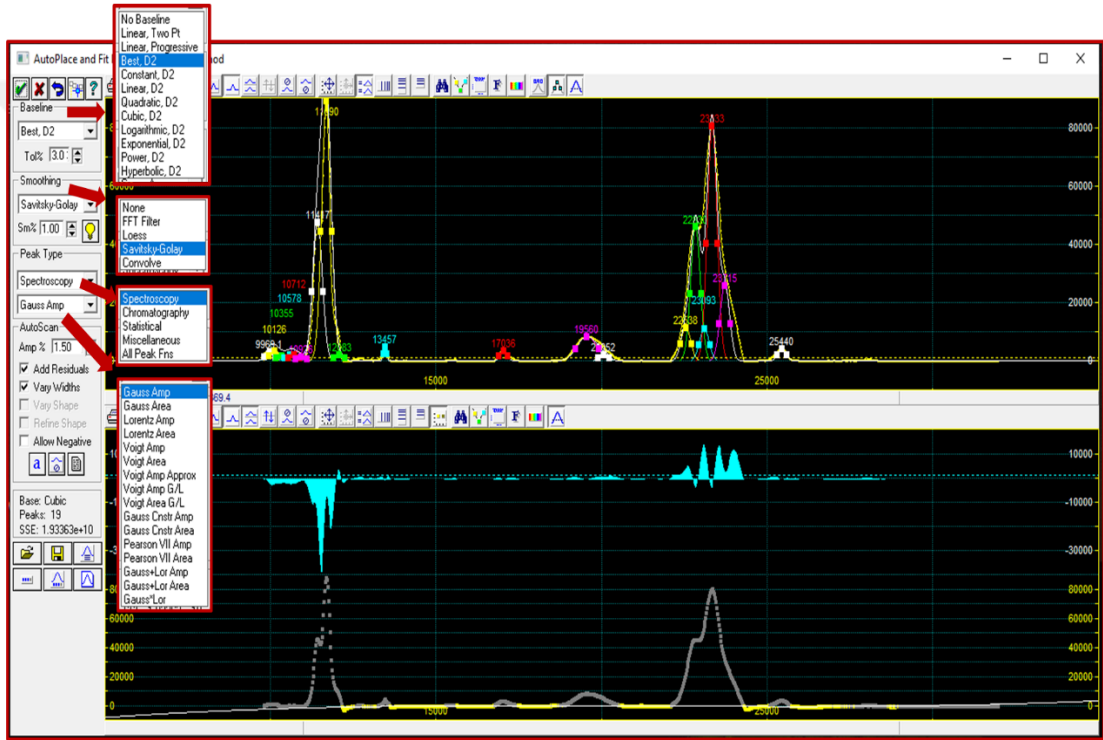


Şekil 17. IgM kappa M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü

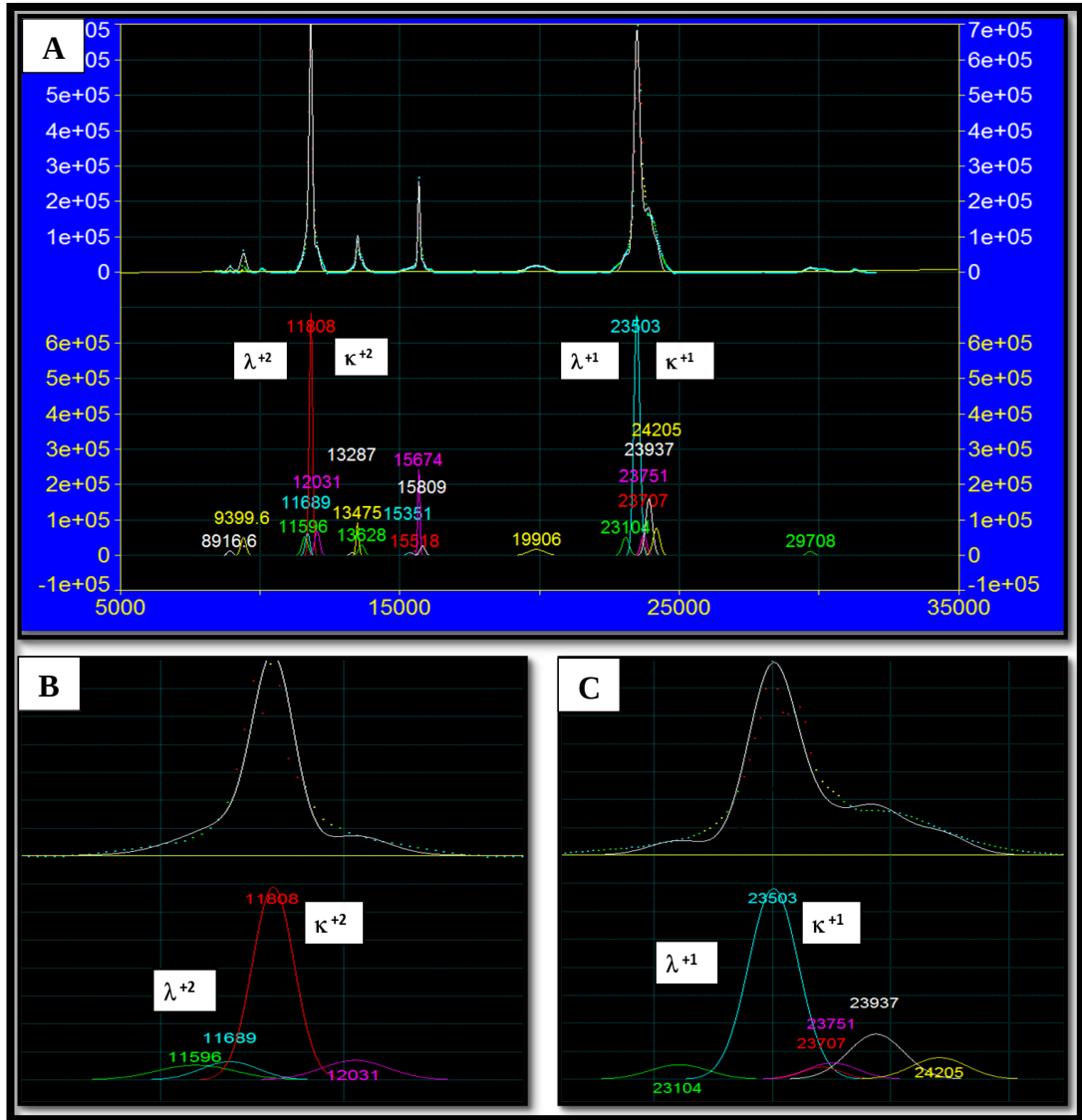


Şekil 18. IgM lambda M-proteini içeren hasta örneğine ait spektrum ve jel görüntüsü

İmmünglobulin hafif zincir proteinleri yakın moleküler ağırlıklara sahip olduğu için Flex analiz yazılımında tam olarak pik ayrımı gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle PeakFit yazılımı kullanılarak piklerin ayrımı gerçekleştirildi (Şekil 19-20). PeakFit 4.12 yazılımındaki pik uydurma algoritmaları ile kappa ve lambda piklerinin $[M+1H]^+1$ ve $[M+2H]^+2$ 'deki tepe alanları ve FWHM değerleri ölçüldü. Bir hafif zincir immünglobulinin yüksek üretimi, analiz sonucunda elde edilen spektrumda SPEP tarafından bulunan M sivri uçlarına benzer dar ve keskin bir pik (M proteini veya M spike) olarak görünmektedir.



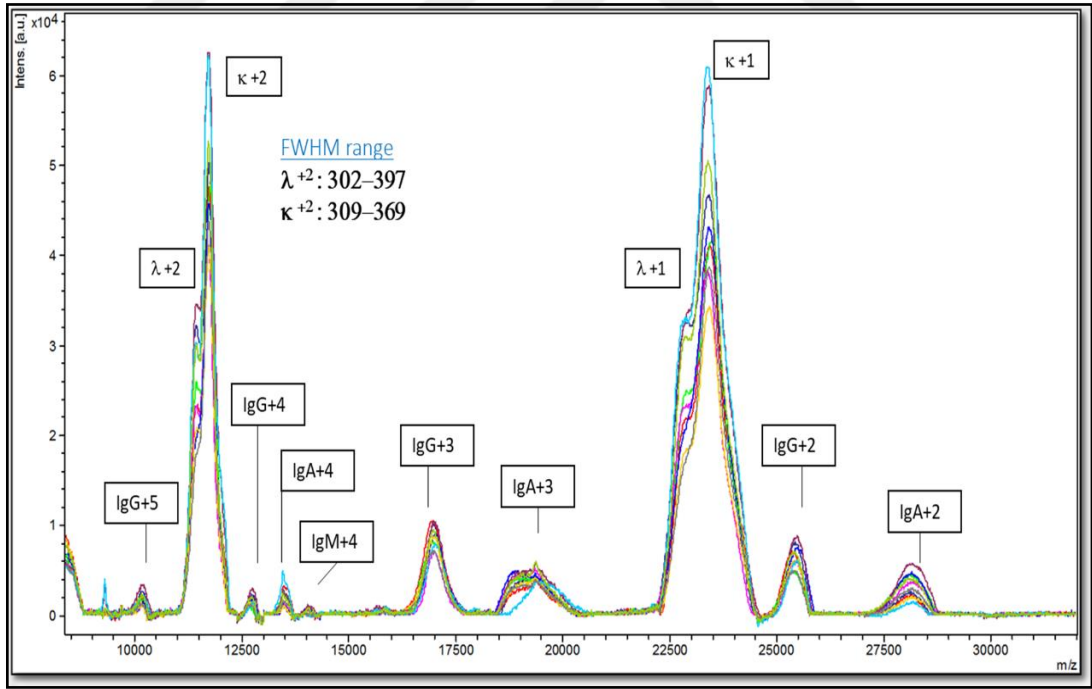
Şekil 19. PeakFit 4.12 yazılımındaki pik uydurma algoritmaları



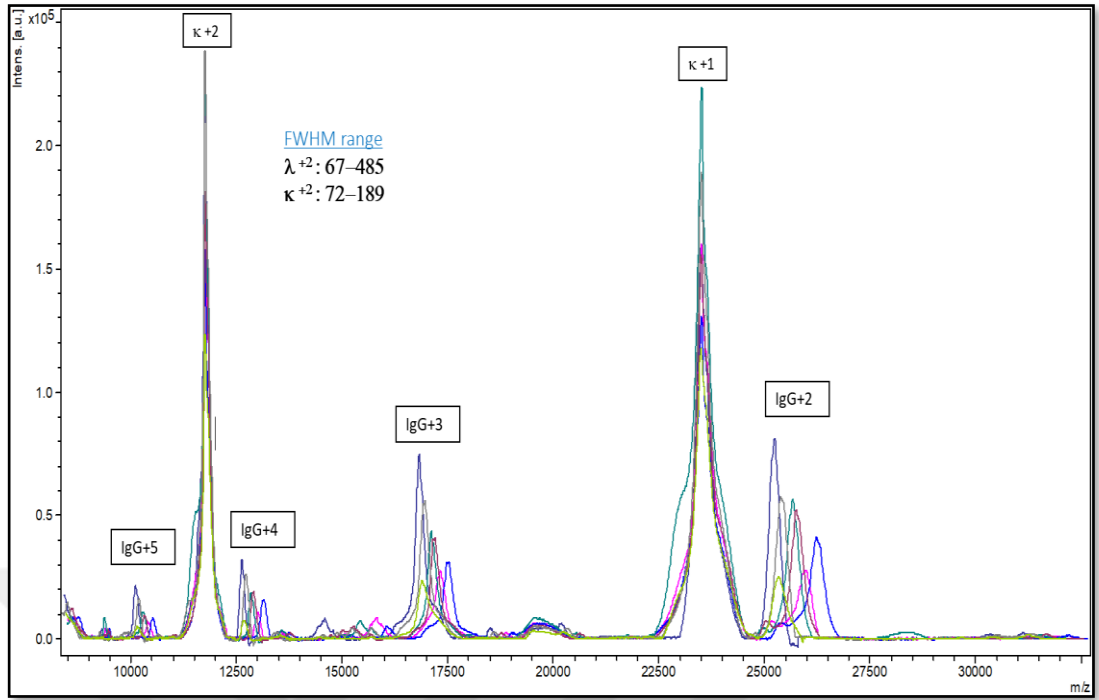
Şekil 20. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı A) $[M+H]^{+1}$ ve $[M+2H]^{2+}$ yükleri için LC m/z dağılımlarının 8400 ile 32000 m/z aralığında spektrumu ve genişletilmiş perspektifleri B ve C) LC m/z sinyallerinin tepe uydurma ve gauss dağılımlarının temsili bir sonucunu göstermektedir.

PeakFit 4.12 yazılımındaki pik uydurma algoritmaları ile kappa ve lambda piklerinin $[M+1H]^+$ ve $[M+2H]^{+2}$ 'deki tepe alanları ve FWHM değerleri ölçüldükten sonra $[M+2H]^{+2}$ 'deki pik genişlikleri baz alındı. Bu nedenle monoklonalitenin kappa ve lambda hafif zincirlerinin hangisinden kaynakladığını belirlemek için PeakFit analizi sonucunda elde edilen FWHM değerleri baz alınarak referans bir pik genişliği belirlendi ve bu referans değerleri üzerinden tanımlama yapıldı (Şekil 21-22-23-24-25-26-27). Referans aralık için monoklonal bant içeren alt gruplardan ve içermeyen grupların her birinden yaklaşık 10 farklı örnek alınarak gerçekleştirildi.

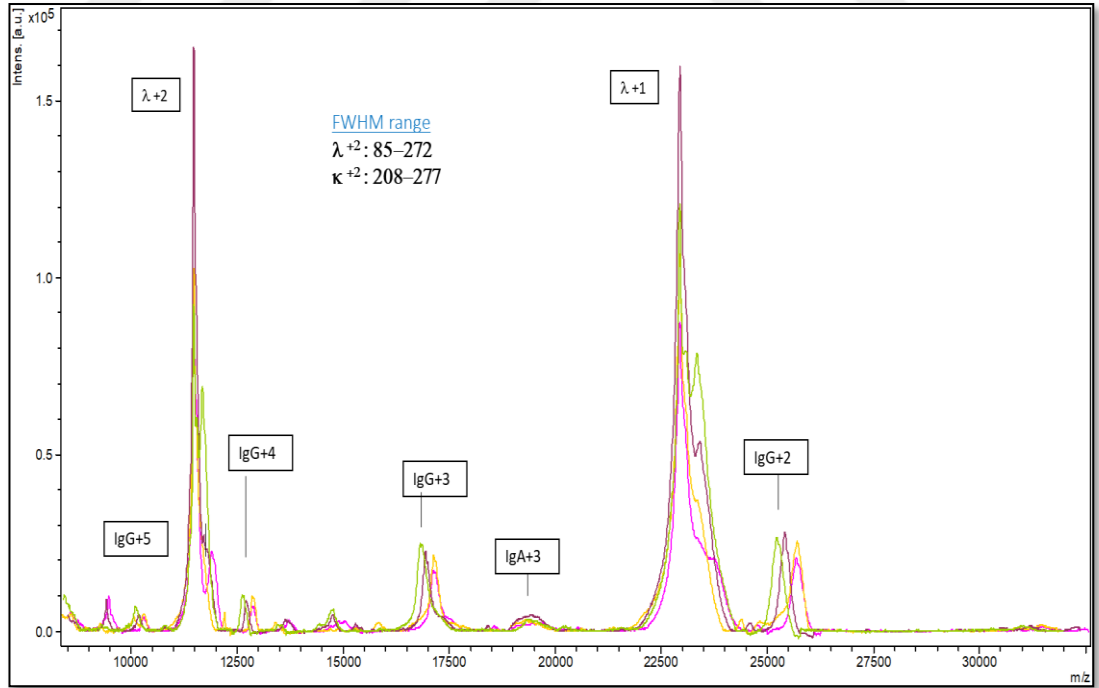
Ek olarak, IgM M-proteinleri, IgM LC'ye özgü rezinler ile zenginleştirildikten sonra monoklonal LC m/z sinyalleriyle kolayca tanımlanabilirken, monoklonal IgM HC m/z sinyalinin saptanmasında zorluk yaşanmıştır. Bu nedenle IgM M-proteinleri, M-rezinleri ile zenginleştirilerek IgM HC m/z sinyalinin tespiti sağlanmıştır (Şekil 26-27).



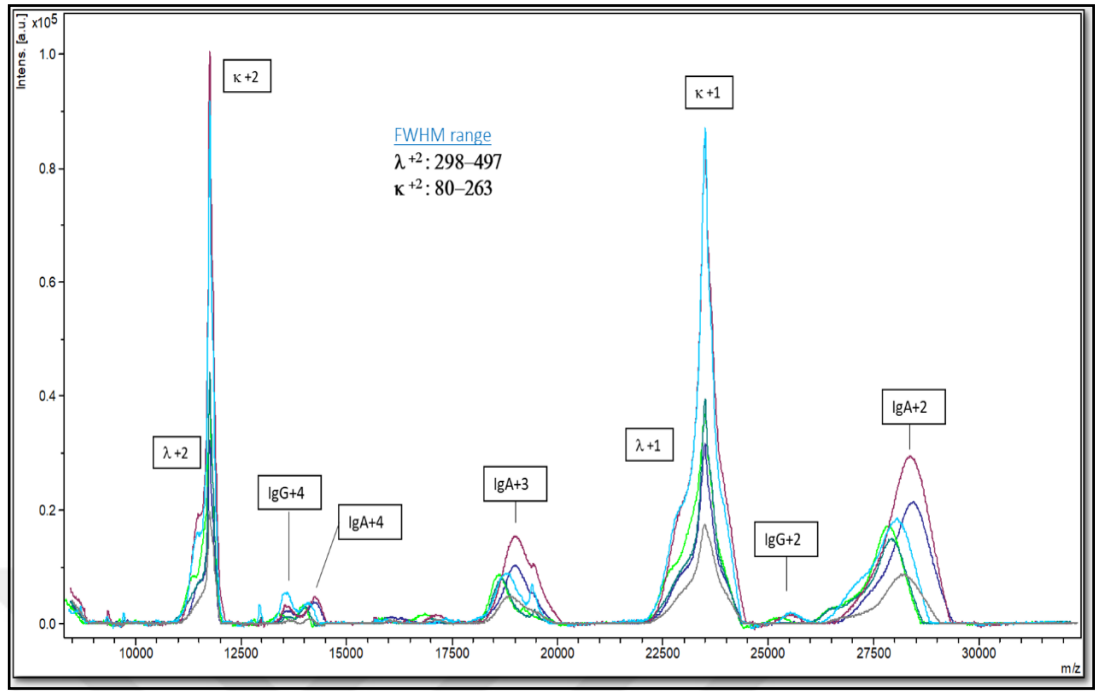
Şekil 21. M-proteini içermeyen kontrol örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.



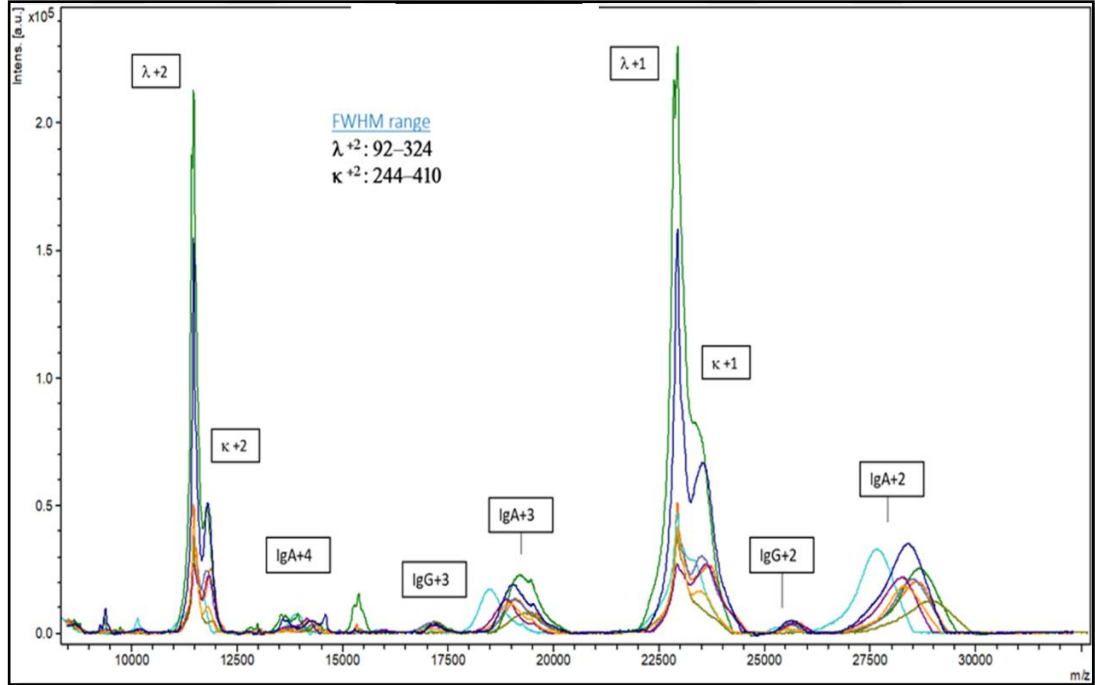
Şekil 22. IgG kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.



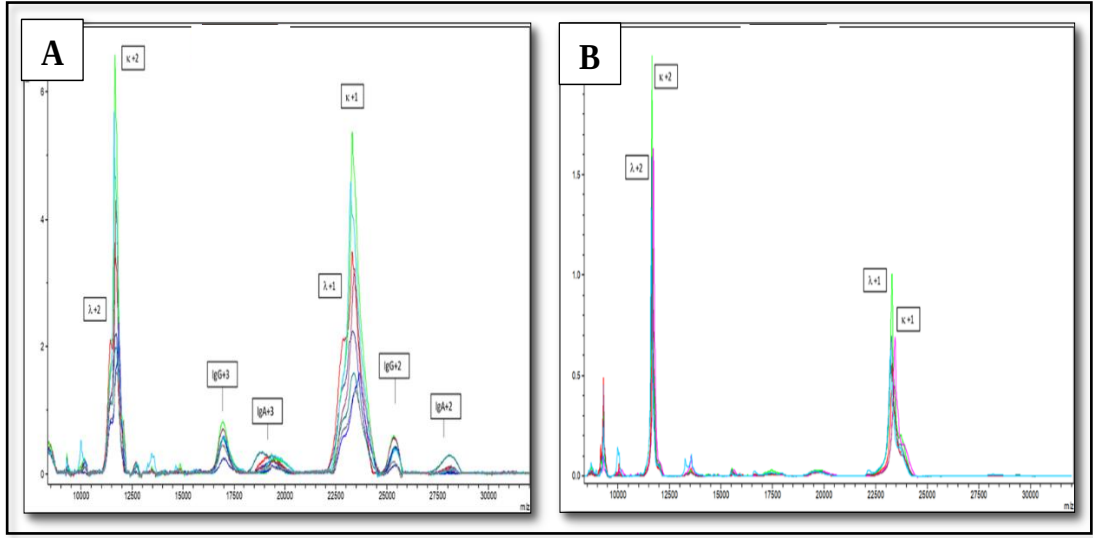
Şekil 23. IgG lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.



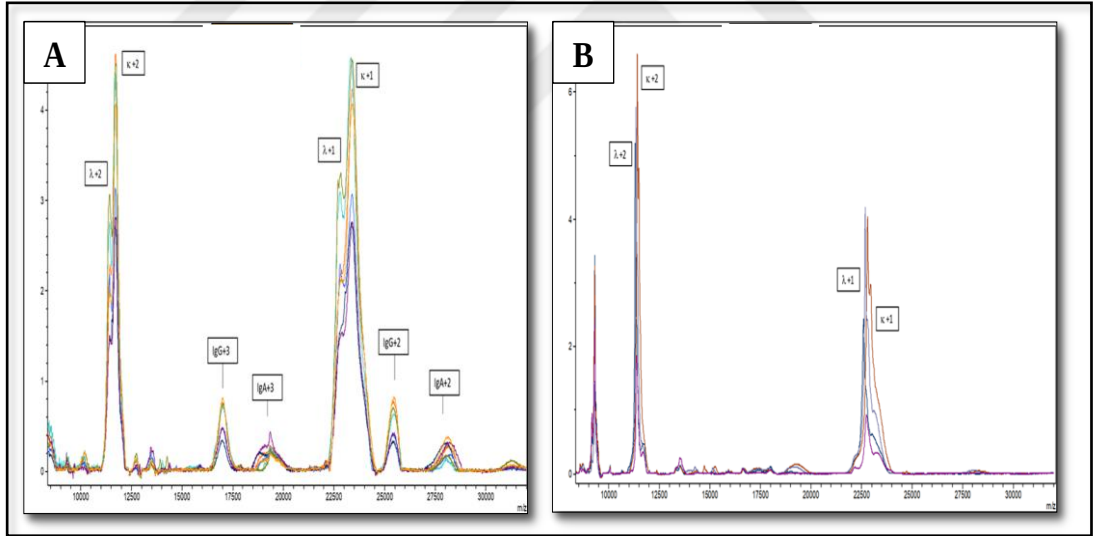
Şekil 24. IgA kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.



Şekil 25. IgA lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları.

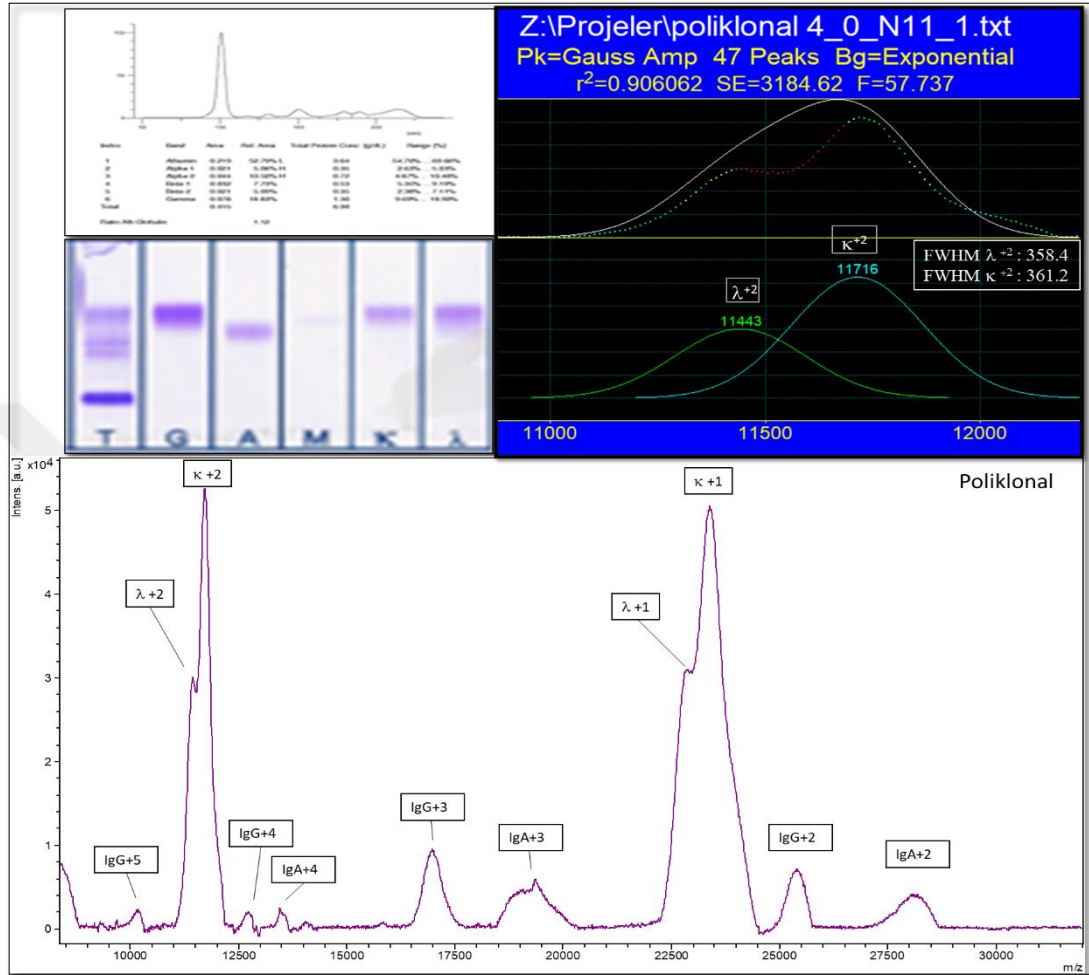


Şekil 26. IgM kappa M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları. A) Kappa ve lambda resin karışımı ile zenginleştirilen örnekler için spektrum görüntüsü. B) M-rezini ile zenginleştirilen örnekler için spektrum görüntüsü.

