

**AGO2 PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE MİKRO RNA
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

SERCAN GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Haziran2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1505F180 no. lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sercan Güzel’ in “**AGO2 Proteininin Saflaştırılması ve Mikro RNA Etkileşimlerinin İncelenmesi**” başlıklı tezi 26/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER	

Prof.Dr. Ersin YÜCEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

AGO2 PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE MİKRO RNA ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Sercan GÜZEL

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Haziran, 2018

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Bu çalışmada; RNA interferansı efektör proteini olarak bilinen Argonat 2 (AGO2) proteininin immunoafinite saflaştırılması ve AGO2 proteini içeren nanoprotein partiküller hazırlanarak, hazırlanan bu nanoprotein partiküllerin mikro RNA (miRNA) bağlanma etkinliklerinin kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için ilk aşamada, fotosensitif rutenyum tabanlı amino asit monomeri, bis(2-2'-bipiridil)(MATrp)₂-rutenyum (II) kullanılarak ANADOLUCA metoduna göre poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeli sentezlenmiş ve SEM, FT-IR ve su tutma kapasitesi testi ile karakterize edilmiştir.

Daha sonra; sentezlenen bu kriyojel kolon ile AGO2 proteini, sığır karaciğeri sitoplazma ekstraktından tek adımda immunoafinite yoluyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örneğin moleküler ağırlığı ve saflığının belirlenmesi için SDS-PAGE metodu; örnek içerisindeki AGO2 proteininin varlığını net olarak belirlemek için ise EMSA metodu kullanılmıştır.

En son aşamada; AGO2 bazlı nano blok polimerler fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyonu metodu kullanılarak hazırlanmış ve hazırlanan bu partiküller SEM ve zeta ile karakterize edilip ticari miR-335' e bağlanma afiniteleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, miR-335' in AGO2 partiküllerine yüksek bir afinite ile bağlandığı belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Argonat 2, RNA interferansı, Kriyojel, Nano blok polimer, ANADOLUCA

ABSTRACT

PURIFICATION OF AGO2 PROTEİN and INVESTIGATION OF MICRORNA INTERACTIONS

Sercan GÜZEL

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, June, 2018

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

In this study, immunoaffinity purification of Argonaute 2 (AGO2) protein, known as RNA interference effector protein, preparation of nanoprotein particles having AGO2 protein and determination of micro RNA (miRNA) binding activities of these prepared nanoprotein particles have been aimed. In the first step, poly(HEMA-co-anti-AGO2) cryogel has been synthesized using photosensitive ruthenium- based amino acid monomer, bis(2-2'-bipyridyl)(MATrp)₂-ruthenium (II) according to ANADOLUCA method and characterized by FT-IR, SEM and water retention capacity test.

Then, AGO2 protein has been purified via immunoaffinity chromatography from bovine liver cytoplasmic extract in a single step using this prepared cryogel. SDS-PAGE method has been used to determine the molecular weight and purity of this purified sample. The EMSA method has been used to exact determination of the presence of AGO2 protein in the purified sample.

At the last stage, AGO2-based nano block polymers have been prepared using photosensitive microemulsion polymerization method. This prepared particles have been characterized by SEM and Zeta-Sizer and the binding affinities to commercial miR-335 have been determined. As a result, it has been determined that miR-335 has bound to AGO2 particles with a high affinity.

Keywords: Argonaute 2, RNA interference, Cryogel, Nano block polymer, ANADOLUCA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve desteği ile varlığını her zaman hissettiren, deneyimlerini paylaşmaktan hiçbir zaman imtina etmeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ' e

Tez çalışmam süresince desteğini ve ilgisini eksik etmeyen ve de deneyimleri ve fikirleri ile her zaman ufkumu açan Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY' a

Tez çalışmam süresince her yardım talebime nezaket ile yaklaşan ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Deniz HÜR' e

Tez çalışmam ile ilgili bazı deneysel süreçlerde deneyimleri ile bana destek olan Sayın Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER'e

Tez çalışmam süresince ilgisi ve desteğini esirgemeyen ve de deneyimlerinden hem teorik hem de pratik anlamda istifade ettiğim laboratuvar arkadaşım Sayın Arş. Gör. Umut ÇELİKOĞLU' na