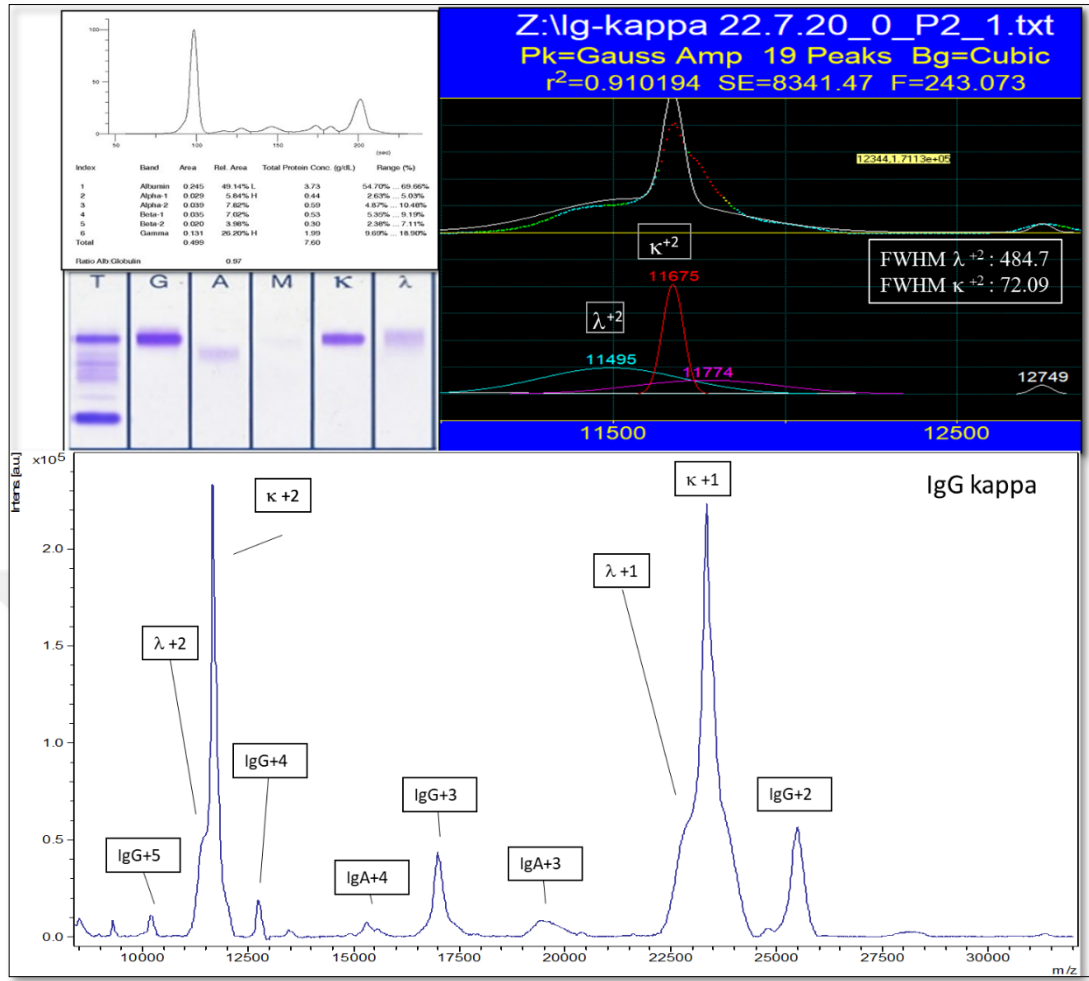


Şekil 27. IgM lambda M-proteini içeren hasta örneklerinin üst üste bindirilmiş spektrumları. A) Kappa ve lambda resin karışımı ile zenginleştirilen örnekler için spektrum görüntüsü. B) M-rezini ile zenginleştirilen örnekler için spektrum görüntüsü.

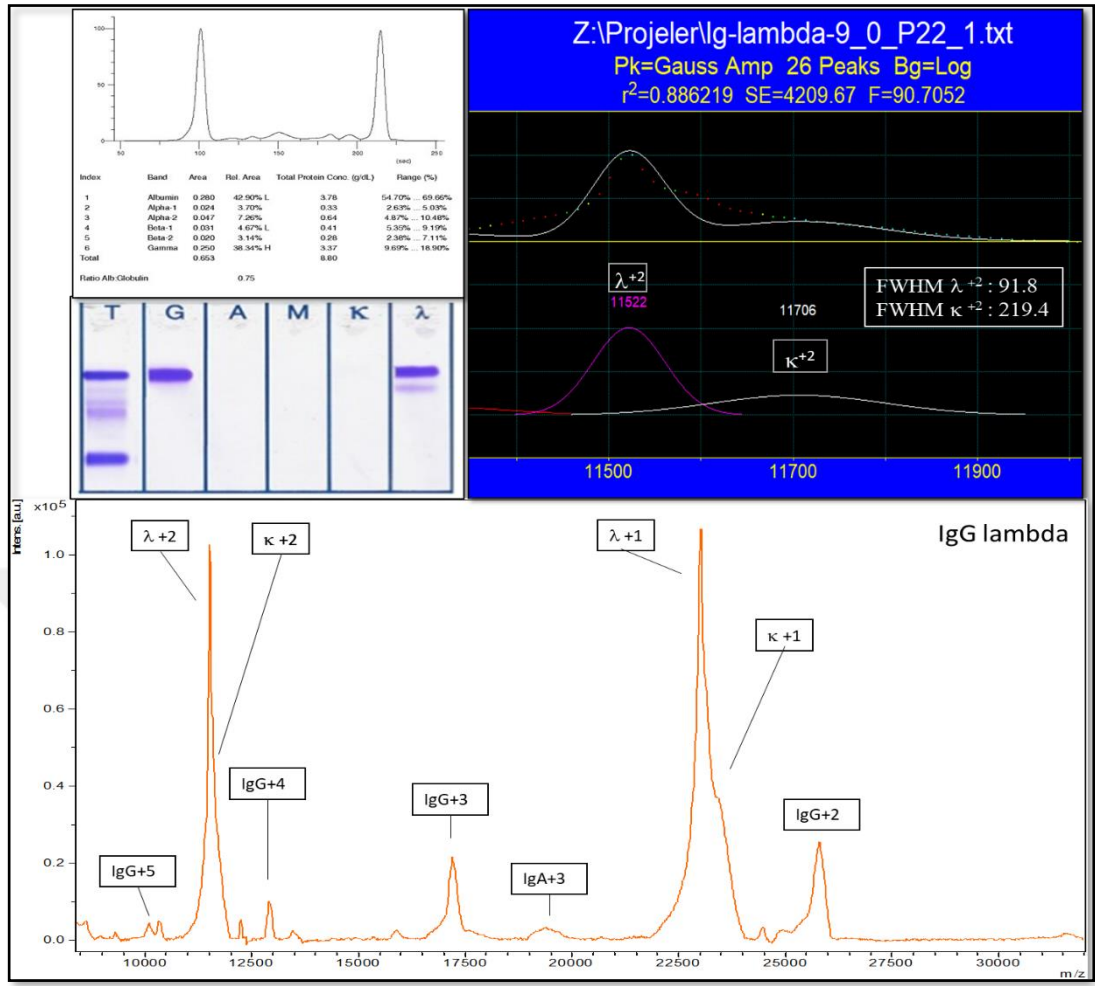
Referans çalışması sırasında elde edilen FWHM değerleri baz alınarak hafif zincir tespiti yapıldı (Şekil 28-29-30-31-32-33-34).



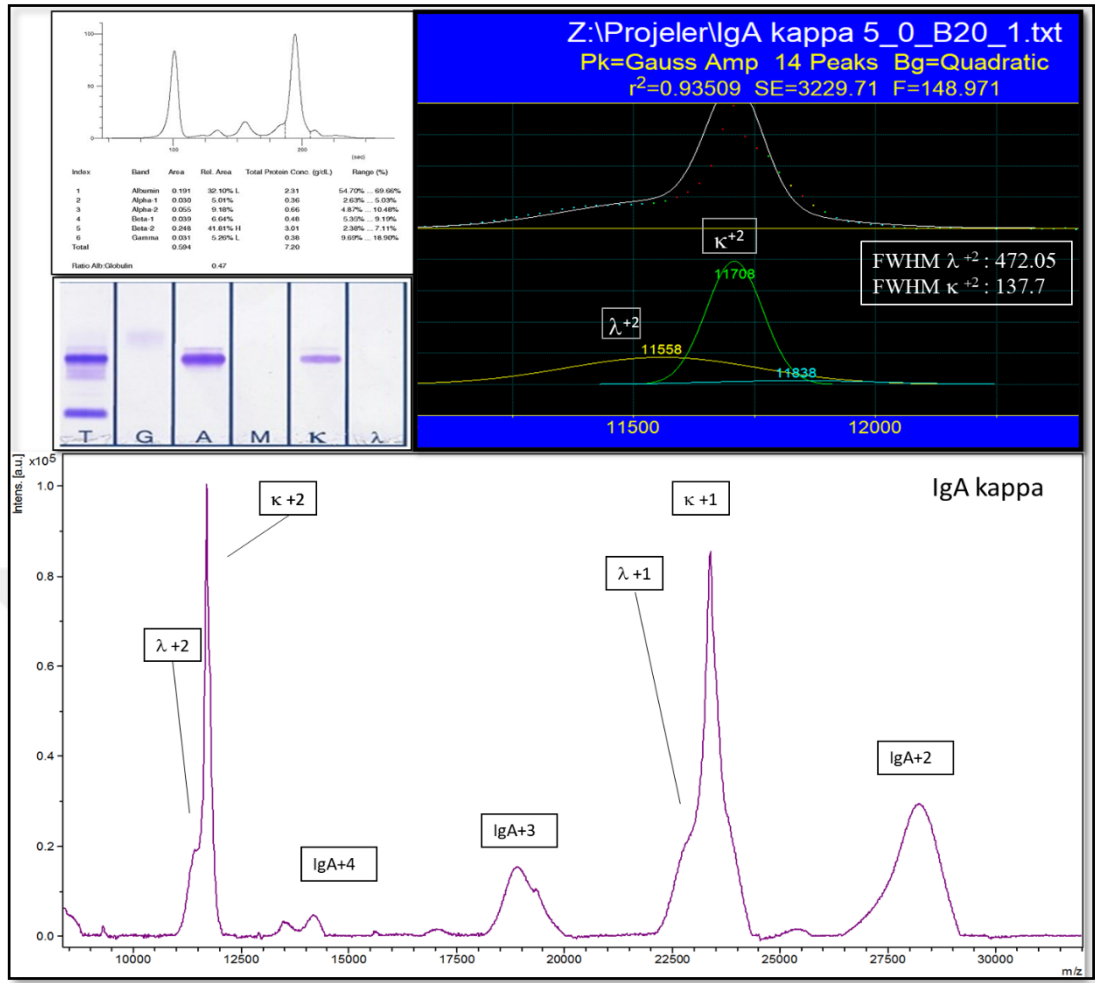
Şekil 28. Poliklonaliteye sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü



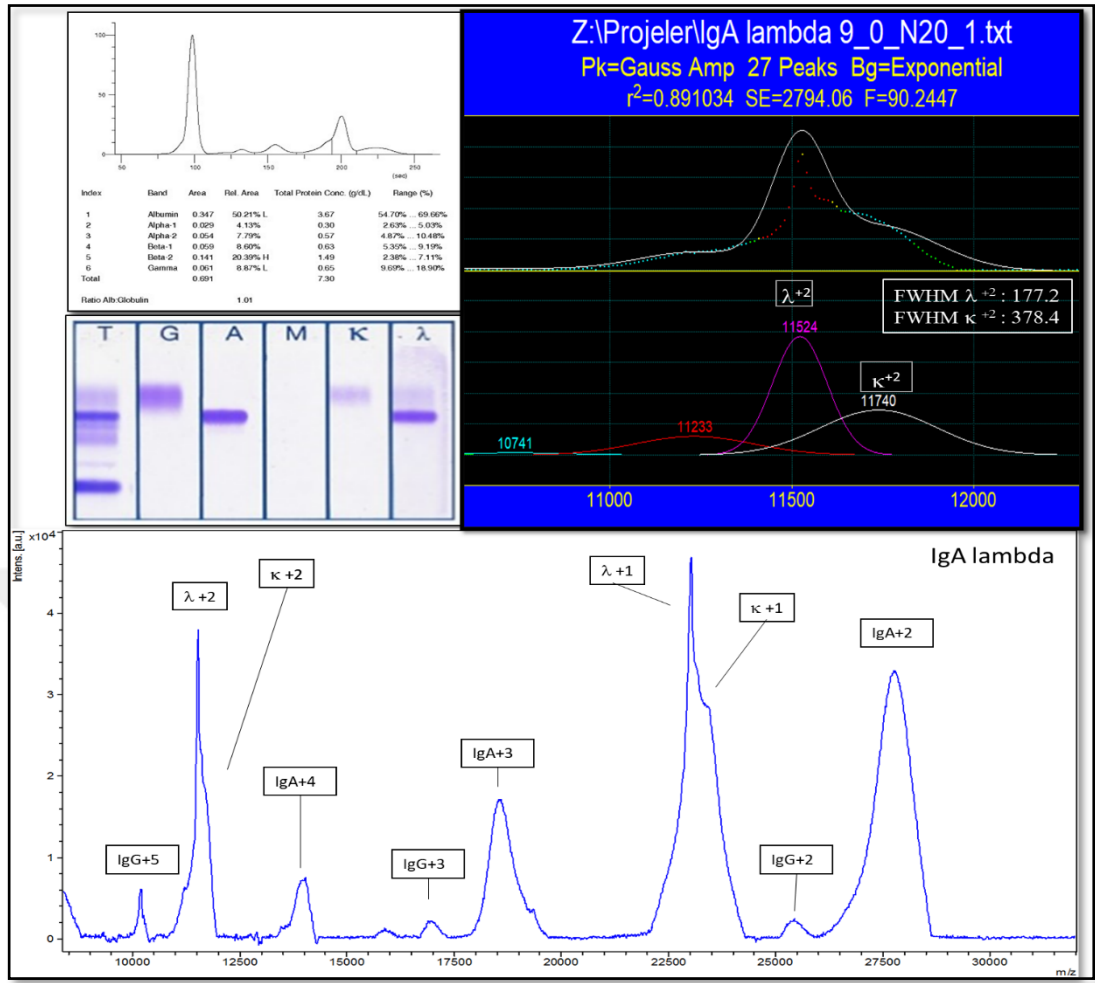
Şekil 29. IgG kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü



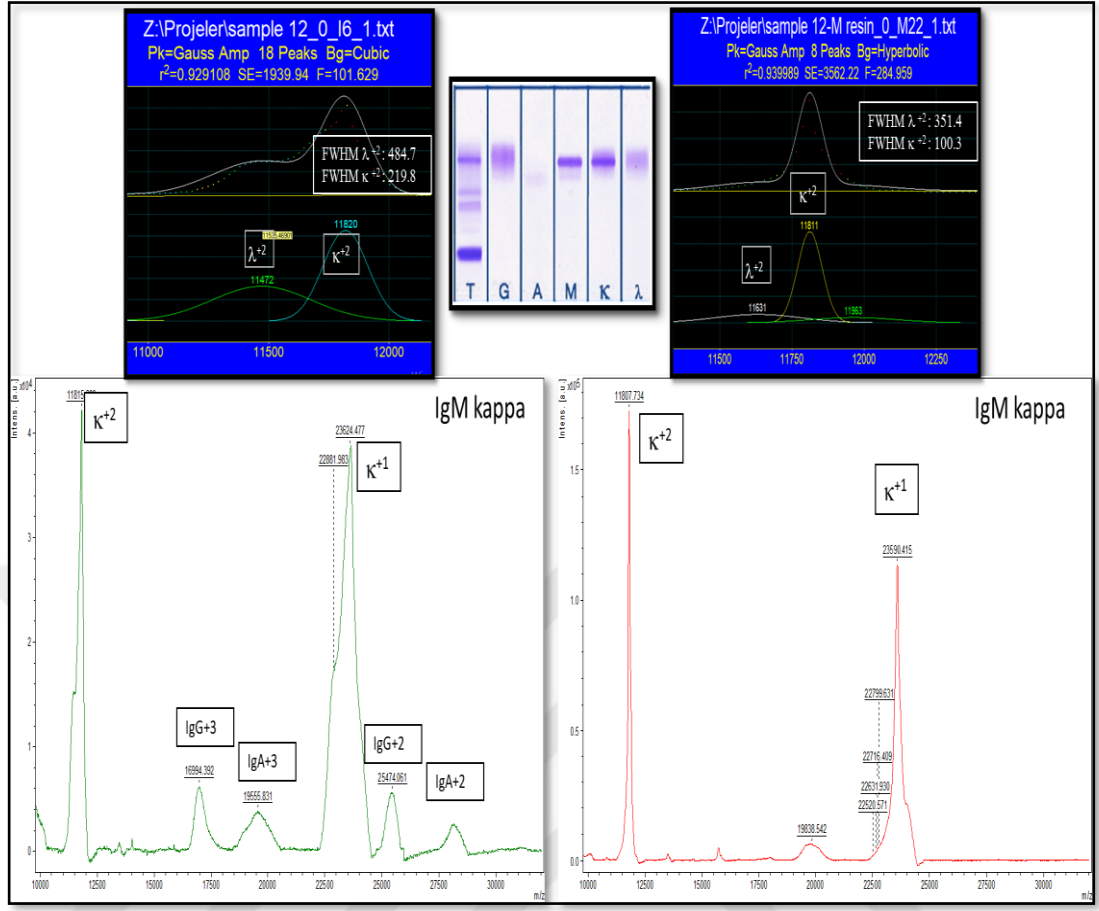
Şekil 30. IgG lambda monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü



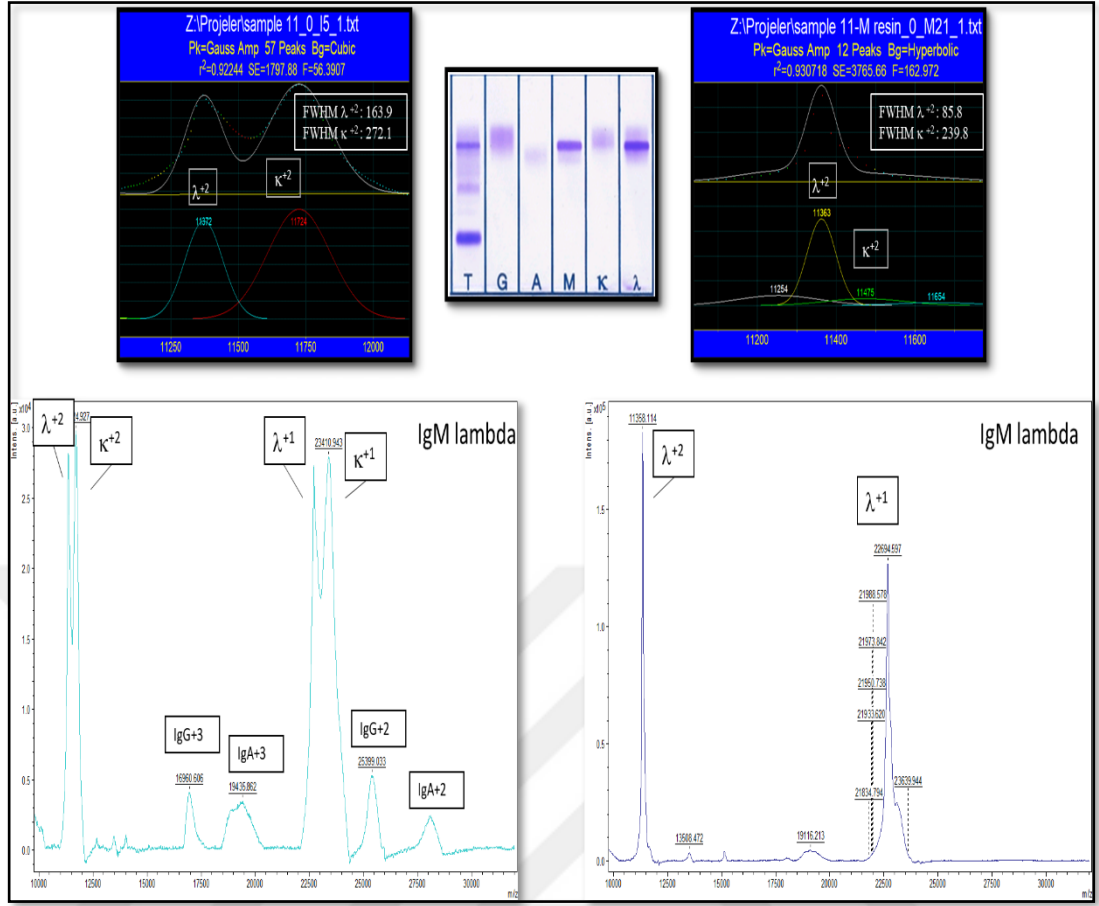
Şekil 31. IgA kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü



Şekil 32. IgA lambda monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü

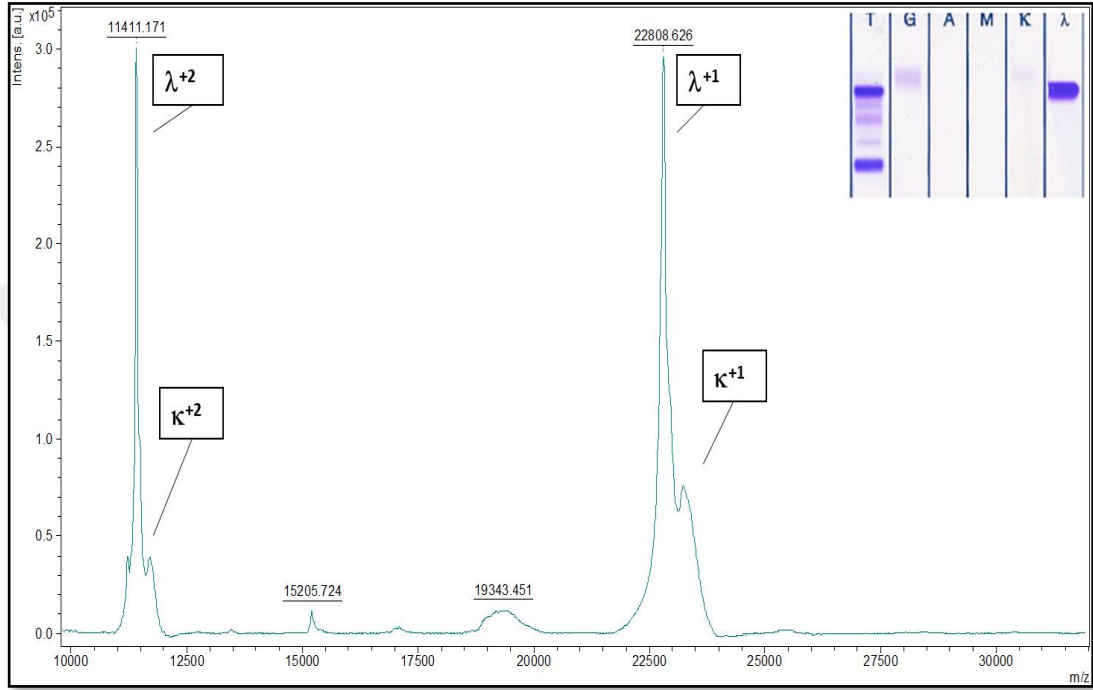


Şekil 33. IgM kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel ve pik fitting görüntüsü. A) kappa ve lambda resin ile B) M-resin ile yapılan immün-zenginleştirme



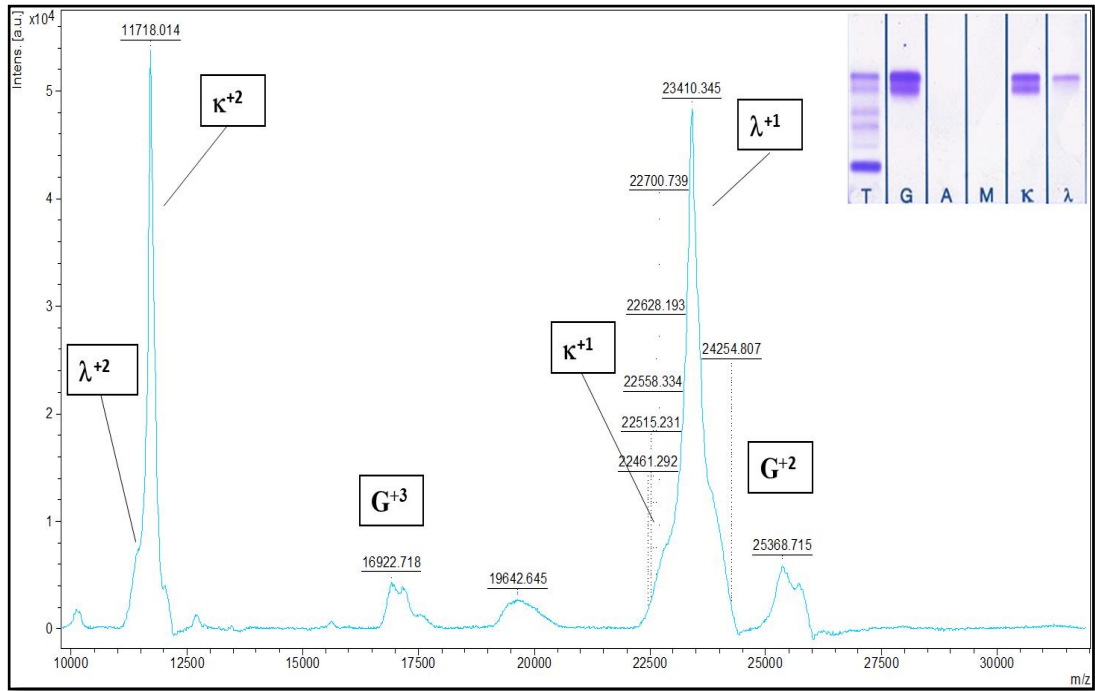
Şekil 34. IgM lambda monoklonitesine sahip spektrum, jel ve pik fitting görüntüsü. A) kappa ve lambda rezin ile B) M-rezin ile yapılan immün-zenginleştirme

Ek olarak, çalışma sırasında hafif zincir patogeneğine sahip örnekler de tespit edilerek analiz edilmiştir. Analiz sonunda görüntülenen kütle spektrumunda mevcut yöntemin hafif zincire sahip hasta örneklerinde hafif zincirinin tipine göre ayırım yaptığı gözlenmiştir (Şekil 35).



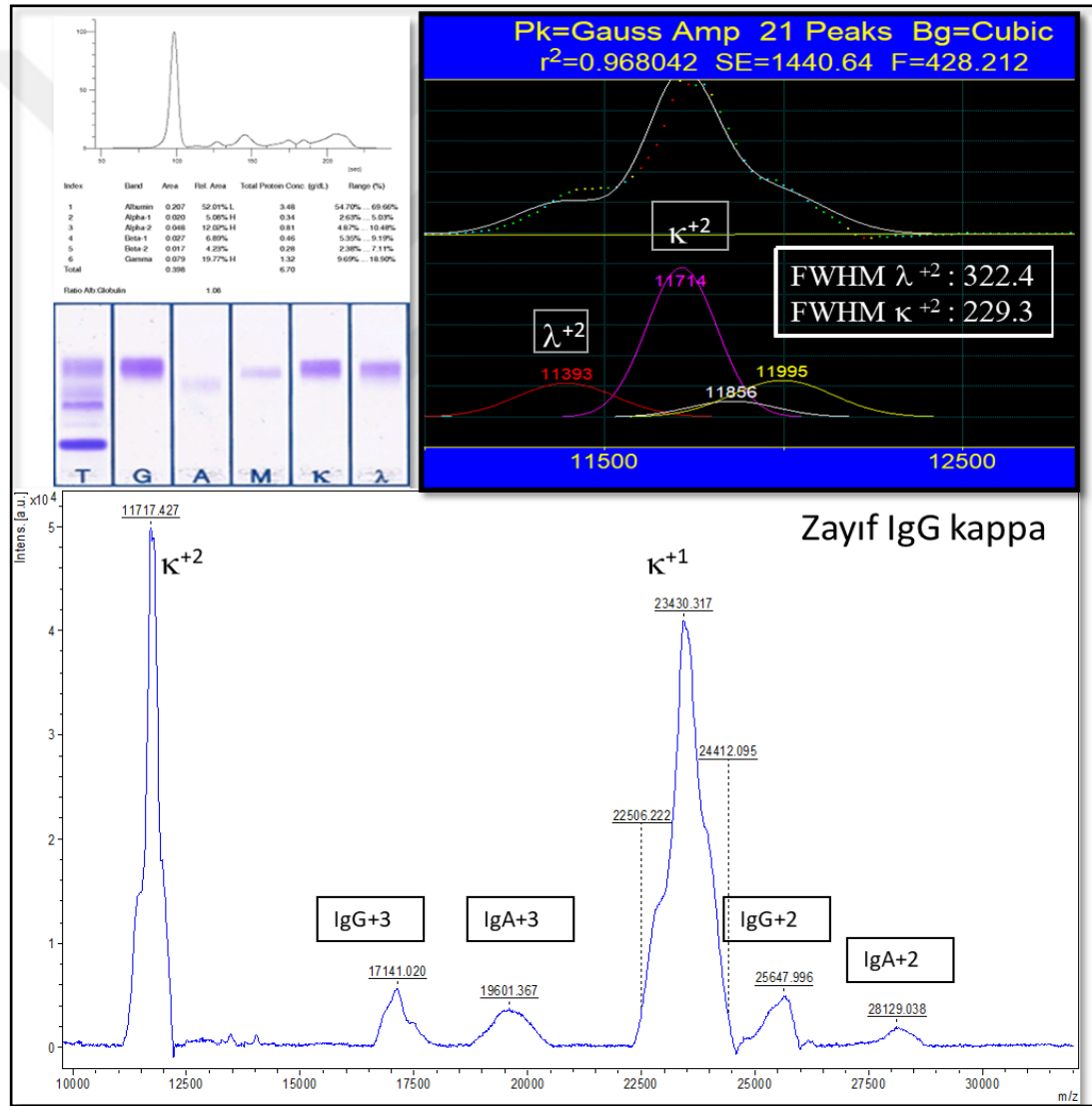
Şekil 35. Kappa hafif zincir monoklonalitesine sahip spektrum görüntüsü

Ayrıca, çalışma sırasında biklonaliteye sahip örnekler de tespit edilerek yöntemin hassasiyeti incelenmiştir (Şekil 36). Biklonal gammopatiler, iki farklı monoklonal protein üreten plazma hücrelerinin veya B-lenfoid progenitörlerinin klonal çoğalması olarak tanımlanır. Nadiren görülmekle birlikte, her biri ilgisiz bir monoklonal spike üreten iki plazma hücresi klonunun çoğalmasından veya tek bir plazma hücresi klonu tarafından iki monoklonal sivri pik üretilmesinden kaynaklanabilir.



Şekil 36. IgG kappa ve IgG lambda biklonalitesine sahip spektrum görüntüsü

Protein elektroforezinde gama bölgesinde tanımlanan zayıf bant varlığıyla beraber IFE sonucuna göre Zayıf IgG kappa bandı ile karakterize hasta örnekleri incelendi (Şekil 37). Hasta örnekleri yeni yöntem ile incelendiğinde G ağır zincir varlığı tespit edilirken kappa hafif zincire ait FWHM değeri ilginç bir şekilde ne kappa monoklonalitesi için belirlenen referans aralığa ne de monoklonal banda sahip olmayan hastalar için belirlenen referans aralığa uygundu (FWHM aralığı:204.5-259.3). İki referans aralığın arasında bir değere sahipti. Bu nedenle zayıf bantların (faint band) tespiti için bu durum önemli bir sonuçtu.



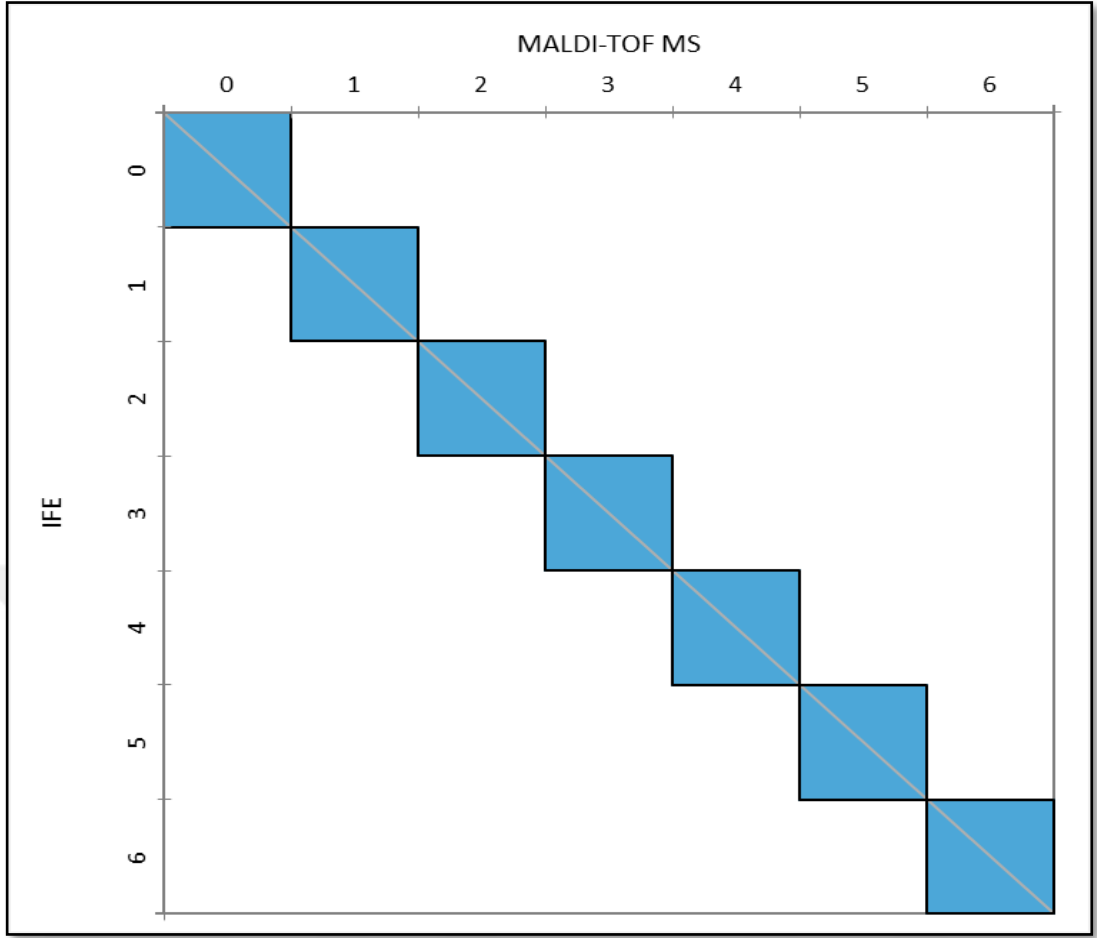
Şekil 37. Zayıf IgG kappa monoklonitesine sahip spektrum, jel, SPEP ve pik fitting görüntüsü

Ayrıca iki farklı yöntemin uyumunu değerlendirmek için Cohen's kappa katsayısı (κ) kullanıldı. Kappa katsayısının (κ) yorumu şu şekildedir: 0,81–1 neredeyse mükemmel uyum, 0,61–0,8 iyi uyum, 0,41-0,60 orta düzeyde uyum, 0,21-0,40 orta düzeyde uyum, 0,01-0,20 hafif uyum ve <0 uyum yok (147). MALDI-TOF MS ile referans yöntem (IFE) arasındaki Cohen'in kappa katsayısı sonuçları neredeyse mükemmel bir uyum ortaya koydu (Tablo 9, Şekil 38).

Tablo 9. İki yöntem arasındaki uyum oranları (IFE ve MALDI-TOF MS)

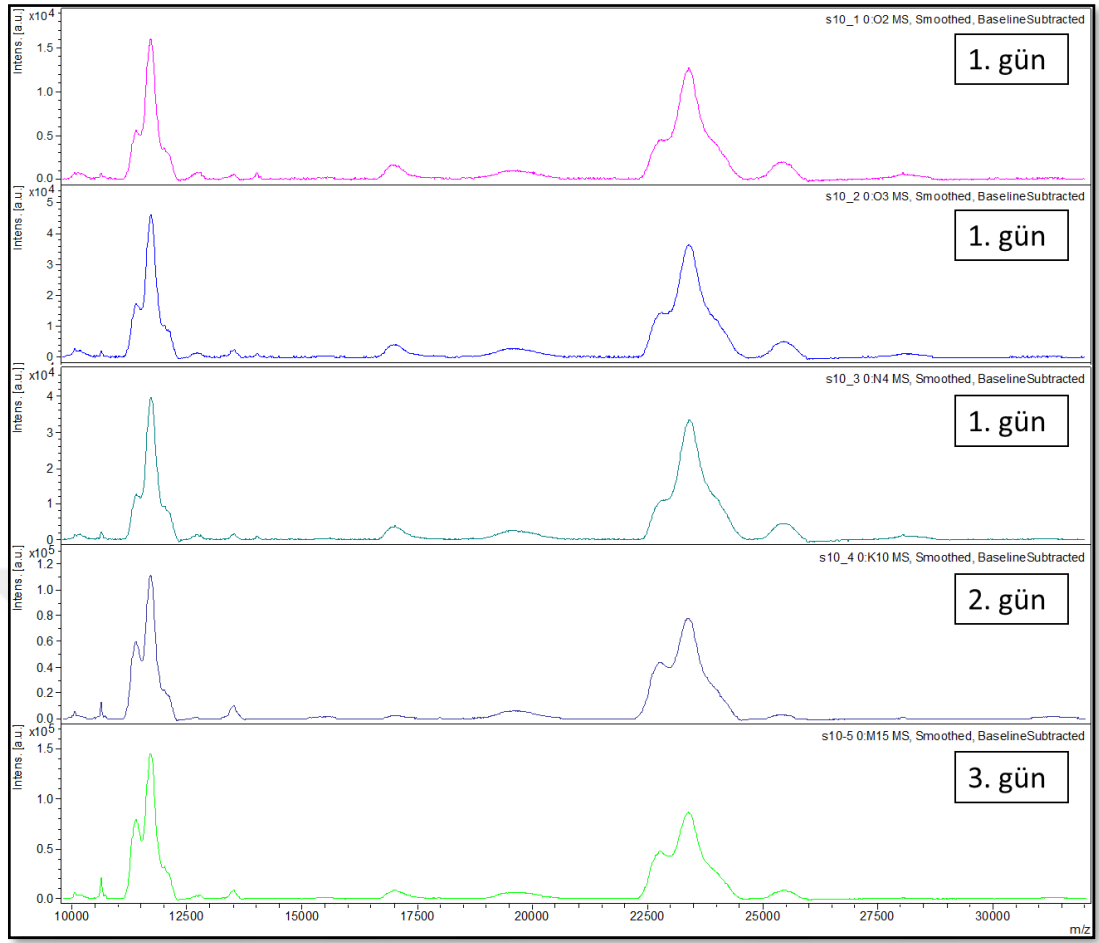
MALDI-TOF MS									Agreement	Wilson 95% CI
IFE	0	1	2	3	4	5	6	Total		
0	50	0	0	0	0	0	0	50	1,000	0,566 to 1,000
1	0	50	0	0	0	0	0	50	1,000	0,566 to 1,000
2	0	0	50	0	0	0	0	50	1,000	0,566 to 1,000
3	0	0	0	50	0	0	0	50	1,000	0,566 to 1,000
4	0	0	0	0	50	0	0	50	1,000	0,566 to 1,000
5	0	0	0	0	0	50	0	50	1,000	0,566 to 1,000
6	0	0	0	0	0	0	50	50	1,000	0,566 to 1,000
Total	50	50	50	50	50	50	50	350		

(0: Kontrol, 1: IgG kappa, 2: IgG lambda, 3: IgA kappa, 4: IgA lambda, 5: IgM kappa, 6: IgM lambda)

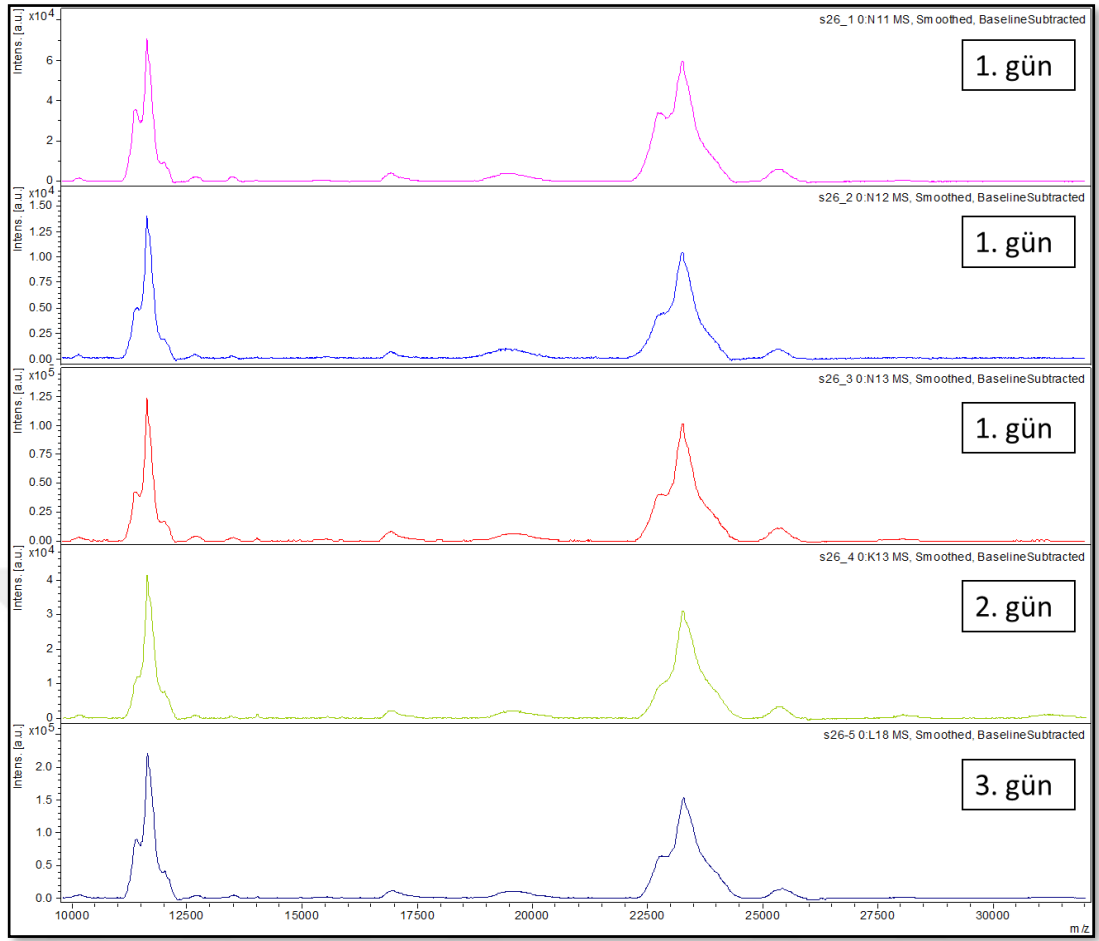


Şekil 38. İki yöntem (IFE ve MALDI-TOF MS) arasındaki uyum grafiği

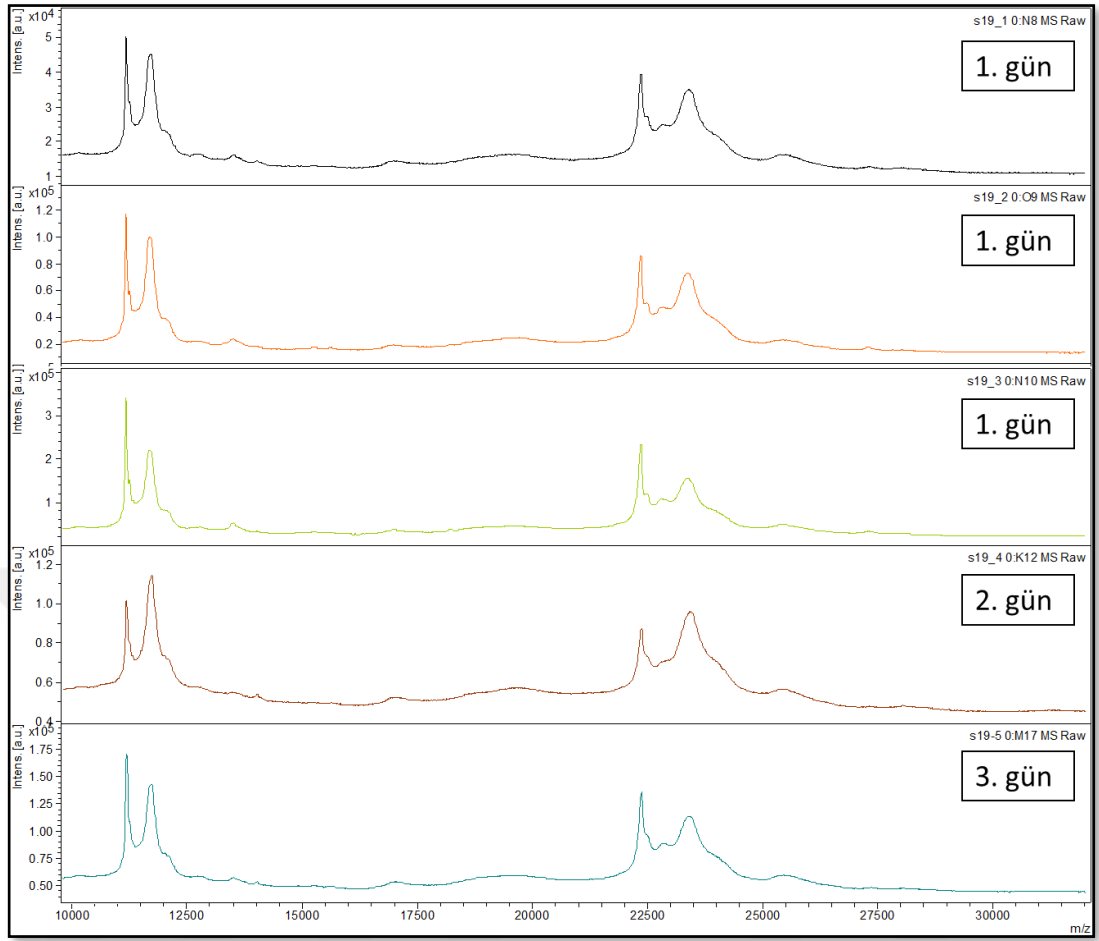
Yöntemin analitik uygulamaların gereksinimlerini karşılayıp karşılamadığını değerlendirmek için kalitatif testler için kullanılan in house olarak revize edilen uluslararası kılavuzlardaki yönergeler takip edildi. Belirli gruplara ait serum örneklerinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları gösterilmiştir (Şekil 39-40-41-42-43-44-45).



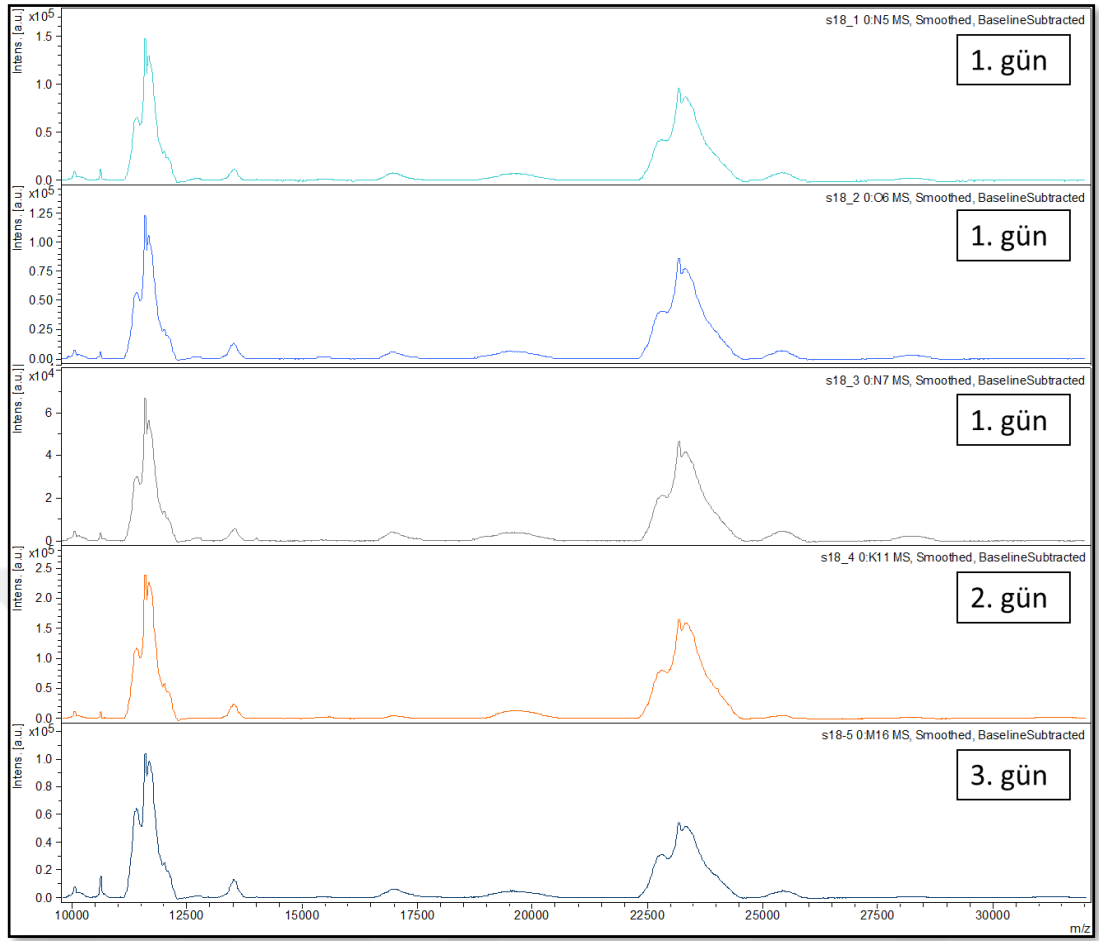
Şekil 39. Poliklonal serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



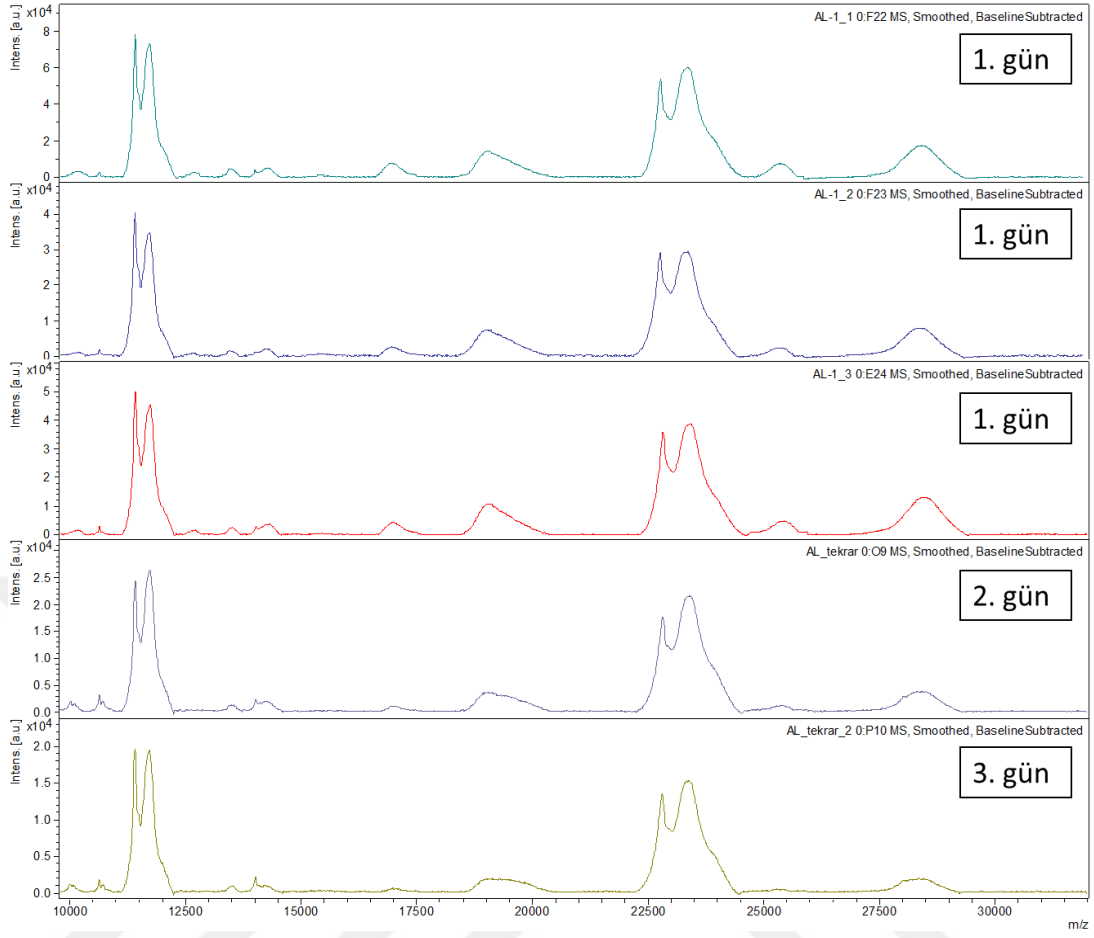
Şekil 40. IgG kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



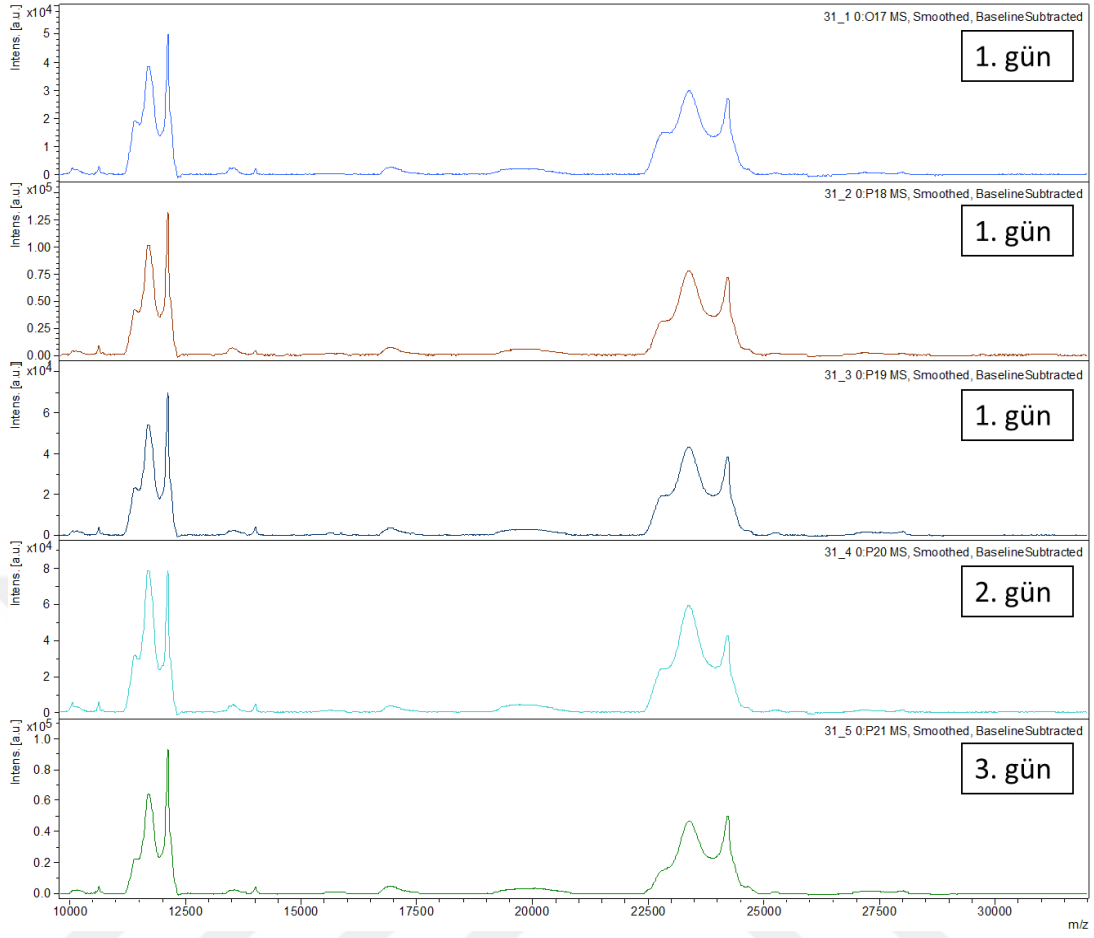
Şekil 41. IgG lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



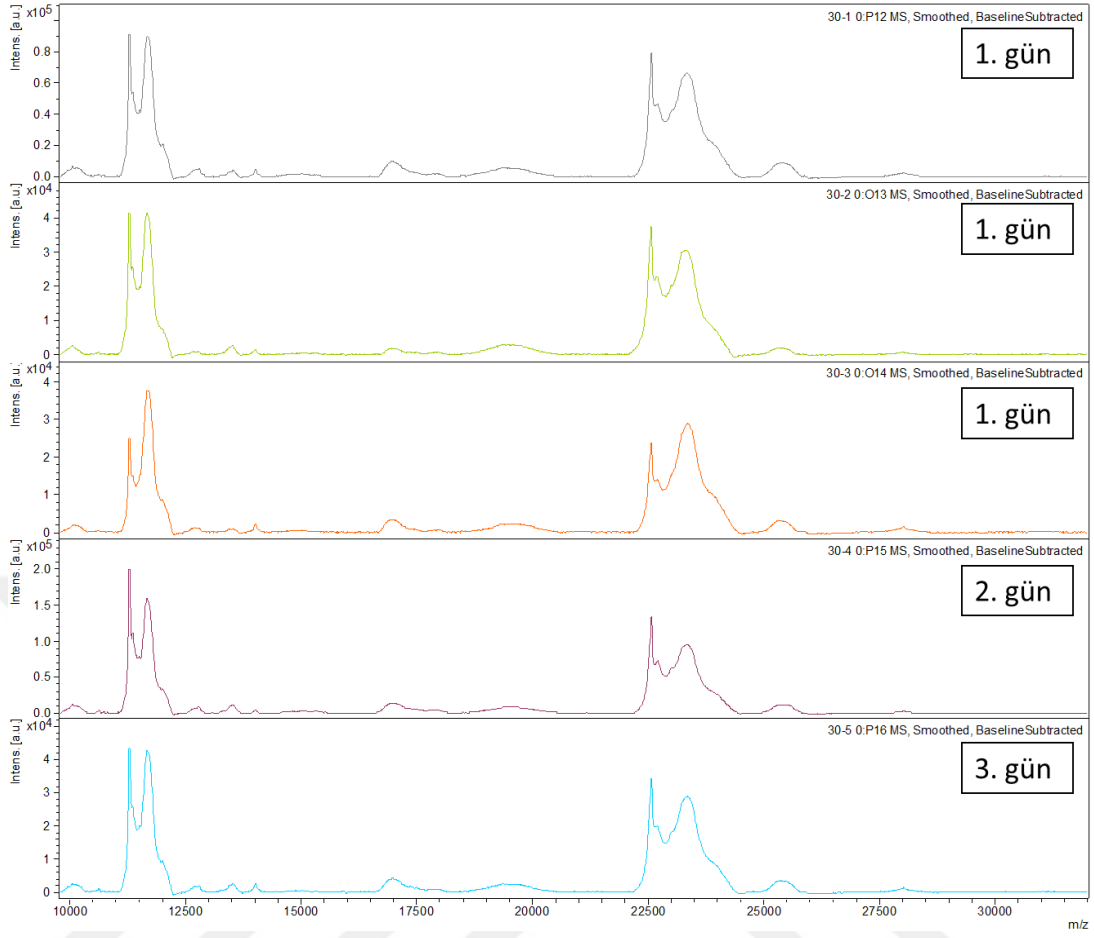
Şekil 42. IgA kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



Şekil 43. IgA lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



Şekil 44. IgM kappa serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları



Şekil 45. IgM lambda serum örneğinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

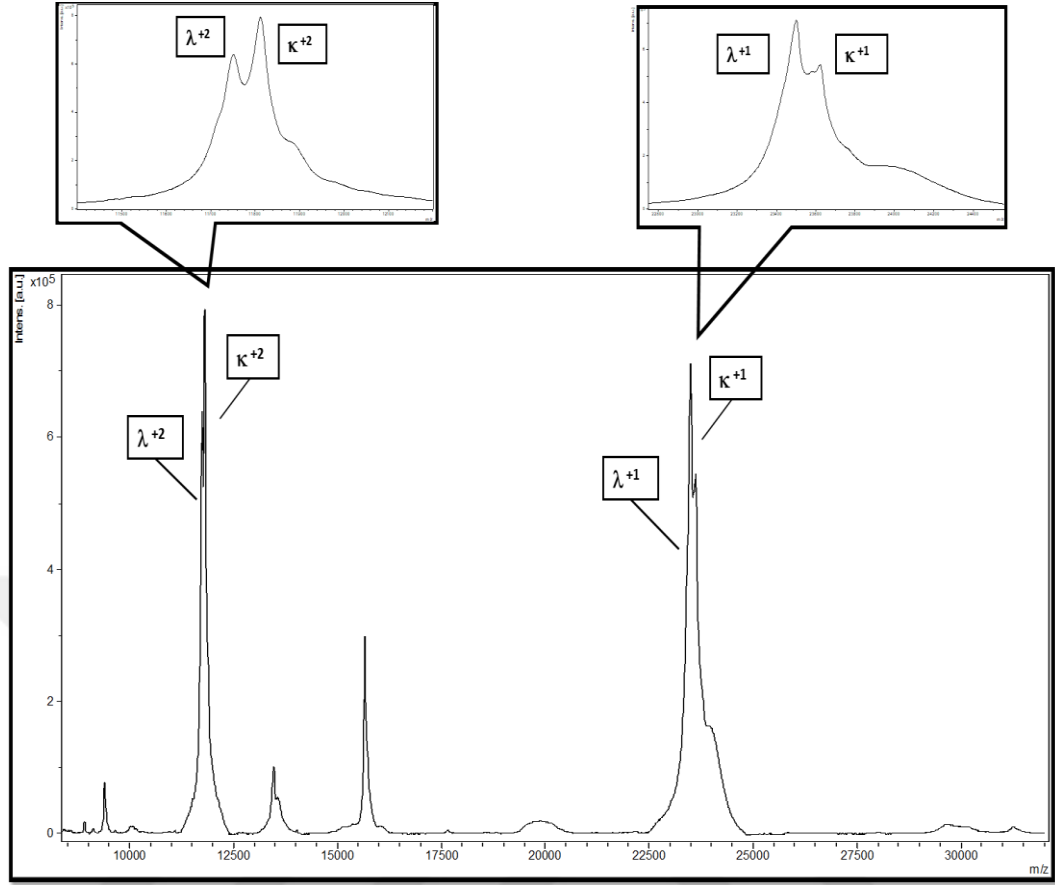
4.2 Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez ve Serbest Hafif Zincir (FLC) Testlerine Alternatif, Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

FLC'ye özgü immün-zenginleştirme dahil MALDI-TOF MS tabanlı yöntem, 105 serum örneği için rutin serum FLC test sonuçları ile karşılaştırıldı. Çalışmaya dahil edilen örneklerin tanımlayıcı istatistik sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir. Freelite test analizi sonuçları IFE yöntemi ile onaylanarak değerlendirilmiştir (sonuçlar gösterilmemiştir). MALDI-TOF MS tabanlı analiz ile belirlenen Freelite κ/λ oranları ve κ/λ oranları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma, uluslararası kabul edilen κ/λ oranının referans aralığına dayanmaktadır. Monoklonal FLC üretimini serbest test kiti ile analiz ederken, 0.26-1.65 referans aralığı temel olarak alınır.