Tez çalışmam ile ilgili bazı süreçlerde fikirlerinden istifade ettiğim laboratuvar arkadaşım Sayın Halil İbrahim AKBAŞ' a

Hem maddi hem de manevi anlamda beni her zaman destekleyen ve motive eden başta, tez çalışmam süreci içerisinde aramızdan vakitsiz bir şekilde ayrılan, işine ve insana saygısını her daim örnek aldığım Babam olmak üzere, Anneme ve de kardeşlerim Sertan ve Serhat' a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sercan GÜZEL

Haziran2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sercan Güzel

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. RNA İnterferansı	2
1.1.1. RNA interferansı prosesi	3
1.2. Argonat 2 Yapısı ve Fonksiyonları	3
1.2.1. RNA susturma yolaqları ve argonat proteinleri	5
1.2.2. miRNA' lar ile siRNA' lar	8
1.3. Biyomateryaller	9
1.3.1. Biyomateryal türleri	10
1.3.1.1. Metaller	10
1.3.1.2. Biyopolimerler	10
1.3.1.3. Biyoseramikler	11
1.3.1.4. Kompozitler	11
1.3.1.5. Doğal biyomateryaller	11
1.4. Polimer Biyokojugasyon	12

	<u>Sayfa</u>
1.4.1. Moleküllerin kendiliğinden oluşumu	13
1.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller	14
1.5.1. Polimer nanopartiküller	15
1.5.2. Polimer nanopartikül hazırlama teknikleri	16
1.5.2.1. Emulsiyon polimerizasyonu	17
1.5.2.2. Sürfaktansız emulsiyon polimerizasyonu	17
1.5.2.3. Emulsiyon polimerizasyon mekanizması	17
1.6. Proteinlerde Etkileşimler	18
1.6.1. Hidrofobik etkileşimler	19
1.6.2. Van Der Waals etkileşimleri ve London dispersiyon kuvvetleri...	20
1.6.3. Hidrojen bağları	20
1.6.4. Ligand bağlama spesifikliğı	21
1.7. Afinite Kromatografisi	23
1.7.1. İmmunoafinite kromatografisi	24
1.7.1.1. Antikor yapısı	24
1.8. Polimerik Kriyojeller	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM	27
2.1. Materyal	27
2.2. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) Kriyojeli Sentezi	28
2.3. Kriyojel Karakterizasyonu	29
2.3.1. Su tutma kapasitesi testi	29
2.3.2. SEM ile yüzey morfolojisinin incelenmesi	29
2.3.3. FT-IR analizi	29
2.4. AGO2 Saflaştırılması	29
2.4.1. Karaciğer dokusundan sitoplazmik ekstraktın hazırlanması.....	30

2.4.2. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) afinite kromatografisi	30
2.4.3. Total protein tayini	30
2.4.4. SDS-PAGE	30
2.4.5. Elektroforetik hareketlilik değişimi analizi	31
2.5. AGO2 Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonları	31
2.5.1. Nano-AGO2 partiküllerin hazırlanması	31
2.5.2. Nano-AGO2 zeta boyut ve zeta potansiyeli analizi	32
2.5.3. Nano-AGO2 elektron mikroskobu analizi	32
2.5.4. Nano-AGO2 partiküllerin total protein miktarı tayini	32
2.5.5. Nano-AGO2 partiküllerin miRNA bağlama analizi	32
3. BULGULAR	34
3.1. Kriyojel Karakterizasyonu	34
3.1.1. Su tutma kapasitesi testi	34
3.1.2. SEM ile yüzey morfolojisinin incelenmesi	34
3.1.3. FT-IR analizi	35
3.2. AGO2 Saflaştırılması	36
3.2.1. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) afinite kromatografisi	36
3.2.2. Total protein tayini	37
3.2.3. SDS-PAGE	37
3.2.4. Elektroforetik hareketlilik değişimi analizi	38
3.3. AGO2 Partiküllerin Karakterizasyonları	39
3.3.1. Nano-AGO2 partiküllerin zeta boyut ve zeta potansiyeli analizi..	39
3.3.2. Nano-AGO2 partiküllerin elektron mikroskobu analizi	40
3.3.3. Nano-AGO2 partiküllerin total protein miktarı tayini	41
3.3.4. Nano-AGO2 partiküllerin miRNA bağlama analizi	41