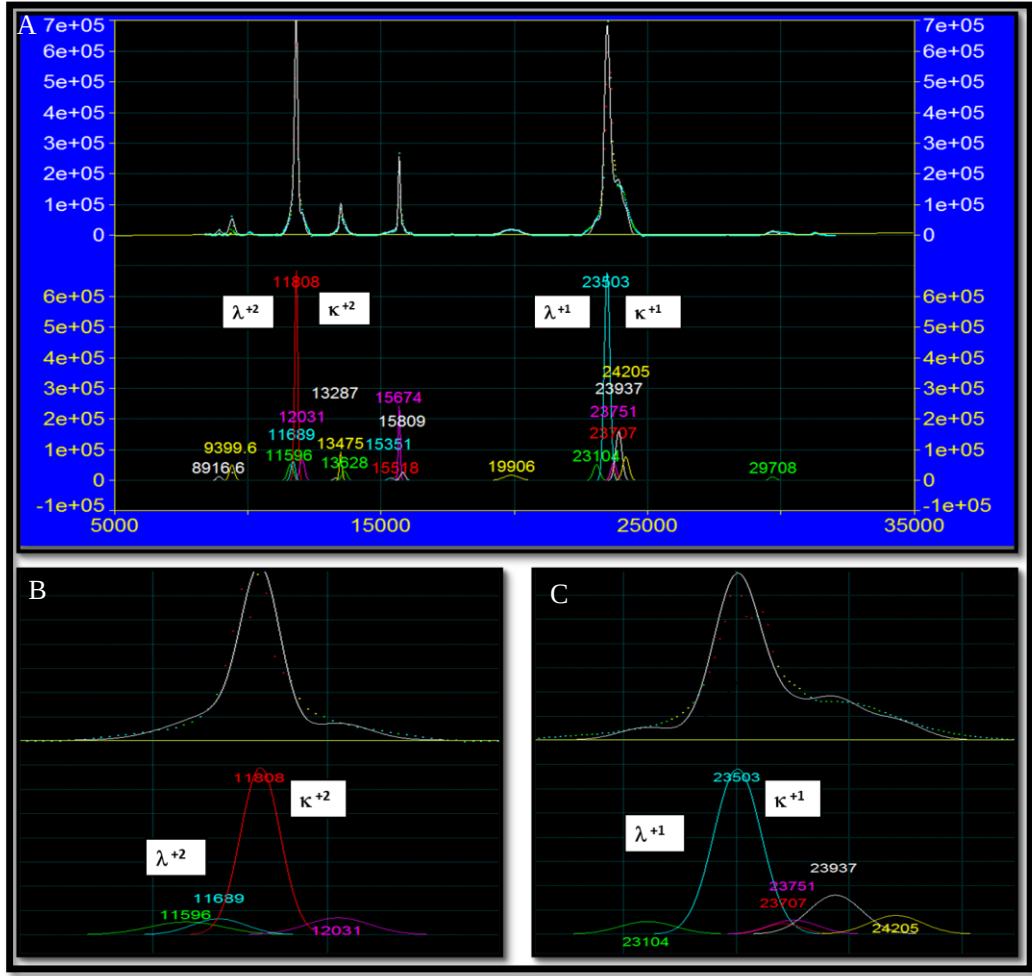
Tablo 10. Tanımlayıcı İstatistik Verileri

Variable	n	Mean	95% CI	Minimum	Median	Maximum	IQR
sFLC κ/λ : 0.26-1.65	68	1,13	1,05	0,31	1,15	1,63	0,49
sFLC $\kappa/\lambda >1.65$	38	21,18	3,88	1,65	3,07	252,71	4,74
MALDI κ/λ : 0.26-1.65	71	1,06	0,98	0,32	1,08	1,64	0,50
MALDI $\kappa/\lambda >1.65$	36	3,73	2,99	1,47	3,22	9,37	3,11

MALDI-TOF MS analizinden sonra, FLC'lerin m/z dağılımı, $[M+H]^+1$ ve $[M+2H]^+2$ 'deki zirveleri tespit etmek için Flex Analizi yazılımı ile gösterilmiştir (Şekil 46). $[M+H]^+1$ ve $[M+2H]^+2$ 'deki tepe alanları, PeakFit programındaki pik uyum algoritmaları ile gösterilmiştir (Şekil 47).



Şekil 46. Ek şekiller FLC'nin $[M+H]^{+1}$ ve $[M+2H]^{+2}$ yükü için m/z dağılımlarını göstermektedir.



Şekil 47. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı A) Hem $[M+H]^{+1}$ hem de $[M+2H]^{2+}$ yük için genişletilmiş FLC m/z dağılım perspektifleriyle 9200 ila 32000 m/z aralığındaki numune spektrumu. B ve C) FLC m/z sinyallerinin pik uydurma ve gauss dağılımlarının temsili bir sonucu.

FLC ölçümünde, $[M+2H]^{+2}$ dağılımının $[M+H]^{+1}$ dağılımından daha hassas olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, $[M+2H]^{2+}$ dağılımındaki FLC'lerin oranları çalışmaya dahil edilmiştir. Değerlendirme sonucunda, piklerin m/z değerleri PeakFit 4.12 yazılımı ile analiz edildi ve κ/λ oranları AUC'ye göre hesaplandı. MALDI-TOF MS ve referans yöntem (sFLC) arasındaki Cohen'in Kappa katsayısı, normal (negatif) sonuçlar ($\kappa = 0,92$; %95 CI) ile artan (pozitif) sonuçlar arasında neredeyse mükemmel bir uyum göstermiştir. FLC oranları ($\kappa = 0,76$; %95 CI) (Tablo 11).

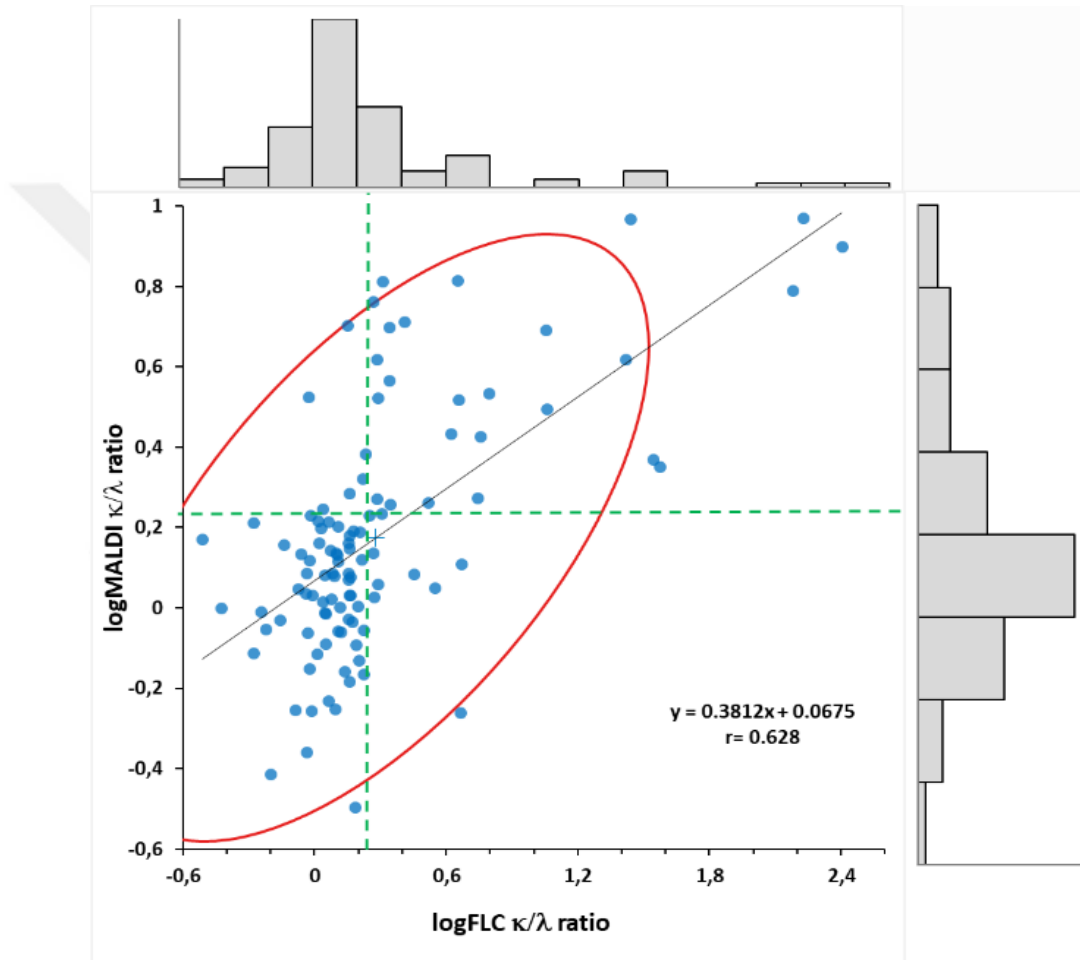
Tablo 11. Serum κ/λ oranları ölçümlerinin iki yöntem (sFLC ve MALDI-TOF MS) arasındaki uyumu

sFLC κ/λ ratio	Number of samples	MALDI-FLC κ/λ ratio				
		κ	λ	None	Agreement	Wilson 95% CI
0.26-1.65	71	14	15	42	0,925	0,837 to 0,968
>1.65	34	21	12	1	0,763	0,608 to 0,870
Total	105	35	27	43		

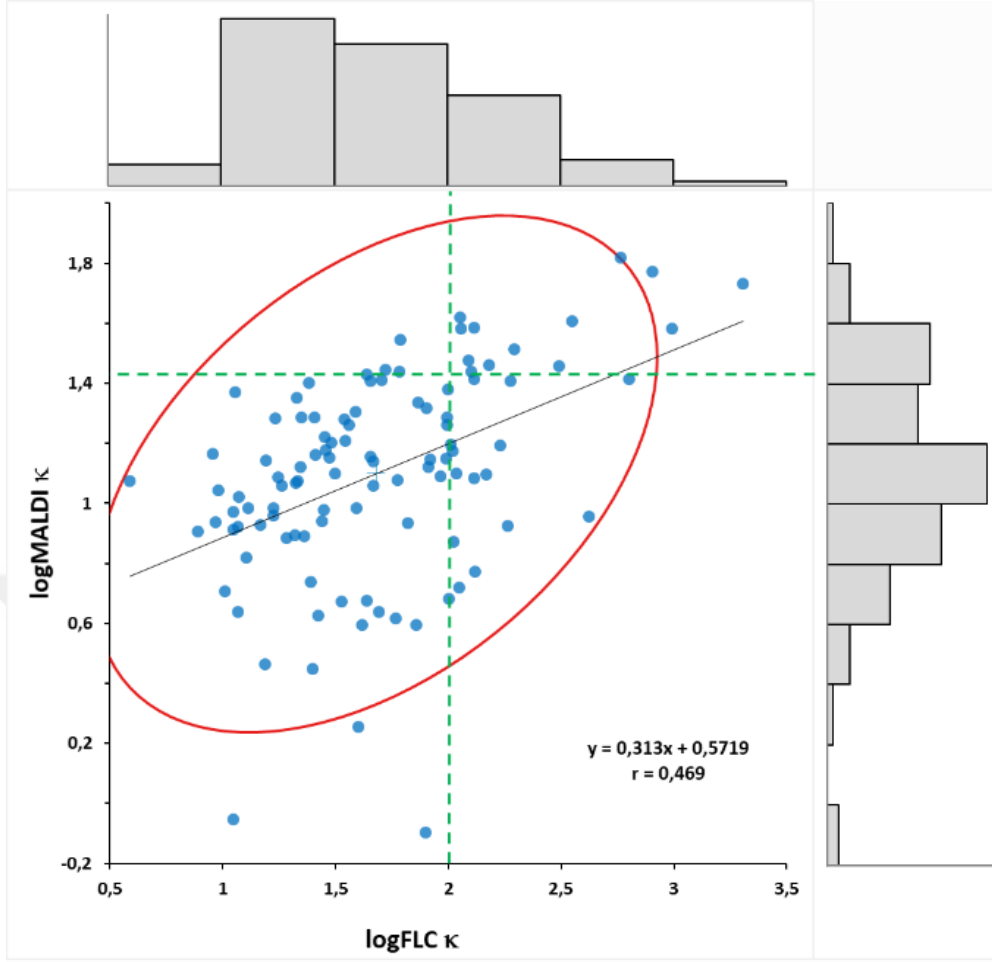
İki tahlil ile analiz edilen serum örneklerinin sonuçlarını bir araya getirdik ve her bir marker için hesaplanan korelasyon oranları. Şekil 48-49-50, serum FLC oranı, serbest kappa ve serbest lambda arasındaki korelasyonu göstermektedir. Serbest kappa ($r = 0,469$, $0,300$ ile $0,610$; $p < 0,0001$) ve serbest lambda ($r = 0,366$, $0,187$ ile $0,521$; $p < 0,0001$), MALDI ve FLC deneyleri arasında pozitif bir korelasyon gösterdi. En iyi korelasyon serum serbest κ/λ oranları ($r = 0.628$, 0.496 ile 0.732 ; $p < 0.0001$) arasında bulundu (Tablo 12). Her üç modelin de ROC fonksiyonlarının AUC'si tarafından test edilen grupları tahmin etme yeteneği gösterilmiştir. Şekil 51'de her bir marker için ROC eğrisi ve AUC için ortaya çıkan p değerleri listelenmiştir. Bu modellerin üçü de büyük AUC değerlerine sahipti, MALDI κ/λ oranı modeli en yüksek (AUC: $0,985$; SE = $0,015$) (Tablo 13). Optimal kesme değerleri, kappa, lambda ve κ/λ değerleri için ROC eğrileri kullanılarak belirlendi (Tablo 13).

Tablo 12. MALDI-TOF MS ve sFLC belirteçleri arasındaki korelasyon analizi

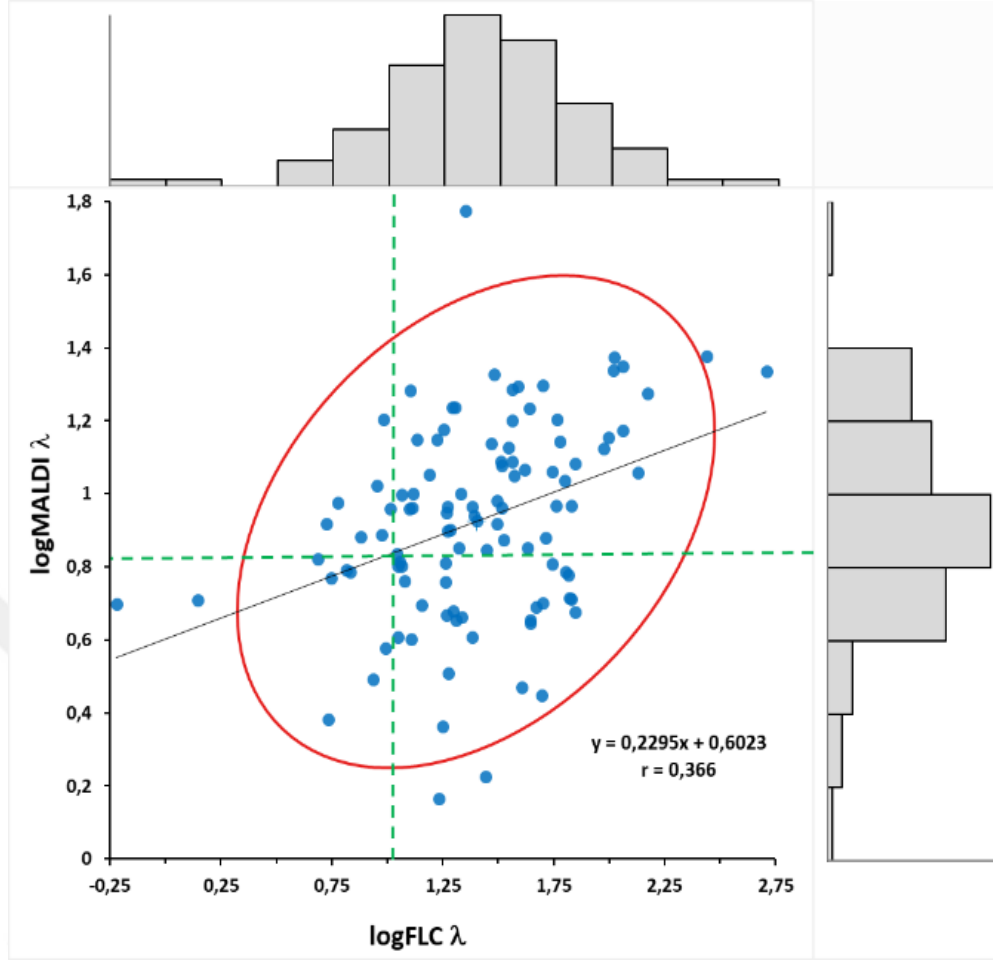
	r	Fisher 95% CI	p-value
log κ/λ ratio	0,628	0,496 to 0,732	<0,0001
log kappa	0,469	0,300 to 0,610	<0,0001
log lambda	0,366	0,187 to 0,521	<0,0001



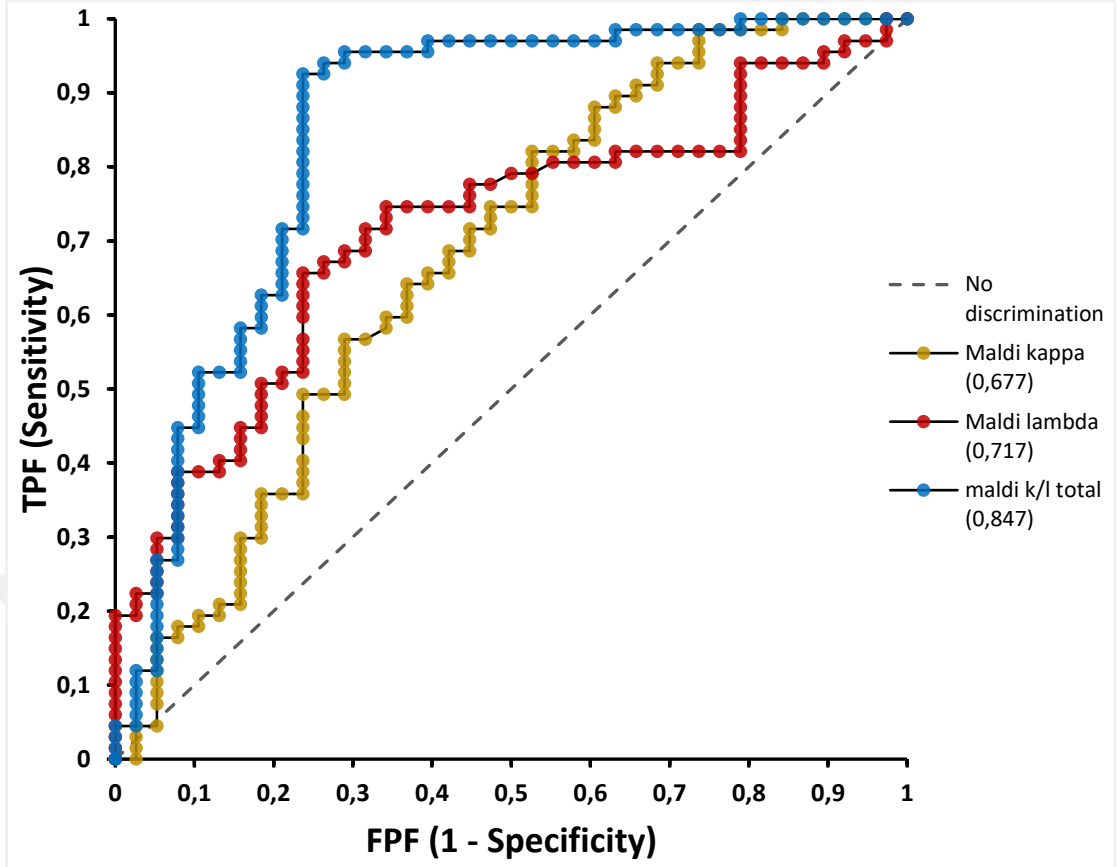
Şekil 48. Serbest kappa/lambda oranları arasındaki korelasyon analizi. y eksenini MALDI-TOF MS sonuçlarını, x eksenini sFLC testini göstermektedir. Pearson korelasyon katsayısı (r) ve p değerleri Pearson sıra korelasyon analizi kullanılarak belirlendi. Kesintisiz çizgiler, lineer regresyon analizi ile tahmin edilen en iyi uyumu temsil eder. Noktalı çizgiler kesme değerlerini temsil eder.



Şekil 49. Serbest kappa değerleri arasındaki korelasyon analizi. y eksenini MALDI-TOF MS sonuçlarını, x eksenini sFLC testini göstermektedir. Pearson korelasyon katsayısı (r) ve p değerleri Pearson sıra korelasyon analizi kullanılarak belirlendi. Kesintisiz çizgiler, lineer regresyon analizi ile tahmin edilen en iyi uyumu temsil eder. Noktalı çizgiler kesme değerlerini temsil eder.



Şekil 50. Serbest lambda oranları arasındaki korelasyon analizi. y eksenini MALDI-TOF MS sonuçlarını, x eksenini sFLC testini göstermektedir. Pearson korelasyon katsayısı (r) ve p değerleri Pearson sıra korelasyon analizi kullanılarak belirlendi. Kesintisiz çizgiler, lineer regresyon analizi ile tahmin edilen en iyi uyumu temsil eder. Noktalı çizgiler kesme değerlerini temsil eder.



Şekil 51. Alıcı işletim karakteristiği eğrisi (ROC) analizi. MALDI kappa, MALDI lambda, MALDI κ/λ oranlarının karşılaştırmalı ROC eğrisi grafiği. EAA ve SE'ler aşağıdaki gibidir: MALDI kappa: EAA = 0,677; SE = 0,057; MALDI lambda: EAA= 0,717; SE = 0,051; MALDI κ/λ oranı: AUC = 0,847; SE = 0.045. Gri kesikli çizgiler: ROC eğrisinin kesme değerleri. Noktalı çizgiler, %95CI'nın üst ve alt sınırlarını temsil eder. AUC = eğrinin altındaki alan

Tablo 13. ROC Eğrisi Parametrelerinin Özet Tablosu

TEST	AUC	95% CI	Optimal Cutoff	TPF (Sensitivity)	FPF (1-Specificity)
MALDI κ	0,677	0,564 to 0,789	30	0,985	0,737
MALDI λ	0,717	0,617 to 0,816	7,11	0,746	0,342
MALDI κ/λ	0,847	0,758 to 0,936	1,70	0,925	0,237

4.3 Alzheimer Hastalığının Teşhisinde Mikropipet Afinite Kromatografi ile Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

4.3.1 LC zirvelerinin tespiti ve κ LC/ λ LC oranlarının karşılaştırması

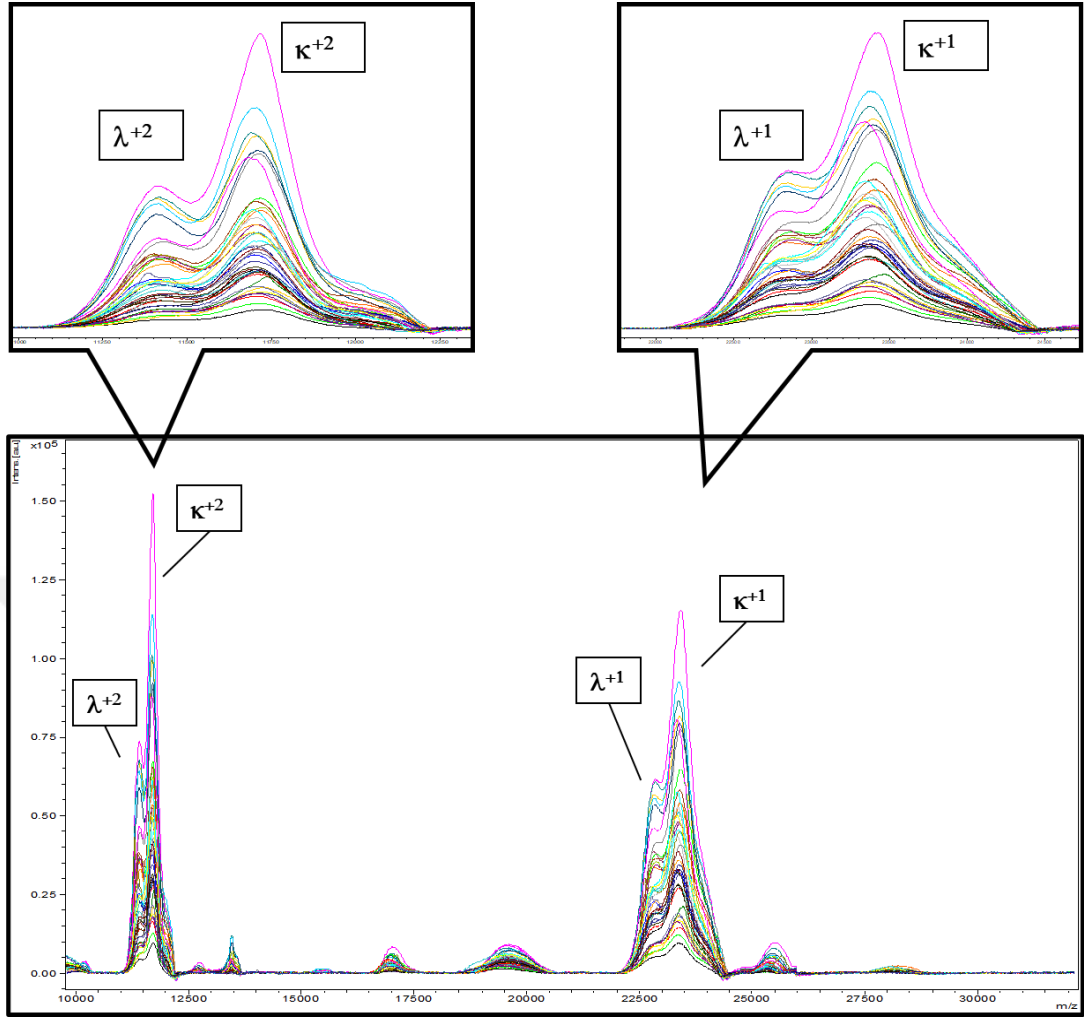
İmmünoglobulin hafif zincir izolasyonu için gerekli adımlar şunları içerir: i) numunenin spin kolonlarına yüklenmesi, ii) hedef immünglobulinlerini bağlama, iii) bağlı olmayan bileşenleri uzaklaştırmak için yıkama adımları ve iv) rezine bağlı immünglobulinlerin elüsyonu. Bu adımların her biri etkili izolasyon için çok önemlidir. Farklı çözücü karışımlarının etkilerini, tekrarlama sayısını ve en etkili izolasyon için süreçlerin süresi optimize edildi. Bu süreçle, numuneden numuneye kadar insan kaynaklı olası varyasyonlar ortadan kaldırılmıştır. Multiplex çalışma için uygun bir yöntem elde etmek için farklı rezin oranları karıştırıldı ve optimum rezin karışımını belirlemek için serum örneklerinde total LC immünoglobulin proteinlerinin ayrılması analiz edildi. Analiz maliyetini azaltmak için minimum miktarda rezin (1 uL κ ve 1 uL λ reçineleri) kullanıldı. Ig hafif zincir proteinleri teşhis etmek için kullanılan rezin miktarı, MALDI-TOF MS cihazında etkili protein izolasyonu ve tespitini sağladı. Bu nedenle, afinite rezin karışımındaki (1 uL κ ve 1 uL λ) her protein tipi için uygun rezin konsantrasyonu optimize edildi.