	<u>Sayfa</u>
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKÇA	46
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. miRNA ile siRNA arasındaki farklar	8
Tablo 1.2. Kimyasal bağ türleri ve bağ enerjileri	23
Tablo 3.1. miR-335 derişimleri ve band alanları	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. İnsan AGO2 proteininin yapısı	4
Şekil 1.2. Küçük RNA moleküllerinin çeşitli kaynakları	6
Şekil 1.3. Argonat- küçük RNA komplekslerinin toplanması	7
Şekil 1.4. Biyokonjugasyon kavramının şematik gösterimi	12
Şekil 1.5. Au nanopartiküllerin renklerinin boyut ve şekillerine bağımlılığı	15
Şekil 1.6. Yağ(b) ve su(c) nanokapsüller ve polimer nanokürelerin (a) gösterimi	16
Şekil 1.7. Polimer nanopartikül hazırlama yöntemleri	16
Şekil 1.8. Hidrofobik etkileşimler	19
Şekil 1.9. Hidrojen bağları	21
Şekil 1.10. Protein-ligand etkileşimi	22
Şekil 1.11. Afinite kromatografisinin temel bir şeması	24
Şekil 1.12. Bir immunoglobulin monomerinin temel yapısı	25
Şekil 1.13. Kriyojel oluşumunun şematik gösterimi	26
Şekil 2.1. bis(2-2'-bipiridil)(MATrp) ₂ -Rutenyum(II) molekülünün kimyasal yapısı ...	28
Şekil 3.1. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeline ait SEM görüntüsü	34
Şekil 3.2. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeline ait FT-IR spektrumu	35
Şekil 3.3. Poli(HEMA) kriyojeline ait FT-IR spektrumu	35
Şekil 3.3. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeline ait kromatogram	36
Şekil 3.4. Bovine serum albumin standart grafiği	37
Şekil 3.5. SDS-PAGE analizi ile örneklerin görüntülenmesi	38
Şekil 3.6. EMSA ile örneklerin görüntülenmesi	38
Şekil 3.7. Nano-AGO2 partiküllerin boyut dağılımları	39
Şekil 3.8. Nano-AGO2 partiküllerin zeta potansiyeli dağılımları	40

Sayfa

Şekil 3.9. Nano-AGO2 partiküllerin SEM görüntüleri	40
Şekil 3.10. Sığır serum albumini standart grafiği.....	41
Şekil 3.11. Nano-AGO2 ile miR-335 bağlama analizi	42
Şekil 3.12. Nano-AGO2 ile miR-335 arasındaki bağlanma izotermi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGO2	: Argonaute 2
Au	: Altın
CO ₂	: Karbon dioksit
ELİSA	: Enzyme Linked İmmuno-Sorbent Assay
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
FPLC	: Fast Protein Liquid Chromatography
FT-IR	: Forier Transform İnfrared Spektroskopisi
KBr	: Potasyum Bromür
kCal	: Kilokalori
mA	: Miliamper
MATrp	: N-metakriloil-L-triptofan
miRNA	: Mikro RNA
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
nt	: Nükleotid
RISC	: RNA İnduced Silencing Complex
RNAi	: RNA İnterferansı
SEM	: Scanning Electron Microscope
siRNA	: Susturucu RNA
TB	: Tris Borat