Yazılım optimizasyonu için veri kümesini anlamlandırmak için analizler yapıldı ve en uygun yöntem seçildi. Buna göre, rastgele oranlarda hazırlanan immünoglobulin hafif zincir karışımları, MALDI-TOF MS ile okundu. Elde edilen değerlerin ölçülen ve gerçek değerler olarak raporlanmasıyla bir veri seti oluşturuldu. Bu veri kümesi bir eğitim veri seti olarak değerlendirildi. Yazılım optimizasyonu, MALDI analizinde elde edilen Ig hafif zincirlerine özgü m/z spektrumlarına dayanarak yapıldı ve uygun pik algoritması uygulandı. Dahil edilen hastaların ve kontrollerin tanımlayıcı özellikleri ve istatistikleri Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. Tanımlayıcı istatistik verileri

	Kontrol	AD	p değeri	Mean 95% CI
n	21	22		
Yaş (Yıl $\pm$ SD)	68.19 $\pm$ 8.30	71.77 $\pm$ 5.04	0.093	-3.582 (-7.791)-(0.626)
Cinsiyet (K/E)	10K, 11E	11K, 11E		
Kappa (κ) seviyesi (TLC $\pm$ SD)	22.077 $\pm$ 2.822	18.725 $\pm$ 2.852	<0.001	3.352(1.604)-(5.099)
Lambda (λ) seviyesi (TLC $\pm$ SD)	13.701 $\pm$ 2.521	9.164 $\pm$ 1.364	<0.001	4.537(3.297)-(5.777)
κ/λ oranı	1.643 $\pm$ 0.227	2.052 $\pm$ 0.223	<0.001	-0.409(-0.269)-(-0.547)

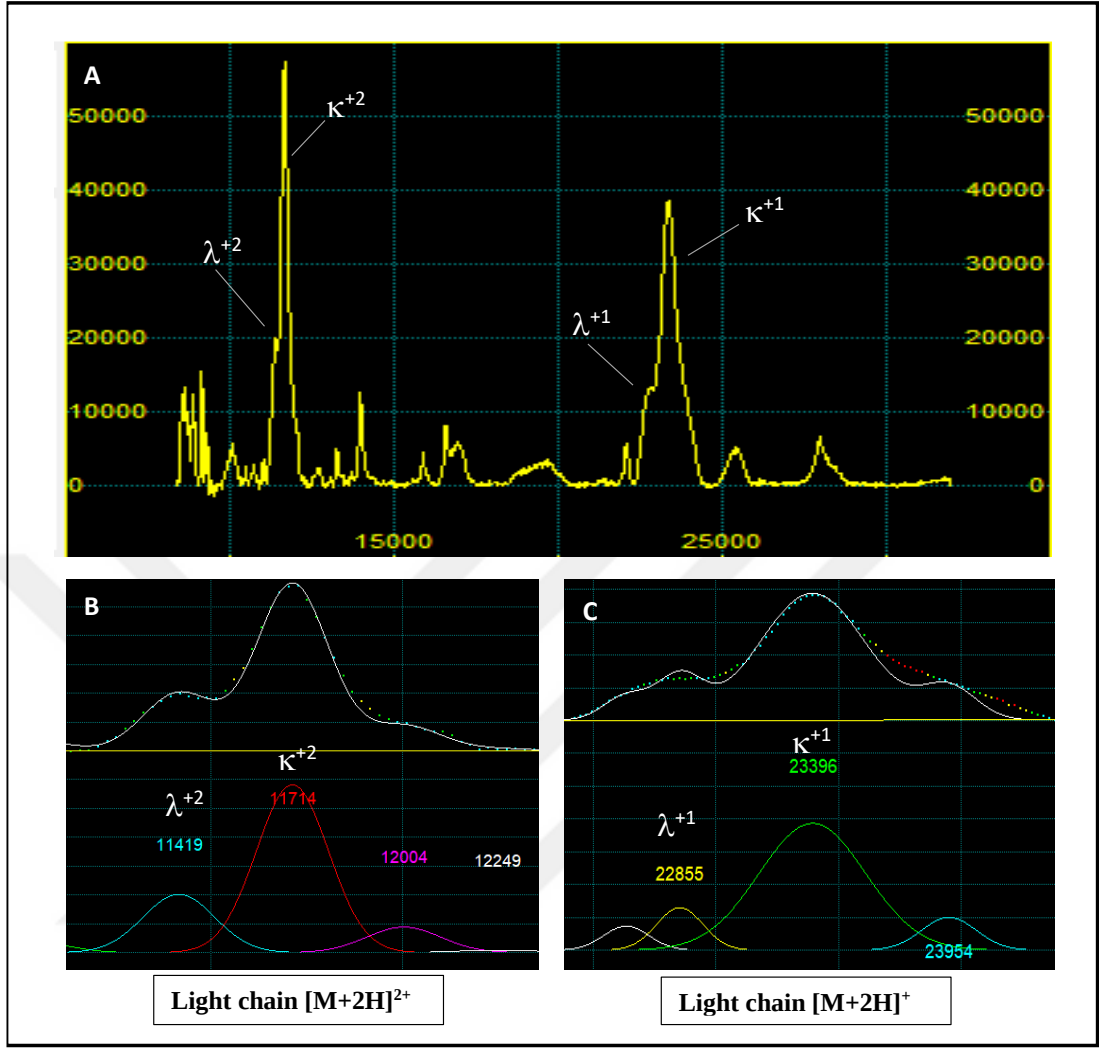
Bu yöntem, M-proteinleri tespit etmek ve ölçmek için hedef proteinlerin afinite rezinleri ile saflaştırılmasını ve saflaştırılmış proteinlerin MALDI-TOF MS ile analizini içerir. AD hasta serumları, serumda LC MALDI-TOF-MS analizinin performansını karakterize etmek için analiz edildi. 8400 ve 32000 arasındaki m/z aralığında κ ve λ LC pikleri fragmanları tespit edildi. Hem hastanın hem de kontrol serumlarının immün-zenginleştirilmesinden elde edilen toplam LC m/z spektrumları üst üste bindirildi. Hafif zincirlerinin m/z dağılımı, Flex analysis programı (bruker) ile sınıflandırılmış hastalarda $[M+1H]^{+1}$ ve $[M+2H]^{+2}$ deki pikleri belirlemek için kontrol edildi ve tespit edilen pik paternlerine göre monoklonal hafif zincirlerini tipleri kontrol edildi. Şekil 52, sağlıklı kontrol ve hasta serumlarından κ ve λ proteinlerine ait iyonların üst üste binen Gauss m/z dağılımlarını göstermektedir. Tüm hasta örneklerinin LC κ pikleri, kontrol LC κ pikleri ile karşılaştırıldığında daha dar ve daha keskin olarak gözlemlendi. Analiz sonuçlarında yüksek bir monoklonal immünoglobulin üretimi, bir spektrum üzerinde bir sivri uç (M proteini veya M spike) olarak gösterildi, bu durum SPEP tarafından bulunan M sivri uçlarına benzemektedir.



Şekil 52. Bir M-proteini içeren kontrol ve hasta numunelerinin temsili olarak üst üste bindirilmiş spektrumları.

Şekil 53, PeakFit 4.12 yazılımındaki pik fit algoritmaları ile $[M+1H]^{+1}$ ve $[M+2H]^{+2}$ 'deki pik alanlarını göstermektedir. Bu yazılım tarafından her numune için üretilen üst üste binmiş kütle spektrumlarının hesaplanmasıyla LC κ ve λ tepe alanlarının saptanması gerçekleştirildi. Daha sonra LC oranlarını hesaplandı ve hastaların sağlıklı kontrollerden daha yüksek bir konsantrasyona sahip olduğu tespit edildi (Tablo 14).

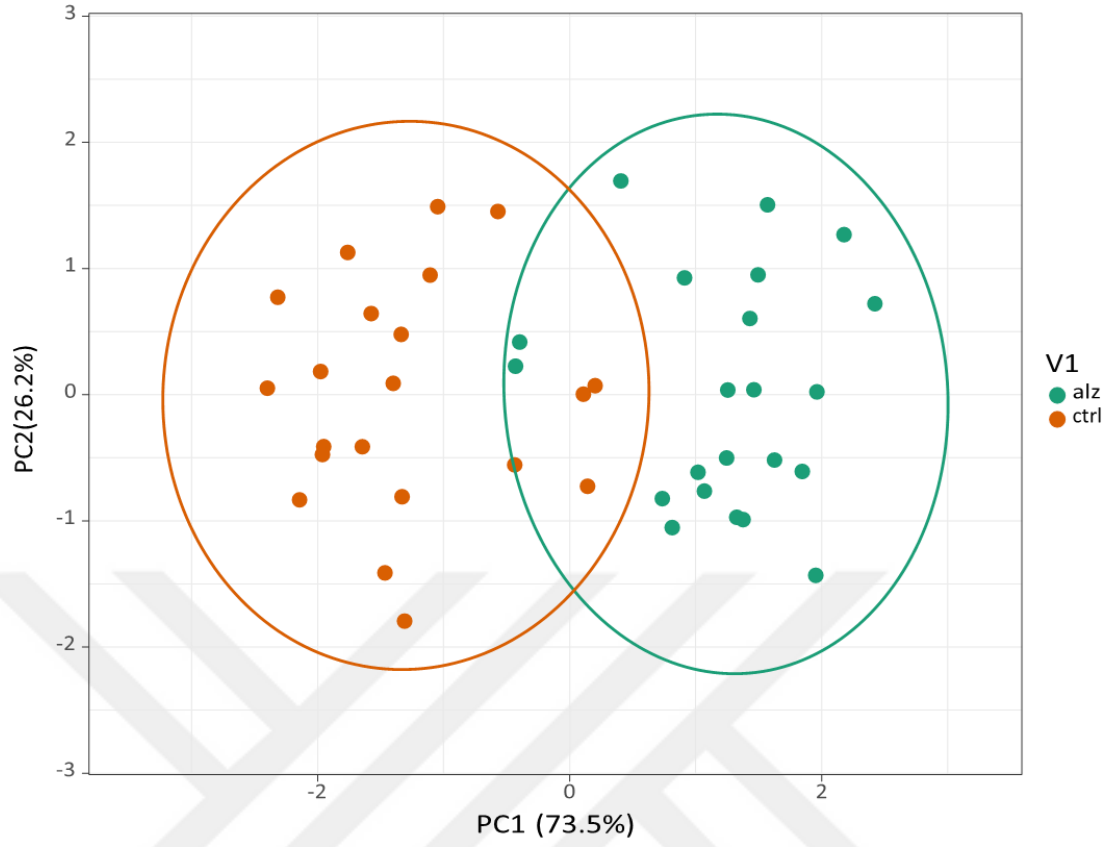
M-protein varlığına LC $[M+ 2H]^{2+}$ dağılımının, $[MH]^{1+}$ dağılımından daha duyarlı olduğu gösterildi. LC MALDI-TOF MS yöntemi, tüm AD vakalarında anormal LC oranlarının varlığını doğruladı. Hastalar ve kontroller arasında κ ve λ LC oranlarının ayrılması, Student t-testi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, serum κ LC/ λ LC oranları AD'de kontrollerden anlamlı olarak daha yüksekti (-0,409; % 95 CI:-0,547 ile -0,269; p <0,001) (Tablo 14).



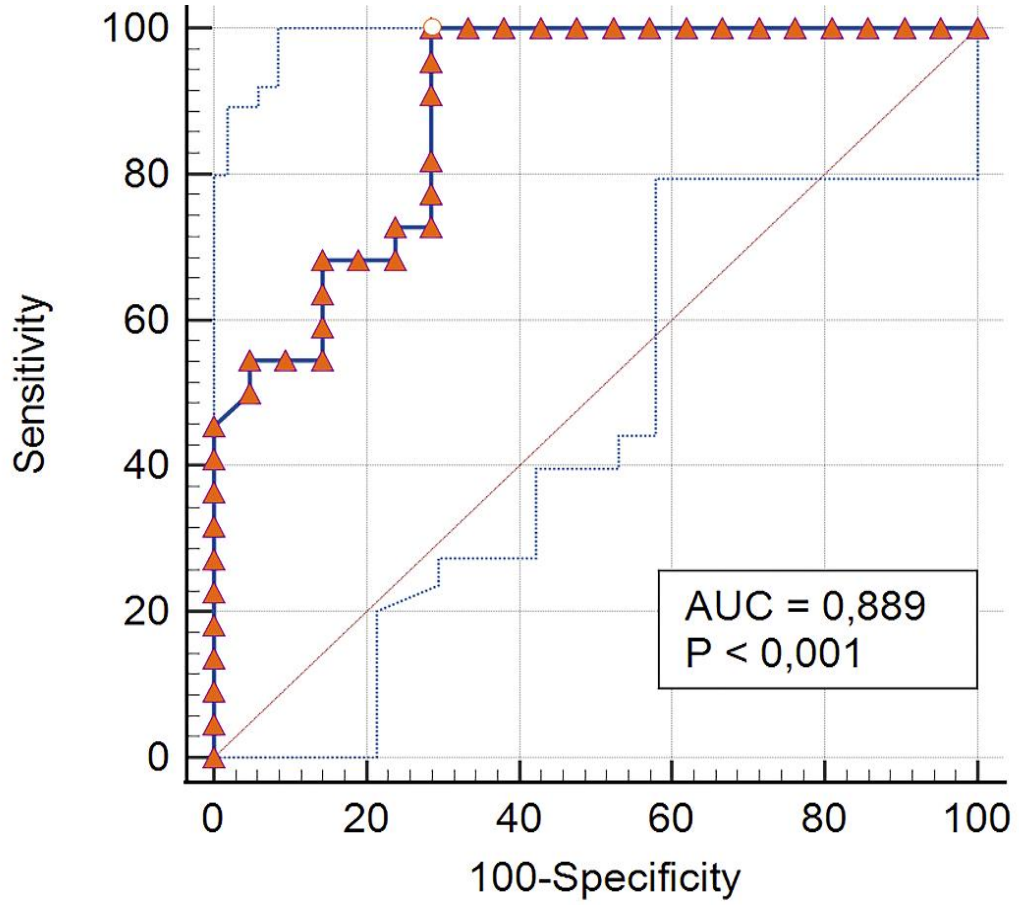
Şekil 53. PeakFit yazılımında gerçekleştirilen piklerin ayrımı A) Hem $[M+H]^{+1}$ hem de $[M+2H]^{2+}$ yükleri için genişletilmiş LC m/z dağılım perspektifleriyle 8400 ila 32 000 m/z aralığındaki serum kontrol spektrumu. B-C) LC m/z sinyallerinin pik uydurma ve gauss dağılımlarının temsili bir sonucu gösterilmektedir.

4.3.2 AD teşhisinde $\kappa\text{LC}/\lambda\text{LC}$ oranının biyobelirteç olarak performansı

PCA skor analizi ile iki grup içindeki kümelemenin ve gruplar arasındaki ayrımın açık olduğunu göstermiştir (Şekil 54). Kappa/lambda oranlarına ait veriler daha fazla analiz için EZinfo 3.0.3 programı ile analiz edilmiştir. İki grup arasındaki değişken trend grafiği Şekil 55'de gösterilmiştir. Sonuçlar, iki grup arasındaki farkın, κ/λ oranlarında önemli değişikliklere işaret etmek anlamına geldiğini ve iki gruptaki κ/λ farkı oranlarının AD varlığı ile bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Şekil 56, pozitif serum biyobelirteçleri olan AD'li hastaların serum $\kappa\text{LC}/\lambda\text{LC}$ oranlarının, negatif serum biyobelirteçleri olan AD olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında performansını temsil eder. Eğrinin altındaki alan 0,889 idi. ROC Eğrinin altındaki alan (AUC) 0,889 idi. AD teşhisi için, $\kappa\text{LC}/\lambda\text{LC}$ oranı için optimal cut-off değeri 1,713 olarak tespit edildi. $\kappa\text{LC}/\lambda\text{LC}$ oranlarının cut-off değeri olarak 1,713 baz alındığında, sensitivite %100,0 (%95 CI: 84,6 -100,0) ve spesifisite %71,43 (%95 CI: 47,8 -88,7) olarak gösterildi. Bu nedenle, $\kappa\text{LC}/\lambda\text{LC}$ oranları, AD ve AD olmayan hastaları yüksek sensitivite ve spesifisite ayırt etmektedir.



Şekil 54. Temel bileşenler analizi (PCA). AD'li hastalarda (yeşil nokta) ve kontrol grubunda (turuncu nokta) κ/λ hafif zincir oranı profillerinin PC1, gruplar arasındaki %73,5'lik değişimi ve PC2, %26,2'lik değişimi açıklamaktadır.



Şekil 56. Alıcı işletim karakteristiği eğrisi (ROC) analizi. Serum κ LC/ λ LC oranı için ROC eğrisinin AD hastalarını ve sağlıklıları ayırt ettiği gösterilmiştir. ROC eğrisi altındaki alan 0,889 belirlenmiştir. Sensitivitenin ve spesifitenin optimum kesişimi kullanılarak ROC eğrisinden optimal cut-off değeri $>1,713$ olarak belirlendi. AD'nin saptanması için en uygun eşik, %100,0 sensitivite ve %71,43 spesifite ile olmuştur.

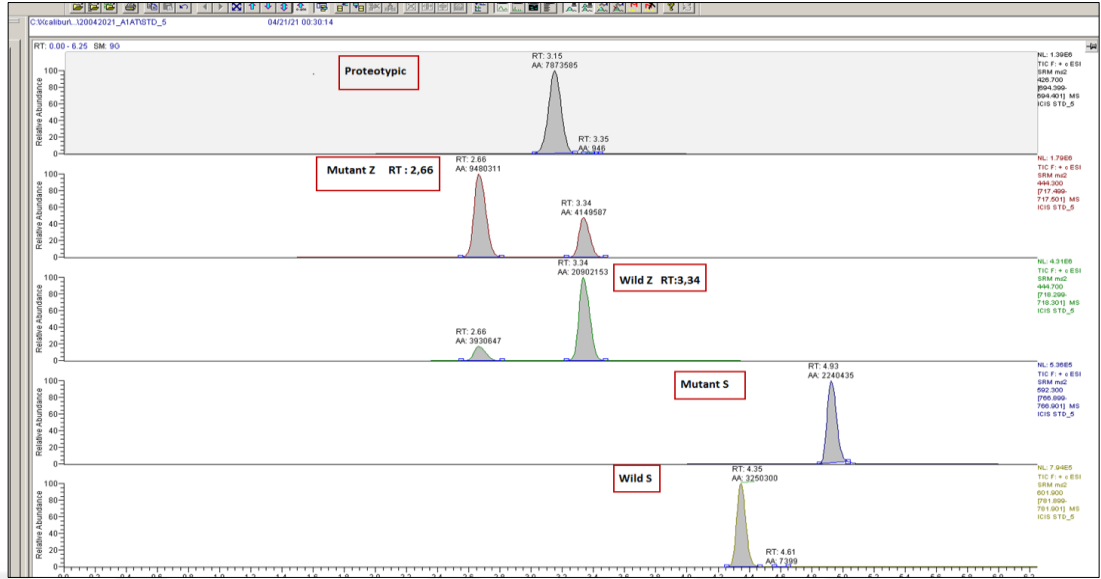
4.4 Klinik Testlerde Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Hasta serum numuneleri, peptitler oluşturmak için tripsin ile enzimatik olarak kesildikten sonra, alel tanımlaması, S ve Z varyantlarını içeren triptik peptitlerin saptanması ve referans olarak izotopik olarak etiketlenmiş dahili standart peptitlerle karşılaştırılması sağlanmıştır. Tablo 15'te referans peptitlerin MS/MS geçişleri gösterilmektedir.

Tablo 15. LC-MS/MS deneyinde izlenen sentetik peptitlerin MS/MS geçişleri.

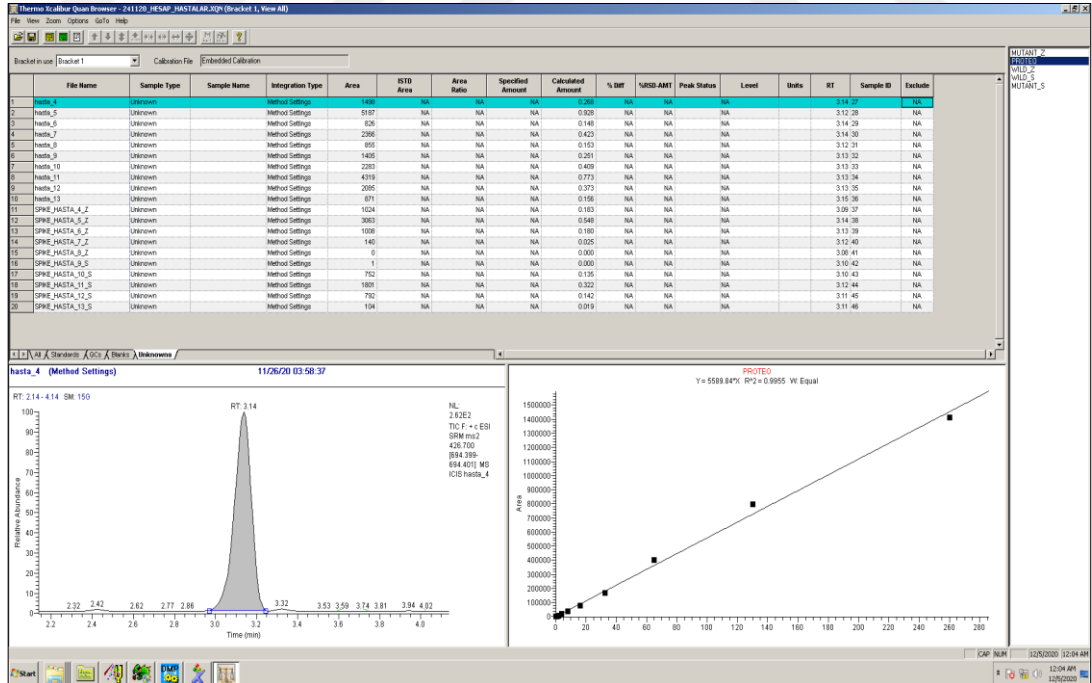
#	Parent	Product	SRM Collision Energy	Scan Time	Retention Time	Time Window	Polarity	Trigger	Name
1	426.7	694.4	16	0.100	6.00	12.00	+	0	Proteotipik
2	592.3	766.9	16	0.100	6.00	12.00	+	0	Mut-S
3	601.9	781.9	16	0.100	6.00	12.00	+	0	WT-S
4	444.7	718.3	16	0.100	3.35	4.00	+	0	WT-Z
5	444.3	717.5	16	0.100	2.50	2.00	+	0	Mut-Z

İzotopik olarak işaretlenmiş beş peptit, seruma eklendi. Bu dahili standart peptitler, bilinen A1AT parçalanma ürünlerine özdeş izotopik olarak etiketlenmiş amino asit dizilerine sahipti ve bunların kromatografik alıkonma süreleri belirlendi. Beş etiketli peptit, tüm A1AT alellerinde ortak olan bir triptik peptitten (proteotipik peptit) ve mutasyona uğramış S ve Z alelleri için peptitlerden (S ve Z peptitleri) ve aynı bölgeden karşılık gelen vahşi tip M peptitlerinden oluşuyordu (S ve Z olmayan peptitler) (Şekil 57). Ek olarak, Mutant ve Wild type peptitlerine ait pikler alıkonma zamanı (RT) farkı dolayısıyla birbirinden ayrılmaktadır.

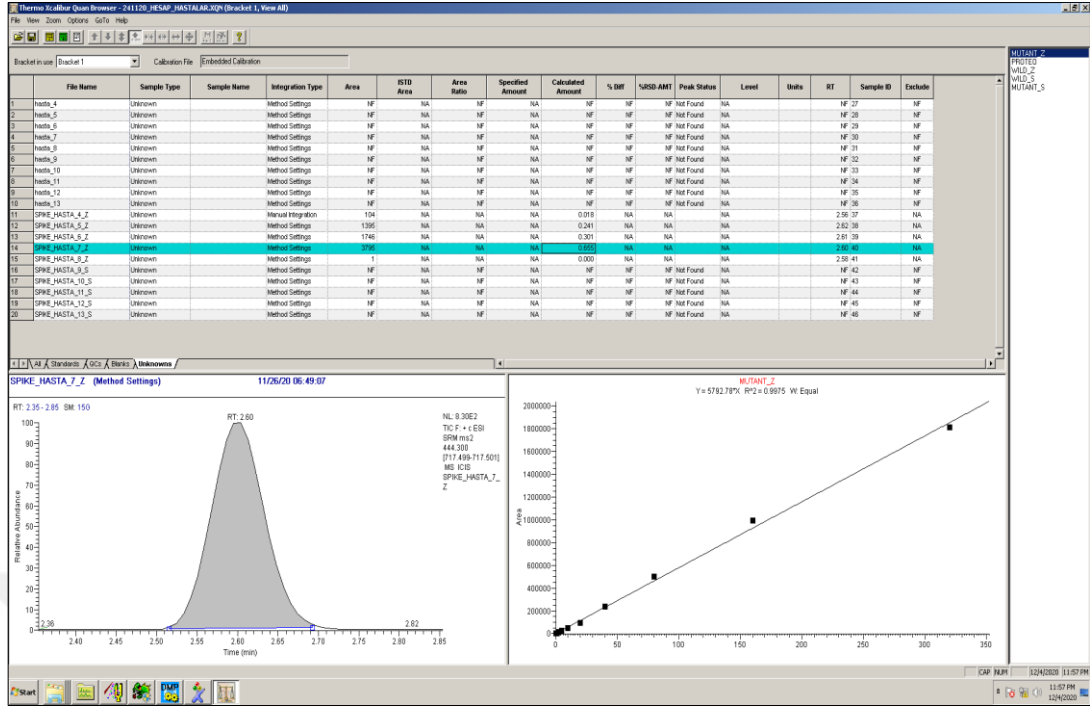


Şekil 57. Sentetik peptitler ile MRM analizinin verifikasyonu

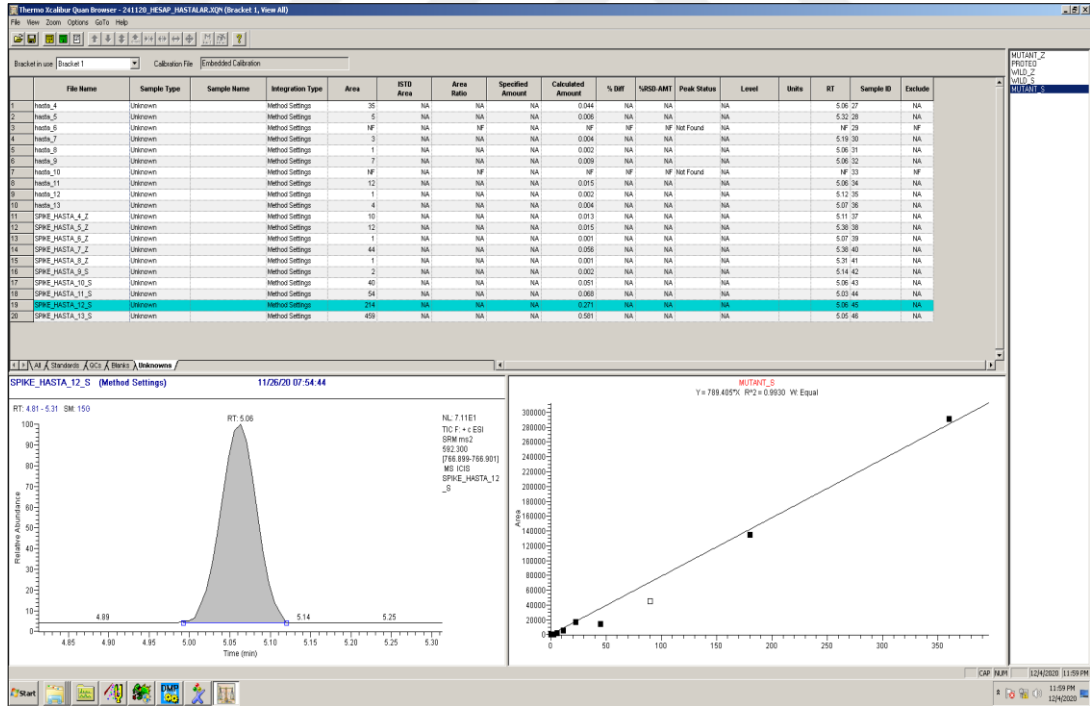
A1AT miktar tayini için, seçilen proteotipik peptit ve dahili standart peptitin pik alanı oranları, bilinen konsantrasyonlarda hazırlanan standart peptitlerden oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı (58-59-60).