1. GİRİŞ

Biyokonjugasyon, ilaç ve biyoteknolojik uygulamalar için kullanılacak enzimlerin ve proteinlerin fonksiyonlarının modifiye edilmesinde önemli bir araçtır. Proteinlerin biyolojik sistemler içerisinde sahip oldukları doğal özgüllük, onları terapötik ajanlar, moleküler sensörler ve moleküler anahtarlar olarak ideal moleküller yapmaktadır (Bailon & Berthold, 1998; Duncan, 2003; Hoffman & Stayton, 2004). Doğal olarak oluşan ve rekombinant proteinler tıp, biyoteknoloji, nanoteknoloji alanlarında uygulama alanlarına sahiptirler. Bu proteinlerin sentetik polimerlere kovalent bağlanması ise çözünürlük, biyouyumluluk ve stabilite gibi özellikleri artırmaktadır. Ayrıca; bir proteine bir polimer zinciri eklemek o proteinin aktivitesini modüle etmek için kullanılmaktadır. Bir proteinin sentetik bir polimer ile kimyasal olarak konjuge edilmesi mümkündür ve termal stabilitenin artırılması ve protein aktivitesinin kontrol altında tutulabilmesi gibi birtakım avantajlar içermektedir. Ancak, kimyasal konjugasyonda sentez her zaman çok kolay olmamaktadır ve sentez olsa bile protein aktivitesinde azalma meydana gelebilmektedir.

Mikroemülsiyonlar ilk defa 1943 yılında yayınlanan bir çalışma ile tanımlanmıştır (HOAR & SCHULMAN, 1943). Mikroemülsiyonların ve polimer zincirlerinin avantajlarını birleştirir nitelikteki ilk çalışmalar 1977 yılının başlarında yayınlanmıştır (Riess, Nervo, & Rogez, 1977). Mikroemülsiyonlar bir surfaktan veya yüzey aktif ajanların karışımı ile stabilize edilen iki karışmayan sıvının en az üçlü karışımlarından oluşan kompleks heterojen bir prostestir. Bu teknikte, partikül stabilitesi, dispersiyon ortamının pH'sı, surfaktan tipi ve miktarından etkilenmektedir. Işığa duyarlı çapraz bağlama mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği her ne kadar kompleks ve heterojen bir teknik olsa da, ANADOLUCA (amino asit dekore edilmiş ve ışık destekli konjugasyon yaklaşımı) metoduna göre sentezlenmiş olan partiküller ile daha kolay hale gelmektedir ("ANADOLUCA Patent.pdf," n.d.). Bu metod, proteinimsi nanopartiküllerin fotosensitif çapraz bağlanma ile oda koşullarında, gün ışığında ve azot atmosferi altında kolay bir şekilde sentezlenmesine olanak tanımaktadır. ANADOLUCA metodu, fotosensitif amino asit bazlı monomerler ve oligomerler, rutenyum şelat bazlı monomerler vasıtası ile mikro ve nanoyapılar üzerinde fotosensitizasyon ve konjugasyon yaklaşımını kullanarak aminoasit monomer-protein çapraz bağlanması için strateji sunmaktadır (Say et al., 2011).

Ribonükleik asit (RNA) interferansı, çift sarmallı RNA' nın homolog sekanslı RNA' nın kaybını başlattığı bir mekanizmadır. RNA interferansında RNA indüklenmiş susturucu kompleks (RISC) adı verilen bir kompleks molekül, özellikle de bu kompleks molekülün merkezinde yer alan Argonat 2 (AGO2) proteini, sahip olduğu endonükleaz aktif bölge ile RNA bağlayıcı bölgesine bağlanan genelde 21-23 nt uzunluğundaki RNA' ları kısmen ya da tamamen komplementer mesajcı RNA (mRNA) sekanslarına yönlendirmesi ardından enzimatik anlamda ilgili mRNA sekansının yarılmasını sağlayarak ilgili genin susturulması veya baskılanmasını sağlaması bakımından ayrıca bir önem arz etmektedir.

miRNA' lar genom tarafından kodlanan düzenleyici elementlerdir. Bir tane miRNA, çeşitli fonksiyonları olan birçok genin ekspresyonunu baskılayabilme yeteneğine sahiptir. Ekstraselüler miRNA' lar oldukça kararlı moleküllerdir ve vücut sıvılarında bol miktar bulunurlar. Mevzu bahis bu miRNA' lar ekstraselüler sıvılar içerisinde ya özellikle AGO2 olmak üzere Argonat (AGO) proteinlerine bağlı bir şekilde ya da ekstraselüler vesiküller içerisinde enkapsüle olmuş bir şekilde bulunurlar.

Bu çalışmamızda; AGO2 proteini kompleksleri, ANADOLUCA konseptine göre hazırlanmış monoklonal anti-AGO2 çapraz bağlı kriyojel ile sığır karaciğeri ekstraktından izole edilmiştir. Ardından; izole edilen bu protein kompleksleri yine ANADOLUCA yaklaşımına göre nano forma dönüştürülerek, sentezlenen bu nano ölçekteki kopolimer partiküllerin ticari miR-335 molekülüne bağlanma afiniteleri agaroz jel elektroforezi ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

1.1. RNA İnterferansı

RNA interferansı olgusu ilk defa diziye özgü gen susturması ile sonuçlanan çift sarmallı RNA' ya (dsRNA) cevap olarak *Caenorhabditis elegans* yuvarlak solucanında keşfedilmiştir (Fire et al., 1998). RNAi olarak bilinen prosesin keşfi son yıllarda biyomedikal araştırma alanındaki en önemli gelişmelerden biridir. RNAi, hücrelerin kısa, çift sarmallı RNA' ları, tam bir özgüllük ile mRNA' ları tanımak için kullandığı ve bu mRNA' ların enzimatik olarak yıkılması suretiyle proteinlere çevrilmesini engelleyen doğal bir prosestir. Genler dış kaynaklı olarak da manipüle edilebilirler. Bu amaç ile dsRNA, hücre içerisine farklı biçimlerde eklenebilir. Laboratuvarlarda RNAi yolu ile gen susturma işlemi, yaygın olarak sentetik küçük susturucu RNA' ların

(siRNA) hücreye eklenmesi ve konakçı hücrelerin siRNA üretmek üzere kullanacağı kısa saç tokası RNA (shRNA) olarak bilinen deoksiribonükleik asit (DNA) şablonlarının kullanılması ile gerçekleştirilmektedir.

1.1.1. RNA interferansı prosesi

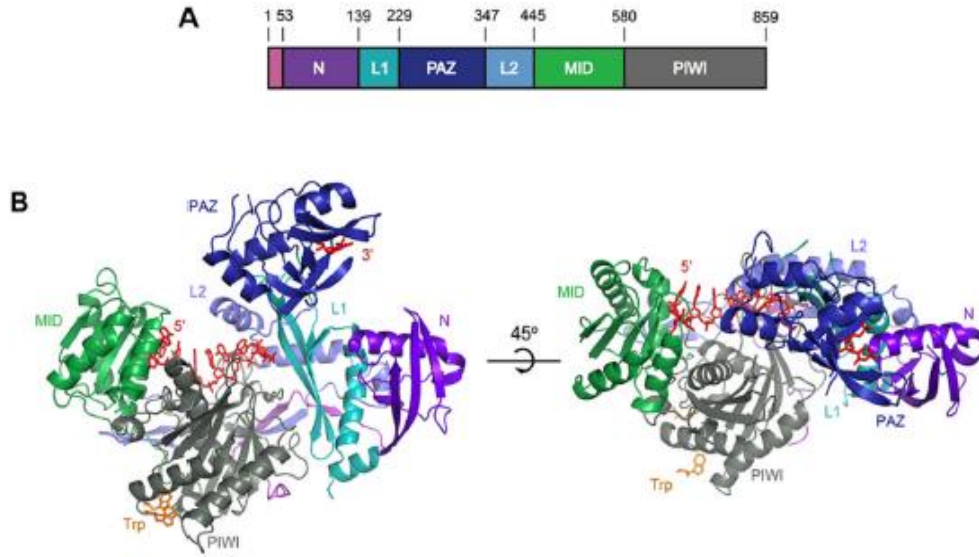
RNAi teknolojisi memeli hücrelerinde kullanılabilmektedir. Çünkü; memeli hücreleri miRNA yolağı olarak bilinen bir endojen transkripsiyon sonrası gen susturması prosesine aracılık eden yüksek ölçüde düzenlenmiş bir mekanizma ifade etmektedirler. miRNA' lar memeli hücrelerinde kodlayıcı olmayan genlerin transkripsiyonu ile üretilirler. Burada ilgili transkript hücre çekirdeğinde birtakım enzimatik proseslere uğradıktan sonra eksportin 5 proteini tarafından sitoplazmaya taşınmakta, sitoplazmada belirli işlemlerden geçerek olgun miRNA' ya dönüşmektedir. miRNA' ların hedef mRNA' ları tanınması ile RISC bir araya gelmekte ve genelde traslasyonel baskılamaya yol açmaktadır. miRNA ve RNAi yolları benzer prosesleri takip eder ancak arada birtakım farklılıklar da mevcuttur. Örneğin; miRNA' lar siRNA' lardan yapısal olarak farklıdır ve hedef mRNA' nın okunmayan bölgeleri ile eşleşmektedir. Bu eşleşme kısmi komplementer bir eşleşmedir ve bu durum hedef mRNA' nın kesilmesine aracılık etmemektedir. Öte yandan eksojen siRNA' lar ise hedef mRNA' daki kodlayıcı bölge ile eşleşmektedir. Bu eşleşme tamamen komplementer bir eşleşmedir, sonuç olarak da hedef mRNA endonükleolitik kesime uğramaktadır.