Şekil 58. Proteotipik peptit için kalibrasyon eğrisi



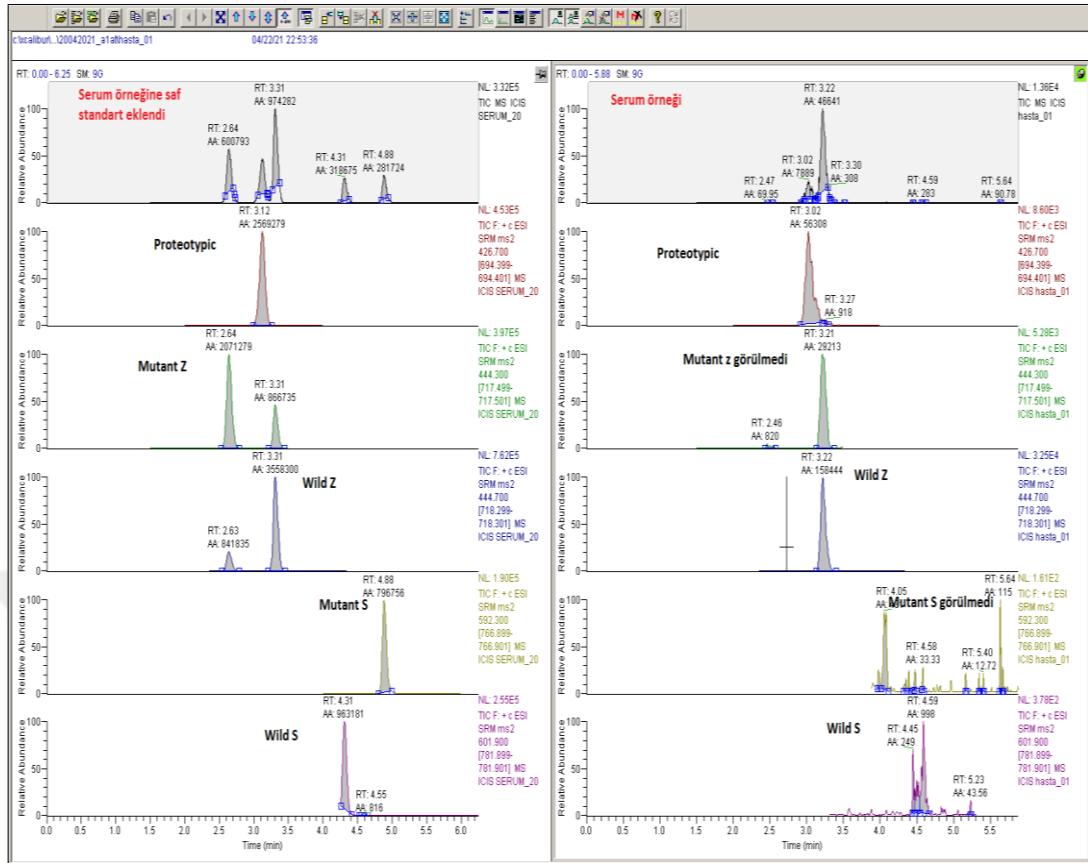
Şekil 59. Mutant Z peptit için kalibrasyon eğrisi



Şekil 60. Mutant S peptit için kalibrasyon eğrisi

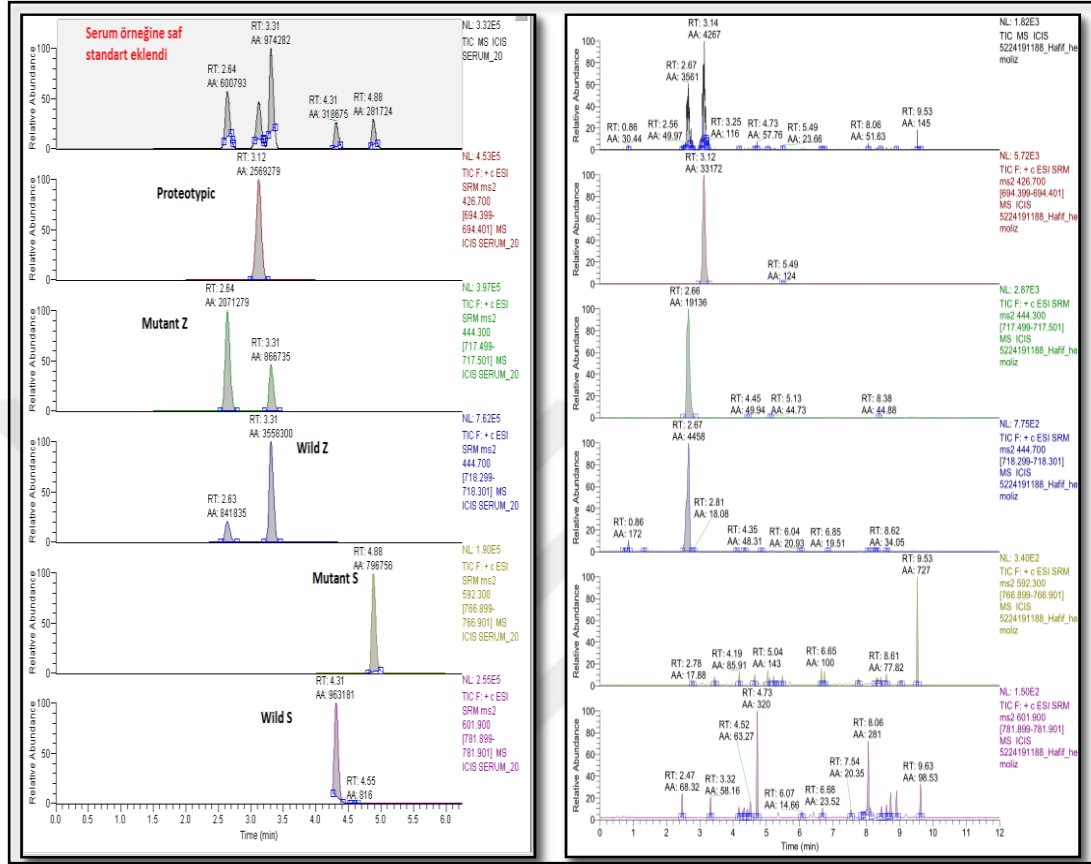
[illegible]

Normal paterne sahip (M/M homozigot) serum örneğine ait kromatogram görüntüsü, hazırlanan standart peptitlere ait kromatogram görüntüsü ile karşılaştırıldı (Şekil 62). Proteotipik ve alellik (S olmayan ve Z olmayan) peptitlere dayalı dolaşımdaki vahşi tip A1AT'nin niceliği M/M hastalarında doğrulanmıştır.



Şekil 62. M/M homozigota ait kromatogram görüntüsünün referans kromatogramı ile karşılaştırılması

Z/Z homozigotu Şekil 63'de gösterilmektedir ve Mu-Z'yi gösterir, ancak WT-Z veya Mu-S'yi göstermez. Spesifik eksiklik aleli kromatograflardan kolayca okunur.

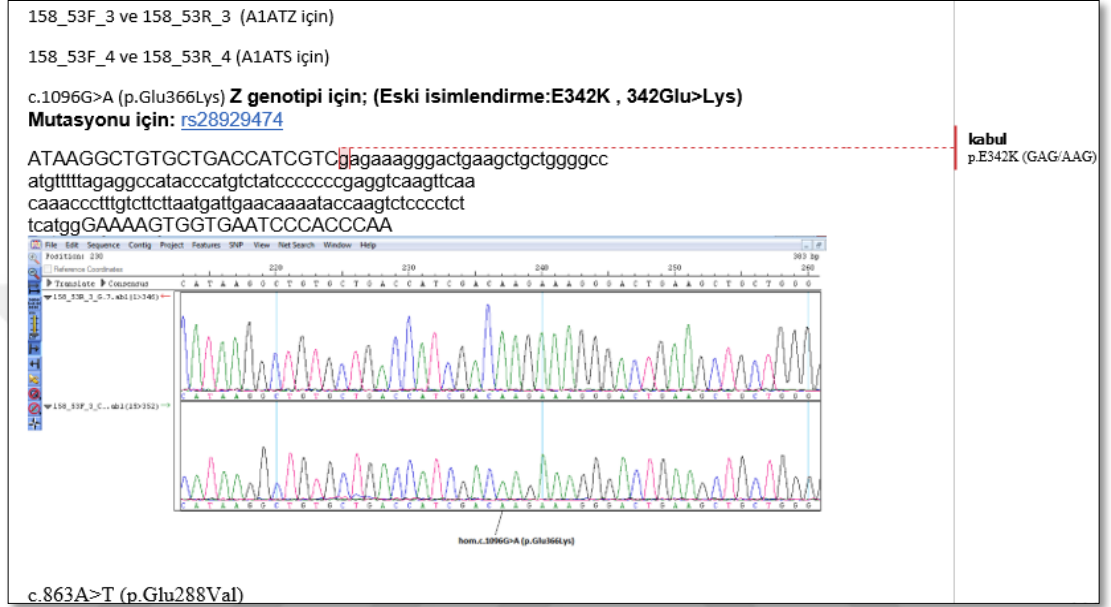


Şekil 63. Z/Z homozigota ait kromatogram görüntüsünün referans kromatogramı ile karşılaştırılması

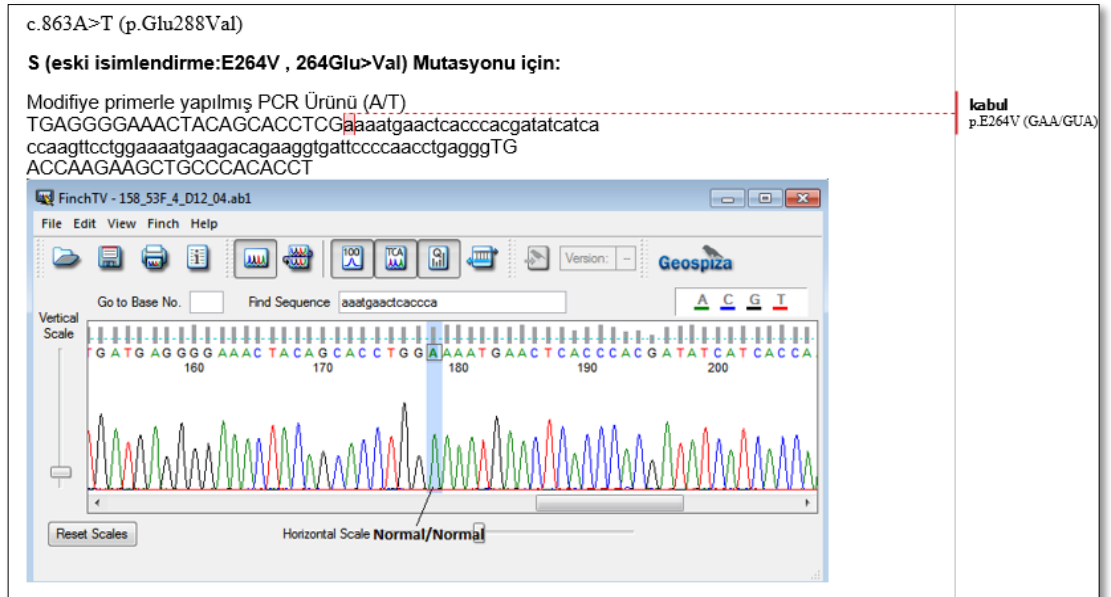
Hem S hem de Z eksiklik alelleri olsa da Z/Z fenotipine sahip hastalar S/S hastalarına kıyasla daha az toplam dolaşımdaki A1AT sergiler. Bu aynı zamanda Z mutasyonunun hepatositlerden protein salınımının azalmasına neden olduğu, S mutasyonunun ise çoğunlukla dolaşımda ancak M alelinden daha düşük konsantrasyonlarda salındığı hastalık patogenezinin kaynaklanmaktadır.

İki bölge için birer çift primer eşliğinde Sanger dizileme yapıldı. SERPINA1 geni için E264V (S genotipi) ve E342K (Z genotipi) alellerinin görüntülenmesi FinchTV kullanılarak yapıldı. Cihazdan alınan işlenmemiş veri referans dizi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen Z/Z homozigot olarak belirlenen örnek, SERPINA1 genindeki Z ve S mutasyonlarının yönünden dizi analizine tabii tutuldu. S genotipinde mutasyon varlığı tespit edilmezsen Z genotipinde homozigot Z aleli tespit edilmiştir (Şekil 64-65).



Şekil 64. Z mutasyonu için dizi analizi



Şekil 65. S mutasyonu için dizi analizi

5 TARTIŞMA

5.1 Klinik Testlerde İmmüfiksasyon Elektroforez Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Kapiller elektroforez (CE), FLC testleri ve jel bazlı yöntemler (SPEP, IFE) dahil olmak üzere klinik laboratuvarlarda M-proteinlerini saptamak için çeşitli metodolojiler oluşturulmuştur. Serum protein elektroforezi (SPEP), M-proteininin nispi tespit ölçümünü sağlarken, serum immüfiksasyon elektroforezi (IFE), M-protein izotiplerinin karakterizasyonunu sağlar. FLC testleri, dolaşımdaki serbest ve hafif zincirleri ölçmek için spesifik antikorlar kullanır (11,14). Ancak bu yöntemlerin belirli sınırlamaları vardır. SPEP, M-proteinlerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen laboratuvar testidir. Bu yöntemde proteinler bir jel veya kılcal tüpe yüklenir ve büyüklüklerine ve yüklerine göre bir elektrik akımı ile ayırt edilir. Beş bölgeye veya fraksiyona göç eden serum proteinleri, görüntüleme için boyanır (150). Bununla birlikte, birlikte göç veya boya doygunluğu sorunları ve karmaşık tanımlama ve doğru olmayan nicelme nedeniyle tüm M-proteinleri SPEP ile doğru bir şekilde ölçülemez. IgA ve IgM gibi M-proteinleri, küçük oldukları ve diğer serum protein pikleri ile göç ettikleri için tanısal zorluklara neden olur (137,138,151). Ayrıca, SPEP üzerindeki M-protein bandı, yalnızca bir M-proteinini gösterir, ancak izotipleri ayırmaz. M-proteinlerinin türlerini bulmak için immüfiksasyon gereklidir (150). Ayrıca SPEP analizinin saptama oranı, monoklonal gammopatiyi tanımlamada %79.0'lık bir duyarlılığa sahiptir (140). M protein analizinde kullanılan IFE tekniği yarı kantitatif bir yöntem olmasına rağmen plazma hücre bozukluklarını tanımlamak için kullanılan manuel laboratuvar testlerinden biri olmaya devam etmektedir. IFE'nin dezavantajları, optimum çözünürlüğü elde etmek için her hasta numunesi için antiserum miktarını ayarlama gerekliliğini içerir. Küçük bantlar klinik sonuçları yorumlamada zorluğa neden olur. Testin tekrarlanabilirlik için engelleri vardır ve ayrıca gerekli yüksek kaliteli antikorun maliyeti de pahalıdır (11,15). IFE'nin duyarlılığı 0.1 g/dl M-protein algılama sınırına sahiptir. Monoklonal gammopatiyi tanımlarken, serum IFE analizinin saptama oranı %87'lik bir duyarlılığa sahiptir. Ekstra reaktiflerin maliyeti, IFE'yi daha az ekonomik hale getirir (140,150). CE, bir UV dedektörü kullanılarak

görüntülenen proteinleri ayırmak için küçük delik (10-100 nm), silika kapiller tüpler ve mikroakışkanlara dayanan jel bazlı yöntemlere (SPEP, IFE) alternatif bir yöntemdir (141). Bununla birlikte, CE sınırlı analitik duyarlılığa, zayıf çözünürlüğe sahiptir ve tanımlamada zorluklarla karşılaşılır (142). CE tabanlı izotipleme, immünotipleme (IT) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir, ancak bu teknikler klinik olarak IFE'den daha az duyarlıdır (152).

Kütle spektrometreleri, son zamanlarda sağlam proteinlerin (IGF1, hemoglobin gibi) doğru moleküler kütlelerini ölçerek klinik teşhislerde rol oynamaya başlamıştır. Kütle spektrometresi tabanlı bir yöntemle, β -talaseminin teşhisi için hemoglobin (Hb) A2'nin miktarının belirlendiği çalışmada, bu yöntemin klinik laboratuvarlarda HbA2 gibi teşhis proteinlerinin kantitatif ölçümü için kabul edilebilir hassasiyete ulaştığı bulunmuştur (153). Bunun yanı sıra, yüksek performanslı TOF (qTOF) kütle spektrometresinde toplanan tarama spektrumlarının dar kütle ekstraksiyonunu kullanarak IGF-1 için biyoanalitik yöntem geliştirilen başka bir çalışmada, yöntemin klinik laboratuvarlarda immünoanaliz yerine geçmesi için yeterli hassasiyet, doğruluk ve hassasiyete sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (154). Bu nedenle MALDI-TOF-MS, yüksek çözünürlük ve kütle ölçüm doğruluğundan dolayı, geleneksel protein jel elektroforez tabanlı yöntemlere kıyasla proteinleri karakterize etmek için alternatif haline gelmiştir.

MALDI-TOF MS tabanlı çalışmalar, tek proteinlerin nicelemesinde uygun dinamik aralık ve doğrusallık gösterse de çoklu proteinlerin eşzamanlı nicelendirilmesindeki analitik performansı inceleme gerektirir (155). Bu nedenle, M-proteinlerinin teşhis etmek için mikropipet afinite kromatografi ile bileştirilmiş MALDI-TOF-MS tabanlı yöntemle immünglobulinleri ölçmenin avantajı gösterilmiştir. Mikropipet afinite kromatografi yöntemi ile hedeflenen Ig grupları izole edilerek MALDI analizi gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, teknik, mevcut yöntemlere kıyasla analiz başına önemli ölçüde azaltılmış bir maliyetle doğruluk, kesinlik, güvenilirlik ve satın alma süresi açısından daha iyi performans sundu. Bu nedenle, CaptureSelect TM afinite matrisi kullanılarak spesifik immünglobulinlerin saflaştırıldığı yöntemimiz, monoklonal gammopatiyi taramada bir araç olabilir.

MALDI-TOF MS yöntemi, SPEP tarafından pozitif olan her durumda bir M-proteini tanımladı. M-proteinlerinin yalnızca IFE ile saptanabildiği numunelerde MALDI-TOF MS yöntemi, serum M-proteinlerinin %100'ünü tanımladı. Son olarak, IgM HC'ler heterojen olarak glikozile edilir ve bu nedenle bu yöntemle zayıf bir şekilde çözülür. Bu nedenle, IgM M-proteinleri, IgM HC'ye özgü rezinler ile zenginleştirildikten sonra monoklonal LC m/z sinyalleriyle kolayca tanımlanabilirken, monoklonal IgM HC m/z sinyalinin saptanması daha fazla optimizasyon gerektirir. Serum ve idrar proteinlerinin elektroforetik olarak ayrılması, monoklonal gammopatilerin taranması, teşhisi ve izlenmesi için standart yaklaşım olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, çözünürlük ve analitik duyarlılıktaki sınırlamalar, tamamlayıcı testlerin kullanılmasını gerektirir. Bu, artan maliyete, artan test karmaşıklığına ve daha zayıf test kullanımına yol açabilir. Bu çalışma, MALDI-TOF MS ile M-protein tespiti ve izotiplemesi ile kalitatif bilgi sağlayan mevcut metodolojilerden daha bilgilendirici olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, bulgularımız MALDI-TOF MS yöntemi ile serumda M-proteinlerini saptama ve izotiplendirmedeki yüksek tanısal yeteneğe sahip olduğunu gösterdi. Ek olarak, geliştirdiğimiz kalitatif yöntemin serumdaki immünglobulin konsantrasyonlarını da hesaplayarak yapılacak ileri çalışmaların klinikte önemli bir yere sahip olacağına inanıyoruz.

5.2 Klinik Testlerde İmmünfiksasyon Elektroforez ve Serbest Hafif Zincir (FLC) Testlerine Alternatif, Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Lösemi ve multipl miyelom gibi hematolojik bozukluklarda kemoterapinin etkinliğinin değerlendirilmesi, sözde minimal rezidüel hastalık (MRD) tahmin edilerek gerçekleştirilir. Bu genellikle hastaların kanında dolaşan monoklonal bileşenlerin nefelometri ve immünfiksasyon kullanılarak değerlendirilmesine dayanır [129].

sFLC testleri 2000'lerin başında nefelometrik/türbidimetrik sFLC testi olarak tanıtıldı (156). Bu testler, tespit için kullanılan poliklonal ve monoklonal antikorların tipinde spesifik farklılıklar gösterir (157). Monoklonal saptama antikorlarının

kullanılması, test tekrarlanabilirliği açısından hasta izlemede iyi performans gösterme avantajına sahiptir Öte yandan, poliklonal reaktifleri kullanan tahliller, daha geniş bir epitop aralığını tanıma yeteneğine sahiptir (158,159). Bununla birlikte, şu anda mevcut olan testler (poliklonal veya monoklonal reaktifler kullanan), zayıf doğruluk ve doğrusal olmama gibi analitik sınırlamalara sahiptir (160). Bu nedenle, FLC ölçümü için hızlı ve güvenilir bir tanımlama yöntemi olarak FLC-immüno zenginleştirme ile MALDI-TOF MS yöntemini önermekteyiz. Kullanılan FLC testine ve platforma bağlı olarak, FLC ölçümlerinin bireysel bir hastanın tanı, prognostik veya yanıt kriterlerini karşılaması beklenir. FLC-immün zenginleştirme, FLC'lerin doğrudan tespiti yoluyla anormal sFLC oranlarının doğru ölçümünü önemli ölçüde artırır (14). FLC-immün zenginleştirme için, κ ve λ LC'lerin sabit alanını hedefleyerek saflaştırmalarına izin veren kappa (Hu) ve lambda (Hu) CaptureSelect afinite reçinelerini kullandık. Afinite reçineleri, immünoglobulin ağır zincirinin alt sınıfı veya izotipinden bağımsız olarak κ ve λ LC'nin sabit alanındaki korunmuş bir epitopa bağlanarak işlev görür. Bu nedenle, κ ve λ LC ve bunların Fab fragmanları dahil olmak üzere Ig'leri (IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM) izole etmek için afinite reçineleri geliştirilmiştir (3,161). Bu yöntem, poliklonal veya monoklonal reaktifler kullanan mevcut testlere göre gelişmiş hassasiyet ve güvenilirlik sağlar. Bu yaklaşım yakın zamanda test edilmiş ve avantajları gösterilmiştir (34,145,162,163).

Bu çalışmada, PCD hastalıklarının prognozunu değerlendirmek için, bir FLC parametresi (sadece κ/λ FLC) yerine farklı FLC parametreleri (κ , λ ve κ/λ) karşılaştırıldı. Nefelometrik FLC testine kıyasla bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksekti. MALDI-TOF MS tabanlı yöntem, nefelometri kullanılarak gerçekleştirilen serum FLC testine kıyasla PCD'nin farklılaşmasında yüksek duyarlılık (%92,5) ve özgüllük (%76,3) göstermiştir. MALDI-TOF MS tabanlı yöntemle 105 numuneden alınan serumdaki FLC düzeylerinin ölçümü, nefelometrik-sFLC testi ile iyi bir nicel uyum sağladı. Serum FLC oranlarıyla bu artan anlaşma, PCD'leri teşhis etme zorluğuyla karşı karşıya kalan klinisyenler için güven sağlayabilir. Ek olarak, MALDI-TOF MS tabanlı yöntem, elektroforetik yöntemle FLC bantlarının zayıf veya ölçülemez olduğu seviyeleri belirleyebilir.

Öte yandan, MALDI-TOF MS'nin basit bir protokol kullanarak FLC'yi doğru bir şekilde tanımlama yeteneğini gösterilmiştir. Bu basit ve doğrudan ölçüm protokolü, nefelometrik ve jel bazlı testlere kıyasla özellikle zaman tasarrufu sağlar. Bu yöntem, günde analiz edilen yüzden fazla numune ile yüksek verimli tanımlama sağlar. Aynı zamanda, az sayıda reaktif gerektiğinden bu yöntem uygun maliyetlidir. Yeniden kullanılabilir mikropipet afinite kromatografi ile eşleştirilmiş MALDI-TOF MS cihazı kullanan bu yöntemle FLC ölçümünün maliyeti kuyu başına 0,5 dolar olarak değerlendirildi. Bu nedenle bu metodoloji pahalı ekipman gerektirmez ve rutin analizler yapan klinik laboratuvarlarda uygulanabilir. MALDI-TOF MS, araştırma ve klinik laboratuvarlarda giderek daha fazla yer kazanmaktadır (164,165). MALDI-TOF MS teknolojisi yüksek hassasiyete, yüksek analitik güce ve yüksek çözünürlüğe sahiptir ve gelecekte M-protein tanımlamasında önemli yeri olacaktır (166–168). M-proteinlerinin saptanmasında MALDI-TOF MS tabanlı tekniklerin kullanımındaki artış, uluslararası miyelom çalışma grubunu (IMWG) MALDI TOF-MS'nin PCD'lerde kullanılmasına ilişkin öneriler sunmaya ve MALDI TOF-MS hakkında daha fazla araştırmayı teşvik etmeye sevk etmiştir (169). Son zamanlarda, serumdaki M-proteinlerini saptamak için MALDI-TOF MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, M-proteinlerinin izotiplenmesi ve saptanmasında immünfiksasyon ile yüksek bir pozitif korelasyon göstermiştir. M-proteinleri saptamak için MALDI-TOF MS'nin kullanılması, mevcut elektroforetik yöntemlere göre çeşitli avantajlar sağlar ve gelecekte IFE ve SPEP'in yerini alabilir (14,17,18,145,162). MALDI-TOF MS, terapötik antikolar gibi diğer M-proteinlerini de saptayarak hastaların tedavi ilerlemesinin doğru bir şekilde izlenmesine olanak tanır (170–172). Bu nedenle, klinik uygulamaya entegre edildiğinde, MALDI-TOF MS tekniğini içeren daha hassas serum bazlı tekniklerin kullanılması, FLC'nin doğru bir şekilde tanımlanması ve izlenmesinde özellikle önemli olabilir (14). MALDI-TOF MS tabanlı çalışmalar, tek proteinlerin nicelemesinde uygun dinamik aralık ve doğrusallık gösterse de çoklu proteinlerin eşzamanlı nicelendirilmesindeki analitik performansı, kritik bir inceleme gerektirir (155). Sonuç olarak, MALDI-TOF MS protein profili oluşturma, proteomik biyobelirteç araştırmalarında klinik doğrulama ve laboratuvar araştırması arasındaki boşluğu kapatma potansiyeline sahiptir (164,173). Yine de rutin analizde kullanılmadan önce MALDI-TOF MS protein profilinin ek optimizasyonu ve

değerlendirilmesi önerilir (174). Bununla birlikte, MALDI protein profillemesinin analitik performansı, kapsamlı ön işleme ile geliştirilebilir. Bunlar arasında otomatik numune işleme, kapsamlı ön fraksiyon stratejileri, bağışıklık yakalama, standartlaştırılmış matris (ko)kristalizasyon, tekrarlanan ölçümler, önceden yapılandırılmış hedef yüzeyler, gelişmiş MALDI-TOF MS cihaz bileşenleri, dahili kalibrantlar, kalite kontrol (QC) numuneleri ve normalleştirme ve pik tespiti için algoritmalar vardır (155,175). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan immün zenginleştirme yöntemi hedeflenen proteinin ayrımını gerçekleştirerek analitik performansı artırmıştır.

PeakFit yazılımı ile gerçekleştirilen pik ayırma algoritmaları ve bunların tekrarlanabilirliği, tekniğin plazma hücre bozukluklarının teşhisinde faydasını göstermiştir. Bu nedenle, bu metodoloji, farklı FLC parametrelerinin belirlenmesinin ve bunların birlikte kullanımının tanısal ve hatta prognostik öneme sahip olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle bu çalışma, PCD'leri izlemek için zaman kazandıran, uygun maliyetli ve daha hassas rutin kan testinin nasıl kullanılabileceğini anlamada önemli bir kilometre taşıdır. Ek olarak, FLC ölçümünün hastalığın seyrini ve prognozunu değerlendirmede ve bireysel hasta bazında optimal tedavi rejimini oluşturmada yararlı olup olmayacağını anlamak için hastaların boylamsal takibi gereklidir.

5.3 Alzheimer Hastalığının Teşhisinde, Mikropipet Afinite Kromatografi ile Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Bu çalışma, AD'yi teşhis etmek için MALDI-TOF MS tabanlı yöntemle hafif zincir immünglobulinlerini ölçmenin avantajını göstermiştir. Ek olarak, teknik, mevcut yöntemlere kıyasla önemli ölçüde azaltılmış analiz başına maliyetle doğruluk, kesinlik, güvenilirlik ve analiz süresi açısından daha iyi performans sundu. Bu nedenle, CaptureSelect afinite matrisi kullanılarak spesifik immünglobulinlerin saflaştırıldığı yöntemimiz, AD'de bir tarama aracı olabilir.

NINCDS-ADRDA kriterleri, Alzheimer hastaları ile AD olmayan kişileri ayırt etmek için $> \%80$ duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (148). Bu çalışmaya dahil edilen hastalar revize edilmiş NINCDS-ADRDA kriterlerine göre seçildi. AD'li hastalarda serum κ/λ LC oranının kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. AD'li hastalarda immünolojik yanıtta bu farklılıkların mekanizması ve nedenleri belirsizdir. İlk olarak, bazı çalışmalar hücre içindeki çevresel faktörlerin de moleküller arası disülfid bağlarının oluşumunu etkilediğini göstermiştir (176,177). AD'li hastaların beyinde Protein Disülfid İzomeras (disülfid bağlarının oluşumunu katalize eden-PDI) seviyesi yükselir. PDI, nörofibriler yumakları içeren hücrelerde nörofibriler yumaklarla lokalizedir (178,179). Bu çalışmanın sonucunda, λ hafif zincir seviyesi hastalarda ve sağlıklı bireylerde farklıdır. Bu sonuç, λ seviyesini değiştiren ve κ LC/ λ LC oranını etkileyen λ hafif zincirlerindeki disülfid bağları nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Öte yandan hafif zincirlerin H_2O_2 oluşumunu katalize ederek hücre içi oksidatif strese izin veren bir özelliğe sahip olduğu öne sürülmüştür (180,181).