1.2. Argonat 2 Yapısı ve Fonksiyonları

AGO proteinleri dört tane bölgeden oluşurlar: PAZ, PIWI, N- terminal ve orta bölge. PAZ bölgesi biyokimyasal metodlar (Song et al., 2003) ve PAZ nükleik asit kompleksinin yapısından (Lingel, Simon, Izaurralde, & Sattler, 2004) görüleceği üzere RNA bağlayıcı bölgedir. Bağlanma sekanstan bağımsızdır ve PAZ bölgesi siRNA' nın tek sarmallı 3' ucunu tanır.

Şekil 1.1' deki insan AGO2 proteinin yapısı incelendiğinde prokaryotlardaki AGO proteinlerinin yapısını andıran iki loblu bir yapı görülmektedir. AGO2 proteinin çekirdek bölgeleri bakteri AGO proteinlerine kıyasla uzun düğümler ve ek sekonder yapıları sahiptir. Bunlar muhtemelen kılavuz RNA' ya bağlanma, hedef RNA' nın

tanınması ve de AGO2 ile ilişkili protein faktörlerinin toplanmasında rol oynamaktadır (MacRae, 2013).



Şekil 1.1. İnsan AGO2 proteininin yapısı (MacRae, 2013)

Küçük kodlanmayan RNA'ların aracılığında meydana gelen gen susturması olayına neden olan proteinlerin yeni ailesi olan AGO proteini isimlerini yunan mitolojisinde yer alan büyük bir savaşçı olan Argonaute'dan almıştır.

AGO proteinleri RNAi ve miRNA yolları olarak adlandırılan gen düzenleyici mekanizmalarda temel bir role sahiptirler.

AGO proteinleri *Arabidopsis thaliana* AGO1' e benzeyen Argonat benzeri proteinler, *D.melanogaster* PIWI (P-element induced wimpy testis) ile yakından ilişkili olan Piwi benzeri proteinler ve son zamanlarda tanımlanmış *Caernohabditis elegans*-spesifik grup 3 AGO proteinleri olmak üzere üç paralog grup içerisinde sınıflandırılmaktadır. AGO benzeri ve PIWI benzeri proteinler bakteri, arkea ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Bu da bu grup proteinlerin eski bir kökene sahip olduğunu göstermektedir (Cerutti & Casas-mollano, 2008). Ancak; farklı türlerde mevcut olan AGO genlerinin sayısı türden türe değişiklik göstermektedir. Örneğin insanda 4 tanesi PIWI benzeri ve 4 tanesi AGO benzeri olmak üzere toplamda 8 tane AGO geni mevcut iken *D. Melanogaster* genomunda 2 AGO benzeri 3' de PIWI benzeri olmak üzere 5 tane AGO geni mevcut bulunmaktadır.