Oksidatif stresin yaşlanma ve başta AD olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda önemli olduğu bilinmektedir. Yaşlanma sırasında mitokondride artan ROS oluşumu, etkili bir antioksidan sistemin olmaması nedeniyle AD geliştirme riski oluşturur (182). AD'nin kesin tanısını desteklemek için AD'de oksidatif stres belirteçleri analizini ve LC'nin yapısal analizini gerekmektedir. H_2O_2 'nin taşınması, membranların lipid çift tabakasından serbest difüzyon ve aquaporinler ile gerçekleşir. Bu durum, ROS'un konumundan bağımsız olarak hücrenin aktivasyonuna izin verir (183). Brenner ve diğerleri, amiloid kardiyomiyopatisi olan hastalardan izole edilen amiloid LC proteinlerinin kardiyomiyositlerin işlevini değiştirerek hücre içi ROS ve redoks durumunun yükselmesine yol açtığını göstermiştir. Buna karşılık, kontrollerden izole edilen LC proteinleri, proteinin redoks durumunu etkilemediği gösterilmiştir (184). Wang ve Sanders, immüoglobulin LC proteinlerinin H_2O_2 oluşumunu katalize edebildiğini belirtmişlerdir. İnsan Böbrek-2 (HK-2) hücrelerinin hafif zincirlerle inkübasyonu, makrofaj/monosit göçüne dahil olan monosit kemo-çekici protein-1'in (MCP-1) oluşumunu ve proksimal tübülün aktivasyonunu indükler. Ayrıca, HK-2 hücrelerinde laktat dehidrojenaz salınımını artırmak için H_2O_2 üretilir. Böylece hafif

zincirler, proksimal tübülün aktivasyonunu ve MCP-1'in gelişimini destekleyen hücre içi oksidatif stresin iyileşmesini destekler. Bu bulgular, immünoglobulin LC proteinlerinin H_2O_2 üretebileceğini göstermiştir (180). Ayrıca, hafif zincirlerin değişken alanında (VL) bulunan beta-tabakalarının hidrofobik çekirdeği, H_2O_2 üretiminin nerede başladığını ve protein alımından sonra hücresel işlevi gösterdiğini gösterir (181). Bir meta-analiz çalışmasında, AD tanısında flor-18 florodeoksiglukoz (FDG) kullanılarak yapılan PET değerlendirmesinde sensitivitenin %86 (%95 CI: 76-93) ve spesifitesinin %86 (%95 CI: 72-93) sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, çalışmalar arasındaki değişkenlik nedeniyle bu parametrelerin tanısal değerinin belirsiz olduğu belirtilmiştir (185). AD'de BOS biyobelirteçlerinin tanısal önemini değerlendiren başka bir çalışmada, BOS t-tau ve Ab-42 kombinasyonu, Hafif Bilişsel Bozukluk hastalarında yeni başlayan AD'yi tanımlamak için %95 duyarlılık ve %83 özgüllük sağlamıştır. Karşılaştırıldığında, t-tau ve Ab-42 / p-tau181 oranının kombinasyonu %95 sensitivite ve %87 spesifite sağlamıştır (186). Ayrıca, aynı test kiti kullanıldığında bile farklı laboratuvarlar arasında Ab-42 ve tau konsantrasyonlarında önemli farklılıklar olabilir (187).

Bu çalışmada ROC analizi ile, AD'li hastalar kontrollerle karşılaştırıldığında %100,0 (%95 CI: 84,6-100,0) sensitivite ve %71,43 (%95 CI: 47,8-88,7) spesifite ile ayırt edildiğini göstermiştir. $\kappa_{LC/\lambda LC}$ ölçümünün, AD teşhisi için diğer biyobelirteçlerle karşılaştırılabilir bir duyarlılığa sahip olduğuna gösterilmiştir. Bu nedenle çalışma $\kappa_{LC/\lambda LC}$ oranının AD tanısında potansiyel bir tarama testi olduğunu göstermektedir. Ayrıca MALDI TOF-MS yüksek analitik güce, yüksek çözünürlüğe ve hassasiyete sahip bir cihazdır ve sağlık alanındaki önemini gelecekte de koruyacaktır (166–168). LC reçineleri ön-analitiklerin bir parçası olarak kullanıma sunulduğunda, bu yöntemin, mevcut yöntemlerin maliyetini ve süresini önemli ölçüde azaltabilecek, AD teşhisi için klinik bir test olarak kullanılacağına ve bunun doğru, kesin sonuçlar elde etmede fayda sağlayacaktır. Ancak bu çalışmada nispeten küçük örneklem büyüklüğü en önemli limitasyondur. Az sayıda hasta ve kontrol grubu dahil edildiğinden gerçek hayattaki klinik durumu yansıtmak zordur. Bu ön veri sonuçlarının daha büyük örneklem büyüklüğü ile analizinden sonra, tanısal eşiklerin belirlenmesi için hesaplama yöntemleri geliştirilecektir. Sonuç olarak, bu çalışma

AD'li hastalarda κ LC/ λ LC oranı değişimini bildiren ilk çalışmadır. Bu nedenle, κ LC/ λ LC oranının belirlenmesinin hastalığın seyrini ve prognozunu tahmin etmeye ve geniş bir spektrumda AD'li hastaların takibiyle bireysel hasta düzeyinde optimal bir tedavi alanı oluşturmaya yardımcı olup olmayacağını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.4 Klinik Testlerde Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif Mikropipet Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Alfa-1-antitripsin (A1AT) eksikliği hastalığı, A1AT genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Akut faz proteini olan A1AT'nin dolaşımdaki konsantrasyonları, gerçek eksikliği olan kişilerde bile enfeksiyonlar sırasında artabileceğinden, genetik A1AT eksikliğinin teşhisi, tek başına nicelemeden daha fazlasını gerektirir (188,189). Aksine, ilgisiz bir karaciğer hastalığı veya protein kaybettiren enteropati gibi genetik bir mutasyonun yokluğunda konsantrasyonlar düşebilir (189). Bu nedenlerle, genetik A1AT eksikliği teşhisi koymak için, alellerinin tanımlanması ve miktar tayini önemlidir. Birçok laboratuvar A1AT eksikliği teşhisi için mevcut laboratuvar test algoritması, niceleme (nefelometri), genotipleme ve/veya fenotiplemenin bir kombinasyonunu kullanır. Teşhis, A1AT'nin nicelleştirilmesini ve ardından spesifik varyantın tanımlanmasını gerektirir (190). İyi kabul edilse de bu test metodolojileri ve algoritmaları sorunlu olabilir. Çoğu genotipleme tahlili, yalnızca S ve Z mutasyonlarını spesifik olarak saptamak üzere tasarlanmıştır. Diğer nadir eksiklik alelleri saptanmadığı için bu önemli bir sınırlamadır. Fenotipleme, amino asit ikamesi değiştirilmiş bir pI ile sonuçlandığı sürece, sadece Z ve S değil, birçok farklı alelin tanımlanabilmesi avantajına sahiptir. Bu varyantların doğru tanımlanması, nadir görülen eksik alelleri için ticari olarak mevcut olmayan ve bireysel klinik laboratuvar tarafından geliştirilip sürdürülmesi gereken iyi karakterize edilmiş referans standartları gerektirir. Ek olarak, fenotipleme, nispeten sübjektif yoruma sahip, yoğun bir tahlildir. Mevcut tanı algoritmaları, genotipleme ve fenotiplemeyi her iki yöntemin dezavantajlarını en aza indirecek şekilde birleştirir (189). Ancak bu da sorunludur. Çoğu algoritmanın önemli bir dezavantajı, iki ayrı kan örneğinin gerekliliğidir. İki numunenin gerekliliği, numunenin karışma olasılığını da önemli ölçüde artırır. Ek

olarak, genotipleme tahlili, 3-4 günlük nispeten uzun bir geri dönüş süresine sahiptir. Fenotipleme yoluyla doğrulama gerektiren numuneler için, sonucun klinisyene sunulmasından önce 48 ile 72 saat kadar ek bir gecikme süresi vardır (7).

Bu çalışmada, heterozigot hastalarda dolaşımdaki alellik ekspresyonun nicelleştirilmesi için, A1AT triptik peptitlerinin analizi için spesifik rezinlerin mikro tiplere enkapsüle edilerek izole edilen A1AT proteininin, peptitlerine ayrıştırılmasından sonra MRM sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile analizi ile ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin mutasyona uğramış (S ve Z) ve vahşi tip (S olmayan ve Z olmayan) proteinler arasında ayırım yapabildiği gösterilmiştir. A1AT eksikliğinin teşhisine yönelik mikropipet afinite kromatografi bazlı LC-MS/MS yöntemi, mevcut A1AT laboratuvar testlerine göre çeşitli avantajlar sunar. LC-MS/MS yöntemi, her iki yöntemin de dolaşımdaki A1AT proteininin analizine dayalı olarak eksik alellerini tanımlaması bakımından fenotipleme analizine benzer. Bununla birlikte, LC-MS/MS yöntemi, çok daha az yoğun olma avantajına sahiptir ve tek bir 12 dakikalık LC-MS/MS tahlilinde A1AT'yi hem nicelleştirme hem de fenotipleme yeteneğine sahiptir. Bu yöntem aynı zamanda elektroforez ile fenotiplemeyi çevreleyen sübjektif yorumu da ortadan kaldırır. Bu avantajlara rağmen, LC-MS/MS yöntemi, mevcut haliyle sadece yaygın S ve Z mutasyonlarını tespit eder. Tüm A1AT eksikliği olan bireylerin %95'i Z aleli için homozigottur ve bu metodoloji ile saptanabilir (190). Ancak nadir olmasına rağmen, klinik hastalık A1AT eksikliği ile sonuçlanan diğer mutasyonlar tanımlanmıştır (112). IEF ile fenotiplemenin tanımlayabildiği diğer nadir eksiklik alellere karşılık gelen hedef peptitlerin, LC-MS/MS yönteminin fenotiplemeyi tamamen değiştirecek olması durumunda eklenmesi gerekecektir.

Bu çalışmada her bir peptit için yalnızca tek bir geçiş izlenmiştir, gelecekteki çalışmalar, özgünlüğü sağlamak için her bir peptit için ek geçişler içermelidir. A1AT en bol bulunan 12 plazma proteininden biri olduğundan ve başka bir bol plazma proteininden yalnızca bir triptik peptitin müdahale etmesi muhtemeldir. Ancak, bu yöntemde kullanılan A1AT proteinine özgü rezinin enkapsüle edildiği mikropipet

afinite kromatografi yöntemi ile direkt A1AT proteininin izolasyonu sağlandığı için avantaja sahiptir.

Kütle spektrometrisi ile alel spesifik A1AT nicelemesiyle ilgili çalışmalar, LC-MS/MS yönteminin avantajını göstermiştir. A1AT triptik peptitlerin sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile serum örneklerini (244 M/M, 61 M/Z ve 63 M/S) analiz ettikleri bir çalışmada mutasyona uğramış (S ve Z) ve vahşi tip (S olmayan ve Z olmayan) proteinler arasında ayırım yapabildiğini göstermişlerdir. Çalışmada, M/Z hastaları için ortalama toplam A1AT konsantrasyonu daha düşük olmasına rağmen, M/Z hastalarında vahşi tip protein yüzdesi %82 iken, M/S heterozigotlar için %63 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle, M/Z hastalarına kıyasla M/Z'de toplam A1AT proteini daha az olsa da M/Z hastalarında dolaşımdaki A1AT'nin daha büyük bir yüzdesi vahşi tiptir. Çalışma sonuçları göstermiştir ki, M/Z popülasyonu içinde, dolaşımdaki vahşi tipten mutant protein oranlarına kadar geniş bir değişkenlik vardır. Ayrıca çalışmada, normal olarak kabul edilen toplam A1AT'ye (≥ 80 mg/dl) sahip bir M/Z hasta kohortunun yarısında, pulmoner disfonksiyon için klinik etkileri olabilecek yetersiz vahşi tip protein tespit edilmiştir. Bu nedenle fenotip grupları içindeki diferansiyel ekspresyon paternlerinin, hastalığın duyarlılığı veya ciddiyeti ile ilişkili olup olmadığını tespit etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (9). Bir başka çalışmada, A1AT'nin eşzamanlı nicelemesi ve A1AT eksikliği olan hastaların %95'inde bulunan en yaygın iki eksiklik alelinin tanımlanması için MRM LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. A1AT alel tespiti için, 40 numunenin 39'unda LC-MS/MS sonuçları, IEF jel elektroforez sonuçları ile aynı olarak tespit edilmiştir. Tutarlı olmayan örnek, IEF tarafından daha düşük bir seyreltmede yeniden çalıştırılarak sonuçların uyumlu olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, LC-MS/MS yöntemi ile etkin şekilde M/M, M/S, M/Z, S/S, Z/Z ve S/Z genotiplerinin tanımlandığı gösterilmiştir (7). Heterozigot hastalarda gözlenen geniş çaplı dolaşımdaki vahşi tip protein göz önüne alındığında, LC-MS/MS yöntemi alel konsantrasyonu ile klinik semptomların gelişimi ve/veya şiddeti arasındaki korelasyonları ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak, heterozigot hastalarda A1AT alellerinin tespitinin LC-MS/MS kullanılarak mümkün olduğu gösterilmiştir.

Mikropipet afinite kromatografi ile entegre kütle spektrometrisi yöntemiyle alel spesifik A1AT niceleme, A1AT biyolojisi çalışması için tamamen yeni bir alanın kapısını açar ve hastaları, alel tanımlaması ve tek başına toplam A1AT konsantrasyonundan daha fazla bilgiye dayalı olarak risk kategorilerine ayırmak için kullanılabilir. Fenotip grupları içindeki farklı ekspresyon paternlerinin, hastalığın duyarlılığı veya ciddiyeti ile ilişkili olup olmadığı araştırılmaktadır. Fenotip grupları içindeki diferansiyel ekspresyon paternlerinin, hastalığın duyarlılığı veya ciddiyeti ile ilişkili olup olmadığını tespit etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada yer alan LC-MS/MS yöntemi ile A1AT fenotiplemesi için umut verici bir yaklaşımı temsil etmektedir. Rutin uygulamada kütle spektrometrisi giderek yaygınlaştıkça, bu tekniği mevcudiyeti klinik laboratuvarlarda daha da yaygın hale gelebilir.

6 SONUÇ

Sonuç olarak, elde edilen bulgular doğrultusunda, selektif rezinlerin enkapsüle edildiği mikro-pipet afinite kromatografisi ile kombine edilmiş MS yöntemlerinin serumda immünglobulin ve A1AT proteinlerinin saptanmasında ve tiplendirilmesinde yüksek tanısal yeteneğe sahip olduğu gösterildi. Geliştirilen bu yöntemlerle beraber mevcut yöntemlerin maliyetini ve süresini ciddi oranda azaltan, doğru, hassas ve güvenilir metotlar geliştirilmiştir. Ek olarak, geliştirilen bu yöntemlerin ileride klinikte önemli bir yere sahip olacağına inanıyoruz.



7 KAYNAKLAR

1. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, vd. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 03 Ağustos 2018 [kaynak 23 Kasım 2022];15(8):683–96. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30058389/>
2. Yao X, McShane AJ, Castillo MJ. Quantitative Proteomics in Development of Disease Protein Biomarkers. *Proteomic Metabolomic Approaches to Biomark Discov*. 01 Ocak 2013;259–78.
3. Hermans P, Adams H, Detmers F. Purification of antibodies and antibody fragments using capture selectTM affinity resins. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2014 [kaynak 12 Kasım 2020];1131:297–314. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24515474/>
4. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* [Internet]. 01 Ekim 1999 [kaynak 22 Kasım 2022];17(10):1030–2. Available at: <http://europepmc.org/article/MED/10504710>
5. Murray JD, Willrich MA, Krowka MJ, Bobr A, Murray DL, Halling KC, vd. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry–Based α 1-Antitrypsin (AAT) TestingA Retrospective Evaluation of a Clinical Algorithm to Detect AAT Deficiency. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 15 Mart 2021 [kaynak 24 Kasım 2022];155(4):547–52. Available at: <https://academic.oup.com/ajcp/article/155/4/547/5933873>
6. Crystal RG. Alpha 1-antitrypsin deficiency : biology, pathogenesis, clinical manifestations, therapy [Internet]. Marcel Dekker; 1996 [kaynak 24 Kasım 2022]. 449 s. Available at: <https://www.routledge.com/Alpha-1---Antitrypsin-Deficiency-Biology-Pathogenesis-Clinical-Manifestations-Therapy/rystal/p/book/9780824788483>
7. Chen Y, Snyder MR, Zhu Y, Tostrud LJ, Benson LM, Katzmann JA, vd. Simultaneous Phenotyping and Quantitation of α -1-Antitrypsin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* [Internet]. Ağustos 2011 [kaynak 24 Kasım 2022];57(8):1161. Available at: </pmc/articles/PMC3275912/>
8. Bengtson P, Valtonen-André C, Jonsson M. Phenotyping of α -1-Antitrypsin by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Clin Mass Spectrom*. 01 Aralık 2016;2:34–40.
9. Donato LJ, Karras RM, Katzmann JA, Murray DL, Snyder MR. Quantitation of circulating wild-type alpha-1-antitrypsin in heterozygous carriers of the S and Z deficiency alleles. *Respir Res* [Internet]. 05 Ağustos 2015 [kaynak 24 Kasım 2022];16(1). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243289/>
10. Siegel D, Bilotti E, van Hoeven KH. Serum Free Light Chain Analysis for Diagnosis, Monitoring, and Prognosis of Monoclonal Gammopathies. *Lab Med*. 2009;40(6):363–6.
11. Davids MS, Murali MR, Kuter DJ. Serum free light chain analysis. *Am J Hematol*. 2010;85(10):787–90.
12. Kumar S, Larson DR, Dispenzieri A, Therneau TM, Murray DL, Leif Bergsagel P, vd.

Polyclonal serum free light chain elevation is associated with increased risk of monoclonal gammopathies. *Blood Cancer J* [Internet]. 2019;9(6). Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-019-0210-z>

13. Kyle RA, Dispenzieri A. Monoclonal gammopathies. İçinde: *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2013. s. 975–86.
14. Sepiashvili L, Kohlhagen MC, Snyder MR, Willrich MAV, Mills JR, Dispenzieri A, vd. Direct detection of monoclonal free light chains in serum by use of immunoenrichment-coupled MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*. 2019;65(8):1015–22.
15. Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H, Matsumori A, Maruyama T, Komoda T, vd. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(5):522–32.
16. Mills JR, Barnidge DR, Murray DL. Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry. *Methods*. 15 Haziran 2015;81:56–65.
17. Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S, Vanderboom PM, Kyle RA, Katzmman JA, vd. Comprehensive assessment of M-proteins using nanobody enrichment coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*. 2016;62(10):1334–44.
18. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, Kohlhagen MC, Mills JR, Merlini G, vd. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol* [Internet]. 01 Ağustos 2017 [kaynak 27 Haziran 2020];92(8):772–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.24772>
19. Kočová Vlčková H, Pilařová V, Svobodová P, Plíšek J, Švec F, Nováková L. Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis. *Analyst* [Internet]. 21 Mart 2018 [kaynak 20 Kasım 2022];143(6):1305–25. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29461553/>
20. Makalesi A, Çoşkun Ö, Öztöpuz Ö. Chromatographic Applications in Medicine. *Eur J Sci Technol* [Internet]. 2019 [kaynak 20 Kasım 2022];(17):522–9. Available at: <http://dergipark.gov.tr/ejosat>
21. Denoroy L, Zimmer L, Renaud B, Parrot S. Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 05 Mayıs 2013 [kaynak 20 Kasım 2022];927:37–53. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317776/>
22. Kortz L, Helmschrodt C, Ceglarek U. Fast liquid chromatography combined with mass spectrometry for the analysis of metabolites and proteins in human body fluids. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 21 Mart 2011 [kaynak 20 Kasım 2022];399(8):2635–44. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-4595-6>
23. Büssow K. Affinity Chromatography and In Vitro Binding (Beads). *Encycl Ref Genomics Proteomics Mol Med* [Internet]. 13 Eylül 2006 [kaynak 22 Kasım 2022];31–5. Available at: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/3-540-29623-9_3710
24. Neubauer G, Gottschalk A, Fabrizio P, Séraphin B, Lührmann R, Mann M. Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A [Internet]. 21 Ocak 1997 [kaynak 22 Kasım 2022];94(2):385–90. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9012791/>
25. Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, vd. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 1998 201 [Internet]. 1998 [kaynak 22 Kasım 2022];20(1):46–50. Available at: https://www.nature.com/articles/ng0998_46
26. Thangavel H. Proteomic Applications of Polymeric Nanoparticles with Engineered Affinity towards Select Target. *J Nanomedicine Res* [Internet]. 11 Mayıs 2017 [kaynak 22 Kasım 2022];Volume 5(Issue 4). Available at: <https://medcraveonline.com/JNMR/JNMR-05-00124.php>
27. Cuatrecasas P, Wilchek M. Single-step purification of avidine from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 24 Ekim 1968 [kaynak 22 Kasım 2022];33(2):235–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5722219/>
28. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1968 [kaynak 22 Kasım 2022];61(2):636–43. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4971842/>
29. Wilchek M. My life with affinity. *Protein Sci*. 29 Aralık 2008;13(11):3066–70.
30. P Cuatrecasas and, Anfinsen CB. Affinity Chromatography. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40070171001355> [Internet]. 28 Kasım 2003 [kaynak 22 Kasım 2022];40:259–78. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.40.070171.001355>
31. Hage DS, Anguizola JA, Bi C, Li R, Matsuda R, Papastavros E, vd. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal*. 01 Ekim 2012;69:93–105.
32. Roque ACA, Silva CSO, Taipa MÂ. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *J Chromatogr A*. 10 Ağustos 2007;1160(1–2):44–55.
33. Arora S, Ayyar BV, O’Kennedy R. Affinity chromatography for antibody purification. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2015 [kaynak 22 Kasım 2022];1129:497–516. Available at: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-977-2_35
34. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O’Kennedy R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*. 01 Şubat 2012;56(2):116–29.
35. Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods* [Internet]. 01 Mart 2017 [kaynak 22 Kasım 2022];116:84–94. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28012937/>
36. (7) (PDF) Special Topics in Bioprocess Engineering Volume I [Internet]. [kaynak 27 Kasım 2022]. Available at: https://www.researchgate.net/publication/234841302_Special_Topics_in_Bioprocess_Engineering_Volume_I
37. Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, vd. Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years. *J Chromatogr B*

- Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 11 Kasım 2020 [kaynak 22 Kasım 2022];1157:122332. Available at: [/pmc/articles/PMC7584770/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3403686/)
38. Grant NH, Robbins KC. Studies on porcine elastase and proelastase. Arch Biochem Biophys [Internet]. 1957 [kaynak 22 Kasım 2022];66(2):396–403. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13403686/>
39. Northrop JH, Kunitz M. CRYSTALLINE TRYPSIN: I. ISOLATION AND TESTS OF PURITY. J Gen Physiol [Internet]. 11 Kasım 1932 [kaynak 22 Kasım 2022];16(2):267. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141214/>
40. Martins ES, Denis AE, Ae S, Ae RSRL, Gomes E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation.
41. Hockenhull DJD, Herbert D. The amylase and maltase of *Clostridium acetobutylicum*. Biochem J [Internet]. 01 Ocak 1945 [kaynak 22 Kasım 2022];39(1):102–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16747844/>
42. Landsteiner K, Van Der Scheer J. ON CROSS REACTIONS OF IMMUNE SERA TO AZOPROTEINS. J Exp Med [Internet]. 02 Şubat 1936 [kaynak 22 Kasım 2022];63(3):325. Available at: [/pmc/articles/PMC2133341/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16747844/)
43. Campbell DH, Luescher E, Lerman LS. Immunologic Adsorbents: I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-Protein Antigen. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. Eylül 1951 [kaynak 22 Kasım 2022];37(9):575–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16589016/>
44. Manecke G, Gillert KE. Serologisch spezifische Adsorbentien. Naturwissenschaften 1955 428 [Internet]. Ocak 1955 [kaynak 22 Kasım 2022];42(8):212–3. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00599222>
45. Sutherland GB, Campbell DH. The Use of Antigen-Coated Glass as a Specific Adsorbent for Antibody. J Immunol [Internet]. 01 Nisan 1958 [kaynak 22 Kasım 2022];80(4):294–8. Available at: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/80/4/294/66931/The-Use-of-Antigen-Coated-Glass-as-a-Specific>
46. Hjertén S. The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. Biochim Biophys Acta - Spec Sect Biophys Subj. 30 Mart 1964;79(2):393–8.
47. Axén R, Porath J, Ernback S. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. Nat 1967 2145095 [Internet]. 1967 [kaynak 22 Kasım 2022];214(5095):1302–4. Available at: <https://www.nature.com/articles/2141302a0>
48. Luong JHT, Scouten WH. Affinity purification of natural ligands. Curr Protoc protein Sci [Internet]. 2008 [kaynak 22 Kasım 2022];Chapter 9(SUPPL. 52). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18491302/>
49. Başlıksız Belge [Internet]. [kaynak 27 Kasım 2022]. Available at: <https://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/affinity.htm>
50. Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S, Manfredi V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: Comparison with protein A and protein G. J

Immunol Methods [Internet]. 20 Aralık 2002 [kaynak 22 Kasım 2022];271(1–2):77–88. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12445731/>

51. Staak C, Salchow F, Clausen PH, Luge E. Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies. J Immunol Methods [Internet]. 14 Ağustos 1996 [kaynak 22 Kasım 2022];194(2):141–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8765167/>

52. Roberts MWH, Ongkudon CM, Forde GM, Danquah MK. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. J Sep Sci [Internet]. 2009 [kaynak 22 Kasım 2022];32(15–16):2485–94. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19603394/>

53. Schuster M, Wasserbauer E, Neubauer A, Jungbauer A. High speed immuno-affinity chromatography on supports with gigapores and porous glass. Biosep 2000 95 [Internet]. 2000 [kaynak 22 Kasım 2022];9(5):259–68. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011130821804>

54. Xi F, Wu J. Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent. J Chromatogr A. 19 Kasım 2004;1057(1–2):41–7.

55. (3) (PDF) Biophysics and Molecular Biology 4th edition [Internet]. [kaynak 27 Kasım 2022]. Available at: https://www.researchgate.net/publication/355381497_Biophysics_and_Molecular_Biology_4th_edition

56. Hjelm H, Hjelm K, Sjöquist J. Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. FEBS Lett [Internet]. 15 Kasım 1972 [kaynak 22 Kasım 2022];28(1):73–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4630462/>

57. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 15 Mart 2007 [kaynak 22 Kasım 2022];848(1):28–39. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17046339/>

58. Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. J Chromatogr B. 15 Mart 2007;848(1):40–7.

59. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose. Methods Mol Biol [Internet]. 2010 [kaynak 22 Kasım 2022];588:33–41. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20012816/>

60. Nilson BHK, Solomon A, Bjorck L, Akerstrom B. Protein L from Peptostreptococcus magnus binds to the kappa light chain variable domain. J Biol Chem. 05 Şubat 1992;267(4):2234–9.

61. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, vd. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nat 1993 3636428 [Internet]. 1993 [kaynak 22 Kasım 2022];363(6428):446–8. Available at: <https://www.nature.com/articles/363446a0>

62. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol [Internet]. 2001 [kaynak 22 Kasım 2022];74(4):277–302. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11526908/>

63. Van Der Linden RHJ, Frenken LGJ, De Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, vd.

- Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 12 Nisan 1999 [kaynak 22 Kasım 2022];1431(1):37–46. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10209277/>
64. Frenken LGJ, Van Der Linden RHJ, Hermans PWJJ, Bos JW, Ruuls RC, De Geus B, vd. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* [Internet]. 29 Şubat 2000 [kaynak 22 Kasım 2022];78(1):11–21. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10702907/>
65. Kuroiwa Y, Kasinathan P, Sathiyaseelan T, Jiao JA, Matsushita H, Sathiyaseelan J, vd. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. *Nat Biotechnol* 2009 272 [Internet]. 18 Ocak 2009 [kaynak 22 Kasım 2022];27(2):173–81. Available at: <https://www.nature.com/articles/nbt.1521>
66. Reinhart D, Weik R, Kunert R. Recombinant IgA production: Single step affinity purification using camelid ligands and product characterization. *J Immunol Methods*. 30 Nisan 2012;378(1–2):95–101.
67. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, vd. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* [Internet]. 2012 [kaynak 22 Kasım 2022];135(Pt 4):1081–101. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396395/>
68. Klooster R, Maassen BTH, Stam JC, Hermans PW, ten Haaf MR, Detmers FJM, vd. Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology. *J Immunol Methods* [Internet]. 31 Temmuz 2007 [kaynak 22 Kasım 2022];324(1–2):1–12. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17570391/>
69. Hermans P, Clasen R, Detmers F. Reinventing Affinity Tags. <https://home.liebertpub.com/gen> [Internet]. 28 Eylül 2012 [kaynak 22 Kasım 2022];32(17):48–9. Available at: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gen.32.17.20>
70. Beyer T, Lohse S, Berger S, Peipp M, Valerius T, Dechant M. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J Immunol Methods* [Internet]. 31 Temmuz 2009 [kaynak 22 Kasım 2022];346(1–2):26–37. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19427867/>
71. Document Connect [Internet]. [kaynak 27 Kasım 2022]. Available at: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0017191_CapSelectAntibodyAffinityResins_PI.pdf
72. Wenger MD. Micro-tip chromatography; a route to an integrated strategy for high throughput bioprocess development. 2010;
73. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2001 [kaynak 22 Kasım 2022];70:437–73. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11395414/>
74. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [Internet]. 13 Mart 2003 [kaynak 22 Kasım 2022];422(6928):198–207. Available at:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12634793/>

75. Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in Heart Failure: Top-down or Bottom-up? *Pflugers Arch* [Internet]. 2014 [kaynak 22 Kasım 2022];466(6):1199. Available at: </pmc/articles/PMC4037365/>
76. Siuti N, Kelleher NL. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat Methods* [Internet]. Ekim 2007 [kaynak 22 Kasım 2022];4(10):817–21. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17901871/>
77. Zhang H, Ge Y. Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2011 [kaynak 22 Kasım 2022];4(6):711. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187450/>
78. Ayaz-Guner S, Zhang J, Li L, Walker JW, Ge Y. In vivo phosphorylation site mapping in mouse cardiac troponin I by high resolution top-down electron capture dissociation mass spectrometry: Ser22/23 are the only sites basally phosphorylated. *Biochemistry* [Internet]. 01 Eylül 2009 [kaynak 22 Kasım 2022];48(34):8161–70. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19637843/>
79. Keilhauer EC, Hein MY, Mann M. Accurate Protein Complex Retrieval by Affinity Enrichment Mass Spectrometry (AE-MS) Rather than Affinity Purification Mass Spectrometry (AP-MS). *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 01 Ocak 2015 [kaynak 22 Kasım 2022];14(1):120. Available at: </pmc/articles/PMC4288248/>
80. Kim B, Araujo R, Howard M, Magni R, Liotta LA, Luchini A. Affinity Enrichment for MS: Improving the yield of low abundance biomarkers. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 03 Nisan 2018 [kaynak 22 Kasım 2022];15(4):353. Available at: </pmc/articles/PMC6081742/>
81. Morris JH, Knudsen GM, Verschueren E, Johnson JR, Cimerancic P, Greninger AL, vd. Affinity purification–mass spectrometry and network analysis to understand protein-protein interactions. *Nat Protoc* [Internet]. 27 Kasım 2014 [kaynak 22 Kasım 2022];9(11):2539. Available at: </pmc/articles/PMC4332878/>
82. Richards AL, Eckhardt M, Krogan NJ. Mass spectrometry-based protein–protein interaction networks for the study of human diseases. *Mol Syst Biol* [Internet]. Ocak 2021 [kaynak 22 Kasım 2022];17(1):8792. Available at: </pmc/articles/PMC7803364/>
83. Abu-Farha M, Elisma F, Figeys D. Identification of protein-protein interactions by mass spectrometry coupled techniques. *Adv Biochem Eng Biotechnol* [Internet]. 2008 [kaynak 22 Kasım 2022];110:67–80. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18227982/>
84. Lee WC, Lee KH. Applications of affinity chromatography in proteomics. *Anal Biochem* [Internet]. 01 Ocak 2004 [kaynak 22 Kasım 2022];324(1):1–10. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14654038/>
85. Affinity Purification Mass Spectrometry | Thermo Fisher Scientific - TR [Internet]. [kaynak 22 Kasım 2022]. Available at: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/industrial/mass-spectrometry/proteomics-protein-mass-spectrometry/proteomics-protein-mass-spectrometry-workflows/protein-structure-analysis-mass-spectrometry/affinity-mass-spectrometry.html>
86. Koh GCKW, Porras P, Aranda B, Hermjakob H, Orchard SE. Analyzing protein-protein

- interaction networks. *J Proteome Res* [Internet]. 02 Mart 2012 [kaynak 27 Kasım 2022];11(4):2014–31. Available at: <http://europepmc.org/article/MED/22385417>
87. Yost RA, Enke CG. Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 01 Ekim 1979 [kaynak 22 Kasım 2022];51(12):1251A-1264A. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac50048a792>
88. Araki Y, Yanagida M. Hypertensive disorders of pregnancy: Strategy to develop clinical peptide biomarkers for more accurate evaluation of the pathophysiological status of this syndrome. *Adv Clin Chem* [Internet]. 01 Ocak 2020 [kaynak 22 Kasım 2022];94:1–30. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242319300642>
89. Troxler H, Kleinert P, Schmugge M, Speer O. Advances in hemoglobinopathy detection and identification. *Adv Clin Chem*. 01 Ocak 2012;57:1–28.
90. Drabovich AP, Pavlou MP, Batruch I, Diamandis EP. Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery. *Proteomic Metabolomic Approaches to Biomark Discov*. 01 Ocak 2013;17–37.
91. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. Nisan 2006 [kaynak 22 Kasım 2022];5(4):573–88. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332733/>
92. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods* 2012 96 [Internet]. 30 Mayıs 2012 [kaynak 24 Kasım 2022];9(6):555–66. Available at: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2015>
93. Boja ES, Rodriguez H. Mass spectrometry-based targeted quantitative proteomics: achieving sensitive and reproducible detection of proteins. *Proteomics* [Internet]. Nisan 2012 [kaynak 24 Kasım 2022];12(8):1093–110. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22577011/>
94. Beretov J, Wasinger VC, Graham PH, Millar EK, Kearsley JH, Li Y. Proteomics for Breast Cancer Urine Biomarkers. *Adv Clin Chem*. 01 Ocak 2014;63:123–67.
95. Wiita AP, Seaman JE, Wells JA. Global Analysis of Cellular Proteolysis by Selective Enzymatic Labeling of Protein N-Termini. *Methods Enzymol*. 01 Ocak 2014;544:327–58.
96. Amoresano A, Carpentieri A, Giangrande C, Palmese A, Chiappetta G, Marino G, vd. Technical advances in proteomics mass spectrometry: identification of post-translational modifications. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 01 Haziran 2009 [kaynak 27 Kasım 2022];47(6):647–65. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426139/>
97. Alvarado R, Tran D, Ching B, Phinney BS. A Comparative Study of In-Gel Digestions Using Microwave and Pressure-Accelerated Technologies. *J Biomol Tech* [Internet]. Eylül 2010 [kaynak 24 Kasım 2022];21(3):148. Available at: <http://pmc/articles/PMC2922831/>
98. Dani FR, Pieraccini G. Proteomics of arthropod soluble olfactory proteins. *Methods Enzymol*. 01 Ocak 2020;642:81–102.
99. Petersen J, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. Functional proteomics of barley and barley chloroplasts - strategies, methods and perspectives. *Front Plant Sci* [Internet]. 18 Mart 2013 [kaynak 27 Kasım 2022];4(MAR). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23515231/>

100. Tsai PL, Chen SF, Huang SY. Mass spectrometry-based strategies for protein disulfide bond identification. *Rev Anal Chem* [Internet]. 01 Kasım 2013 [kaynak 24 Kasım 2022];32(4):257–68. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revac-2013-0011/html>
101. Automated Sample Preparation - 2015 - Wiley Analytical Science [Internet]. [kaynak 27 Kasım 2022]. Available at: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.12968>
102. Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B*. 01 Mayıs 2009;877(13):1229–39.
103. Fusaro VA, Mani DR, Mesirov JP, Carr SA. Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2009 272 [Internet]. 25 Ocak 2009 [kaynak 24 Kasım 2022];27(2):190–8. Available at: <https://www.nature.com/articles/nbt.1524>
104. Makawita S, Diamandis EP. The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin Chem* [Internet]. 01 Şubat 2010 [kaynak 24 Kasım 2022];56(2):212–22. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20007861/>
105. Tang HY, Beer LA, Barnhart KT, Speicher DW. Rapid verification of candidate serological biomarkers using gel-based, label-free multiple reaction monitoring. *J Proteome Res* [Internet]. 02 Eylül 2011 [kaynak 24 Kasım 2022];10(9):4005–17. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr2002098>
106. Rabin M, Watson M, Kidd V, Woo SLC, Breg WR, Ruddle FH. Regional location of α 1-antichymotrypsin and α 1-antitrypsin genes on human chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet*. Mart 1986;12(2):209–14.
107. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J*. 1987;6(9):2767–71.
108. de Serres FJ, Blanco I. Prevalence of α 1-antitrypsin deficiency alleles PI*S and PI*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI*MS, PI*MZ, PI*SS, PI*SZ, and PI*ZZ: a comprehensive review. *Ther Adv Respir Dis* [Internet]. 2012 [kaynak 24 Kasım 2022];6(5):277–95. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22933512/>
109. Von Ahsen N, Oellerich M, Schütz E. Use of Two Reporter Dyes without Interference in a Single-Tube Rapid-Cycle PCR: α 1-Antitrypsin Genotyping by Multiplex Real-Time Fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* [Internet]. 01 Şubat 2000 [kaynak 24 Kasım 2022];46(2):156–61. Available at: <https://academic.oup.com/clinchem/article/46/2/156/5640511>
110. Kaczor MP, Sanak M, Szczeklik A. Rapid and inexpensive detection of alpha1-antitrypsin deficiency-related alleles S and Z by a real-time polymerase chain reaction suitable for a large-scale population-based screening. *J Mol Diagn* [Internet]. 2007 [kaynak 24 Kasım 2022];9(1):99–104. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251342/>
111. Graham RP, Dina MA, Howe SC, Butz ML, Willkomm KS, Murray DL, vd. SERPINA1 Full-Gene Sequencing Identifies Rare Mutations Not Detected in Targeted Mutation Analysis. *J Mol Diagn* [Internet]. 01 Kasım 2015 [kaynak 24 Kasım 2022];17(6):689–94. Available at:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26321041/>

112. Fagerhol MK, Cox DW. The Pi Polymorphism. *Adv Hum Genet* 11 [Internet]. 1981 [kaynak 24 Kasım 2022];1–62. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8303-5_1
113. Long GL, Davie EW, Kurachi K, Chandra T, Woo SLC. Complete Sequence of the cDNA for Human $\alpha 1$ {-Antitrypsin and the Gene for the S Variant. *Biochemistry*. 1984;23(21):4828–37.
114. Jeppsson JO. Amino acid substitution Glu→Lys in $\alpha 1$ -antitrypsin PiZ. *FEBS Lett*. 01 Haziran 1976;65(2):195–7.
115. Owen MC, Carrell RW. Alpha-1-Antitrypsin: Molecular Abnormality Of S Variant. *Br Med J*. 1976;1(6002):130–1.
116. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, vd. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 01 Ağustos 1988 [kaynak 23 Kasım 2022];2(8):151–3. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rcm.1290020802>
117. Karas M, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem* [Internet]. 01 Ekim 1988 [kaynak 23 Kasım 2022];60(20):2299–301. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00171a028>
118. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal Chem* [Internet]. 01 Aralık 1985 [kaynak 23 Kasım 2022];57(14):2935–9. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00291a042>
119. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, vd. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. <https://doi.org/10.1080/1478945020181505510> [Internet]. 03 Ağustos 2018 [kaynak 22 Temmuz 2022];15(8):683–96. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14789450.2018.1505510>
120. Dreisewerd K. The Desorption Process in MALDI. 2003;
121. Jurinke C, Oeth P, Van Den Boom D. MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol Biotechnol* 2004 262 [Internet]. Şubat 2004 [kaynak 23 Kasım 2022];26(2):147–63. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:26:2:147>
122. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J food drug Anal* [Internet]. 01 Nisan 2019 [kaynak 28 Kasım 2022];27(2):404–14. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987712/>
123. Duncan MW, Nedelkov D, Walsh R, Hattan SJ. Applications of MALDI Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. *Clin Chem* [Internet]. 01 Ocak 2016 [kaynak 23 Kasım 2022];62(1):134–43. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26585930/>
124. Cho YT, Su H, Wu WJ, Wu DC, Hou MF, Kuo CH, vd. Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. *Adv Clin Chem* [Internet]. 2015 [kaynak 23 Kasım 2022];69:209–54. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25934363/>
125. Garaguso I, Borlak J. Matrix layer sample preparation: an improved MALDI-MS peptide analysis method for proteomic studies. *Proteomics* [Internet]. Temmuz 2008 [kaynak 23 Kasım

2022];8(13):2583–95. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18546159/>

126. Hocart CH. Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification. *Compr Nat Prod II Chem Biol*. 01 Ocak 2010;9:327–88.

127. Hoffmann Edmond de SV. Mass Spectrometry: principles and applications, 3rd Edition - Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. 2007 [kaynak 23 Kasım 2022];1–4. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Mass+Spectrometry%3A+Principles+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780470033104>

128. Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron. A new nonmagnetic time-of-flight high resolution mass-spectrometer. *Zhurnal Eksperimental'noj i Teor Fiz* [Internet]. 1973 [kaynak 23 Kasım 2022];64(1):82–9. Available at: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:4074573

129. Mamyrin BA. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 24 Şubat 1994;131(C):1–19.

130. Liu Z, Schey KL. Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. Nisan 2005 [kaynak 23 Kasım 2022];16(4):482–90. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15792717/>

131. Hajduk J, Matysiak J, Kokot ZJ. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. *Clin Chim Acta* [Internet]. 01 Temmuz 2016 [kaynak 24 Kasım 2022];458:84–98. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27134187/>

132. Li H, Popp R, Frohlich B, Chen MX, Borchers CH. Peptide and Protein Quantification Using Automated Immuno-MALDI (iMALDI). *J Vis Exp* [Internet]. 01 Ağustos 2017 [kaynak 24 Kasım 2022];2017(126):55933. Available at: <https://pmc/articles/PMC5614345/>

133. Goldman L, Schafer AI. Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition. C. 1–2, Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition. Elsevier Inc.; 2012. 1–2569 s.

134. Selvaratnam R, Cao J, Karger AB. Serum free light chain analysis. İçinde: *Plasma Cell Neoplasms: A Morphologic, Cytogenetic and Immunophenotypic Approach* [Internet]. Springer International Publishing; 2015 [kaynak 27 Haziran 2020]. s. 25–42. Available at: <https://experts.umn.edu/en/publications/serum-free-light-chain-analysis>

135. Structure of Immunoglobulins (Short Notes) | Easy Biology Class [Internet]. [kaynak 28 Kasım 2022]. Available at: <https://www.easybiologyclass.com/immunoglobulins-antibodies-structure-characteristics-and-functions/>

136. Leung N. Chapter 8: Clinical Tests for Monoclonal Proteins. 2016.

137. Bradwell A, Harding S, Fourrier N, Mathiot C, Attal M, Moreau P, vd. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'κ/ Ig'λ ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia* [Internet]. Ocak 2013 [kaynak 27 Haziran 2020];27(1):202–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22699454/>

138. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR, Hübl W, vd. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* [Internet]. 2013 [kaynak 27 Haziran 2020];27(1):213–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22955329/>

139. Paolini L, Di Noto G, Maffina F, Martellosio G, Radeghieri A, Luigi C, vd. Comparison of Hevylite™ IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 05 Mayıs 2015 [kaynak 01 Ağustos 2020];52(3):337–45. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468997/>
140. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, Larson DR, Snyder MR, Lust JA, vd. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem*. 2009;55(8):1517–22.
141. Felhofer JL, Blanes L, Garcia CD. Recent developments in instrumentation for capillary electrophoresis and microchip-capillary electrophoresis [Internet]. C. 31, Electrophoresis. Electrophoresis; 2010 [kaynak 27 Haziran 2020]. s. 2469–86. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20665910/>
142. Bossuyt X, Mariën G. False-negative results in detection of monoclonal proteins by capillary zone electrophoresis: A prospective study. *Clin Chem* [Internet]. 2001 [kaynak 27 Haziran 2020];47(8):1477–9. Available at: <https://academic.oup.com/clinchem/article/47/8/1477/5639346>
143. McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, Willis MS, vd. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* [Internet]. Mart 2008 [kaynak 27 Haziran 2020];129(3):451–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18285269/>
144. HS K, HS K, KS S, W S, HJ K, HS K, vd. Clinical comparisons of two free light chain assays to immunofixation electrophoresis for detecting monoclonal gammopathy. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [kaynak 01 Ağustos 2020];2014. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24971342/>
145. Mills JR, Barnidge DR, Murray DL. Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry. *Methods* [Internet]. 15 Haziran 2015 [kaynak 27 Haziran 2020];81:56–65. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104620231500167X>
146. EP12A2 | User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance [Internet]. [kaynak 28 Kasım 2022]. Available at: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep12/>
147. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. Mart 1977;33(1):159.
148. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, vd. The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement* [Internet]. 2011 [kaynak 01 Ağustos 2020];7(3):263–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514250/>
149. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* [Internet]. 1950 [kaynak 12 Kasım 2020];3(1):32–5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15405679/>
150. Leung N. Chapter 8: Clinical Tests for Monoclonal Proteins. *Onco-Nephrology Curric*. 2016;1–5.
151. Paolini L, Di Noto G, Maffina F, Martellosio G, Radeghieri A, Luigi C, vd. Comparison of Hevylite™ IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 05 Mayıs 2015 [kaynak 27 Haziran 2020];52(3):337–45.

Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468997/>

152. McCudden CR, Jacobs JFM, Keren D, Caillon H, Dejoie T, Andersen K. Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and immunofixation interferences [Internet]. C. 51, Clinical Biochemistry. Elsevier Inc.; 2018 [kaynak 08 Kasım 2020]. s. 72–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28843491/>
153. AE A-M, D CG, P A, L C, R H, M M, vd. Quantitative Mass Spectrometry Analysis of Intact Hemoglobin A2 by Precursor Ion Isolation and Detection. Anal Chem [Internet]. 2013 [kaynak 27 Haziran 2020];85(16). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23883289/>
154. Bystrom CE, Sheng S, Clarke NJ. Narrow Mass Extraction of Time-of-Flight Data for Quantitative Analysis of Proteins: Determination of Insulin-Like Growth Factor-1. Anal Chem [Internet]. 01 Aralık 2011 [kaynak 27 Haziran 2020];83(23):9005–10. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac201800g>
155. Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Chem [Internet]. Mayıs 2007 [kaynak 30 Temmuz 2022];53(5):852–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17395711/>
156. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, vd. Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine. Clin Chem [Internet]. 01 Nisan 2001 [kaynak 03 Ağustos 2022];47(4):673–80. Available at: <https://academic.oup.com/clinchem/article/47/4/673/5639131>
157. Fleming CKA, Swarttouw T, De Kat Angelino CM, Jacobs JFM, Russcher H. Method comparison of four clinically available assays for serum free light chain analysis. Clin Chem Lab Med [Internet]. 01 Ocak 2019 [kaynak 03 Ağustos 2022];58(1):85–94. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0533/html>
158. Graziani MS. Measurement of free light chains - Pros and cons of current methods. Clin Chem Lab Med [Internet]. 01 Haziran 2016 [kaynak 03 Ağustos 2022];54(6):1015–20. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-1062/html>
159. Te Velthuis H, Drayson M, Campbell JP. Measurement of free light chains with assays based on monoclonal antibodies. Clin Chem Lab Med [Internet]. 01 Haziran 2016 [kaynak 03 Ağustos 2022];54(6):1005–14. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-0963/html?lang=de>
160. Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? Clin Chem Lab Med [Internet]. 01 Haziran 2016 [kaynak 03 Ağustos 2022];54(6):1021–30. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-0879/html>
161. Ladwig PM, Barnidge DR, Willrich MAV. Quantification of the IgG2/4 kappa Monoclonal Therapeutic Eculizumab from Serum Using Isotype Specific Affinity Purification and Microflow LC-ESI-Q-TOF Mass Spectrometry. İçinde: Journal of the American Society for Mass Spectrometry [Internet]. Springer New York LLC; 2017 [kaynak 01 Ağustos 2020]. s. 811–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28004336/>
162. Kohlhagen MC, Barnidge DR, Mills JR, Stoner J, Gurtner KM, Liptac AM, vd. Screening

method for M-proteins in serum using nanobody enrichment coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*. 2016;62(10):1345–52.

163. Thoren KL, Eveillard M, Chan P, Doddi S, Cho S, Murata K. Identification of gamma heavy chain disease using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem*. 01 Mart 2020;77:57–61.

164. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, vd. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. <https://doi.org/10.1080/1478945020181505510> [Internet]. 03 Ağustos 2018 [kaynak 07 Ağustos 2022];15(8):683–96. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14789450.2018.1505510>

165. Li D, Yi J, Han G, Qiao L. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Meas Sci Au* [Internet]. 27 Temmuz 2022 [kaynak 03 Ağustos 2022]; Available at: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019>

166. Guo Z, Zhang Q, Zou H, Guo B, Ni J. A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74(7):1637–41.

167. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6(AUG):1–16.

168. Swiatly A, Horala A, Hajduk J, Matysiak J, Nowak-Markwitz E, Kokot ZJ. MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–9.

169. Murray DL, Puig N, Kristinsson S, Usmani SZ, Dispenzieri A, Bianchi G, vd. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. *Blood Cancer J* [Internet]. 01 Şubat 2021 [kaynak 03 Ağustos 2022];11(2). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33563895/>

170. Mills JR, Kohlhagen MC, Willrich MAV, Kourelis T, Dispenzieri A, Murray DL. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood* [Internet]. 09 Ağustos 2018 [kaynak 22 Temmuz 2022];132(6):670–2. Available at: <https://ashpublications.org/blood/article/132/6/670/39417/A-universal-solution-for-eliminating-false>

171. Moore LM, Cho S, Thoren KL. MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clin Chim Acta* [Internet]. 01 Mayıs 2019 [kaynak 22 Temmuz 2022];492:91. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3124149/>

172. Eveillard M, Hultcrantz M, Lesokhin AM, Mailankody S, Smith EL, Hassoun H, vd. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Serum for the Follow-up of Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients Treated with Daratumumab-Based Combination Therapy. *Blood*. 13 Kasım 2019;134(Supplement_1):4377.

173. Palmblad M, Tiss A, Cramer R. Mass spectrometry in clinical proteomics – from the present to the future. *PROTEOMICS – Clin Appl* [Internet]. 01 Ocak 2009 [kaynak 07 Ağustos 2022];3(1):6–17. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prca.200800090>

174. Hortin GL. Can Mass Spectrometric Protein Profiling Meet Desired Standards of Clinical Laboratory Practice? *Clin Chem* [Internet]. 01 Ocak 2005 [kaynak 07 Ağustos 2022];51(1):3–5.

Available at: <https://academic.oup.com/clinchem/article/51/1/3/5629534>

175. Coombes KR, Fritsche HA, Clarke C, Chen JN, Baggerly KA, Morris JS, vd. Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization. *Clin Chem* [Internet]. 01 Ekim 2003 [kaynak 07 Ağustos 2022];49(10):1615–23. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500586/>
176. Kaplan B, Livneh A, Sela B-A. Immunoglobulin Free Light Chain Dimers in Human Diseases. 2011 [kaynak 08 Kasım 2020];11:726–35. Available at: www.thescientificworld.com
177. Bechtel TJ, Weerapana E. From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease [Internet]. C. 17, *Proteomics*. Wiley-VCH Verlag; 2017 [kaynak 08 Kasım 2020]. Available at: [/pmc/articles/PMC5367942/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31367942/)
178. Mossuto MF. Disulfide bonding in neurodegenerative misfolding diseases [Internet]. C. 2013, *International Journal of Cell Biology*. Hindawi Limited; 2013 [kaynak 08 Kasım 2020]. Available at: [/pmc/articles/PMC3747422/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/247422/)
179. Perri ER, Thomas CJ, Parakh S, Spencer DM, Atkin JD. The unfolded protein response and the role of protein disulfide isomerase in neurodegeneration [Internet]. C. 3, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2016 [kaynak 08 Kasım 2020]. s. 80. Available at: www.frontiersin.org
180. Wang PX, Sanders PW. Immunoglobulin light chains generate hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. Nisan 2007 [kaynak 01 Ağustos 2020];18(4):1239–45. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360948/>
181. Migrino RQ, Hari P, Gutterman DD, Bright M, Truran S, Schlundt B, vd. Systemic and microvascular oxidative stress induced by light chain amyloidosis. *Int J Cardiol* [Internet]. 05 Kasım 2010 [kaynak 01 Ağustos 2020];145(1):67–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19446898/>
182. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review) [Internet]. C. 4, *Biomedical Reports*. Spandidos Publications; 2016 [kaynak 01 Ağustos 2020]. s. 519–22. Available at: [/pmc/articles/PMC4840676/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24840676/)
183. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. C. 1758, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier; 2006. s. 994–1003.
184. Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M, vd. Human Amyloidogenic Light Chains Directly Impair Cardiomyocyte Function Through an Increase in Cellular Oxidant Stress. *Circ Res* [Internet]. 30 Nisan 2004 [kaynak 01 Ağustos 2020];94(8):1008–10. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044325/>
185. Patwardhan MB, McCrory DC, Matchar DB, Samsa GP, Rutschmann OT. Alzheimer Disease: Operating Characteristics of PET - A Meta-Analysis [Internet]. C. 231, *Radiology*. Radiology; 2004 [kaynak 01 Ağustos 2020]. s. 73–80. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15068942/>
186. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: A follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5(3):228–34.

187. Sjögren M, Vanderstichele H, Ågren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wilkkelso C, vd. Tau and A β 42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: Establishment of reference values. Clin Chem. 2001;47(10):1776–81.
188. Bornhorst JA, Procter M, Meadows C, Ashwood ER, Mao R. Evaluation of an integrative diagnostic algorithm for the identification of people at risk for alpha1-antitrypsin deficiency. Am J Clin Pathol [Internet]. Eylül 2007 [kaynak 25 Kasım 2022];128(3):482–90. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17709323/>
189. Snyder MR, Katzmman JA, Butz ML, Yang P, Dawson DB, Halling KC, vd. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: An algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. Clin Chem [Internet]. 2006 [kaynak 25 Kasım 2022];52(12):2236–42. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17053153/>
190. Brantly M. Efficient and accurate approaches to the laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: The promise of early diagnosis and intervention. Clin Chem [Internet]. Aralık 2006 [kaynak 25 Kasım 2022];52(12):2180–1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17138849/>

8 EKLER

EK 1 ETİK KURUL ONAYI



SAYI: ATADEK-2021/02

28.01.2021

KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Mustafa Serteser, Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal, Zehal Zuhur Kaya,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“Klinik Testlerde İmmünifikasyon Elektroforez Analizine Alternatif, Otomatize Mikrokapiler Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi”** başlıklı proje 28.01.2021 tarih 2021/02 Sayılı ATADEK Toplantısında görüşülmüş olup 2021-02/18 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus

ATADEK Başkanı

EK 2 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bilimsel Çalışma:

Klinik testlerde immünfiksasyon elektroforez analizine alternatif otomatize mikropipet afinite kromatografi analiz yöntemi geliştirilmesi

HASTA AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Değerli katılımcı,

Sizi Acıbadem Labmed Araştırma ve Geliştirme Merkezi tarafından yürütülen, İmmünoglobulin proteinlerinin analizi ile ilgili araştırma-geliştirme projemize davet ediyoruz. Bu çalışmaya katılma kararı vermeden önce, sizi yapılacak araştırmanın amacı ve size uygulanacak işlem hakkında bilgilendirmek istiyoruz. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, İmmünoglobulin analizleri için mevcut yöntemden çok daha fazla analitik güce sahip, daha hızlı ve az maliyetli bir yöntem geliştirmektir. Elde edilecek sonuçlar doğrultusunda mevcut yöntem ile yapılan analiz bizim geliştireceğimiz metot ile karşılaştırılacaktır. Planladığımız çalışmamızda, yurtdışına bağımlılığımızı azaltmayı ve ülkemize ekonomik ve ulusal katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

Çalışmada hastanede İmmünoglobulin analizi yaptırması doktor tarafından gerekli görülmüş ve çalışmaya katılmaya gönüllü hastalardan tek sefere mahsus olmak üzere 1 tüp (toplam 5 mL) kan alınacaktır. Kan alımı sırasında sadece batma kadar hafif bir his duyulacaktır. Çalışma esnasında hastanenizdeki sağlık görevlisi yanınızda bulunacak ve çalışmalara nezaret edecektir. Bu işlem size herhangi bir risk ve külfet getirmeyecektir. Sizden İmmünoglobulin analizi için alınacak kan, bizim planladığımız çalışma için yeterli olduğundan daha fazla miktar kan alınmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz.

Araştırmaya gönüllü olarak katılmamanız sizin mevcut durumdaki tedavinizi veya almakta olduğunuz hizmeti ve hekiminizle olan ilişkinizi kesinlikle etkilemeyecektir.

Çalışmada sizden kimlik bilgileriniz istenmeyecektir ve mahremiyetiniz korunacaktır. Elde edilen analiz sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Bu bilgiler sadece siz, hekiminiz ve araştırmacılar arasında kalacaktır. Araştırma sonucu elde edilen veriler yalnızca adı geçen bu çalışma için kullanılacaktır.

Araştırmaya katıldığınız takdirde çalışmada yapılacak harcamalar ile ilgili sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir veya size herhangi bir maddi yük yüklenmeyecektir.

Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz hastanede bulunan hekiminize danışabilirsiniz.

Desteginiz için sizlere çok teşekkür ederiz.

EK 3 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin,

Adı-Soyadı, İmzası, Görevi

EK 4 ETİK KURUL ONAYI



SAYI: ATADEK-2021/11

24.06.2021

KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal, Prof. Dr. Fehime Benli Aksungar, Zelal Zuhul Kaya,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“Klinik Testlerde, Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif, Mikrokapiler Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi”** başlıklı proje 24.06.2021 tarih 2021/11 Sayılı ATADEK Toplantısında görüşülmüş olup 2021-11/03 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus

ATADEK Başkanı

EK 5 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bilimsel Çalışma:

Klinik Testlerde Mevcut Alfa-1 Antitripsin Analizine Alternatif Mikrokapiler Afinite Kromatografi ve Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

HASTA AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Değerli katılımcı,

Sizi Acıbadem Labmed Araştırma ve Geliştirme Merkezi tarafından yürütülen, Alfa-1 Antitripsin proteininin analizi ile ilgili araştırma-geliştirme projemize davet ediyoruz. Bu çalışmaya katılma kararı vermeden önce, sizi yapılacak araştırmanın amacı ve size uygulanacak işlem hakkında bilgilendirmek istiyoruz. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, Alfa-1 Antitripsin proteininin analizleri için mevcut yöntemden çok daha fazla analitik güce sahip, daha hızlı ve az maliyetli bir yöntem geliştirmektir. Elde edilecek sonuçlar doğrultusunda mevcut yöntem ile yapılan analiz bizim geliştireceğimiz metot ile karşılaştırılacaktır. Planladığımız çalışmamız, yurtdışına bağımlılığımızı azaltmayı ve ülkemize ekonomik ve ulusal gelişime katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

Projemiz için, hastanede Alfa-1 Antitripsin analizi yaptırması doktor tarafından gerekli görülmüş ve çalışmaya katılmaya gönüllü hastalardan tek sefere mahsus olmak üzere 1 tüp (toplam 5 mL) kan alınacaktır. Kan alımı sırasında sadece iğne batması kadar hafif bir his duyulacaktır. Çalışma esnasında hastanenizdeki sağlık görevlisi yanınızda bulunacak ve çalışmalara nezaret edecektir. Bu işlem size herhangi bir risk ve külfet getirmeyecektir. Sizden Alfa-1 Antitripsin analizi için alınacak kan, bizim planladığımız çalışma için yeterli olduğundan daha fazla miktar kan alınmayacaktır. Bu çalışmaya katılmanız tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz.

Araştırmaya gönüllü olarak katılmamanız sizin mevcut durumdaki tedavinizi veya almakta olduğunuz hizmeti ve hekiminizle olan ilişkinizi kesinlikle etkilemeyecektir.

Çalışmada sizden kimlik bilgileriniz istenmeyecektir ve mahremiyetiniz korunacaktır. Elde edilen analiz sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Bu bilgiler sadece siz, hekiminiz ve araştırmacılar arasında kalacaktır. Araştırma sonucu elde edilen veriler yalnızca adı geçen bu çalışma için kullanılacaktır. Araştırmaya katıldığınız takdirde çalışmada yapılacak harcamalar ile ilgili sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir veya size herhangi bir maddi yük yüklenmeyecektir.

Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan başka konular varsa, ya da daha fazla bilgi almak isterseniz, hastanede bulunan hekiminize danışabilirsiniz.

Desteğiniz için sizlere çok teşekkür ederiz.

EK 6 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin,

Adı-Soyadı, İmzası, Görevi

9 ÖZGEÇMİŞ

Г