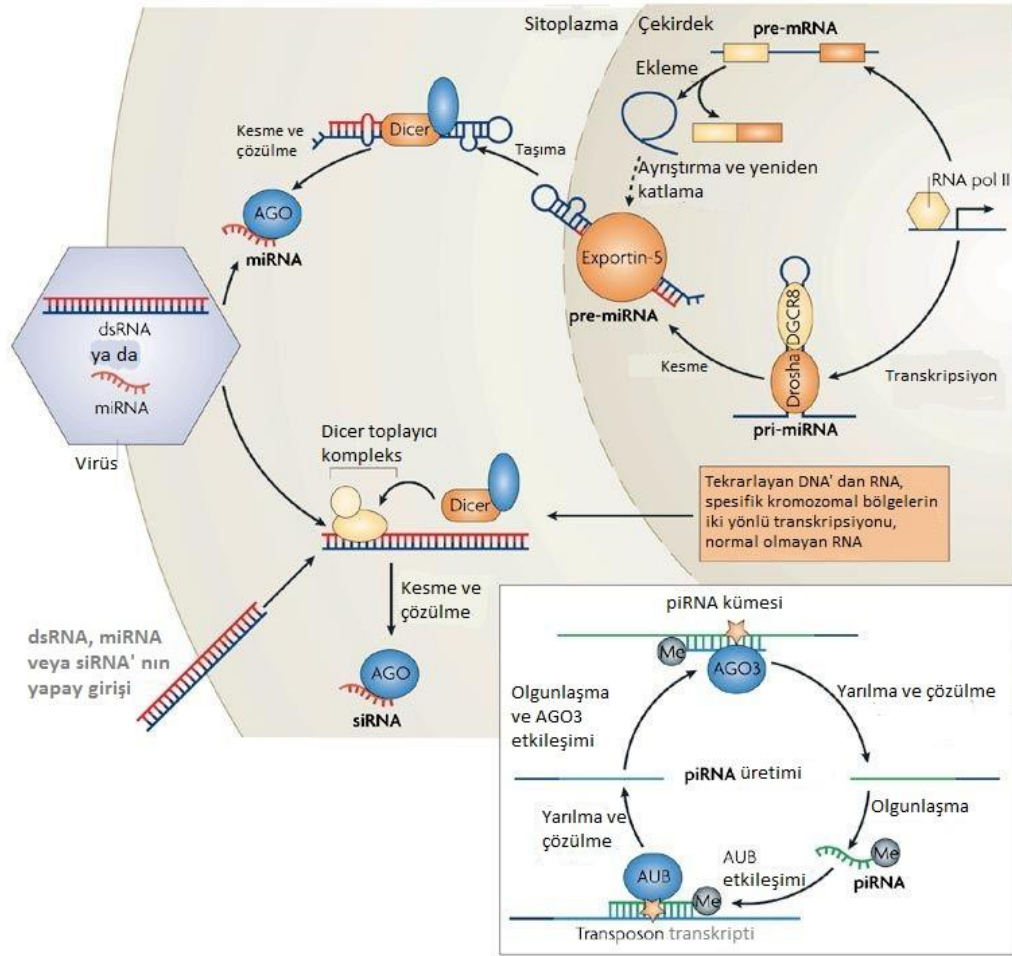
RISC' in anahtar unsuru olan AGO2 proteini memeli hücrelerinde rastgele bir dağılım göstermektedir. Ancak; AGO2 proteini memeli hücrelerinin sitoplazmalarında yer alan ve aynı zamanda mRNA'ların yıkılma merkezi olan sitoplazmik badilerinde daha yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Sen & Blau, 2005).

Memelilerde bulunan birçok AGO proteini hem biyolojik olarak hem de biyokimyasal olarak birbirlerinden farklılık göstermektedir. Aralarından sadece AGO2 proteini, yapısında bulunan endonükleaz H bölgesinden dolayı mRNA bölme aktivitesi göstermektedir (Liu et al., 2004). AGO2 proteini ayrıca memelilerin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. AGO2 proteinine sahip olmayan hücreler siRNA' lara deneysel bir yanıt oluşturmamaktadır.

AGO2 proteininin endonükleaz H enzimi aktivitesi gösterebilmesi için kofaktör olarak divalent bir katyona ihtiyacı vardır. Bu enzimlerin aktif merkezi aspartik asit ve glutamik asit amino asitlerinden gelen üç karboksilat gruplu bir katalitik üçlü içermektedir. Bu amino asit rezidüleri, nükleolitik atak gerçekleştirmek üzere temel metal ve su moleküllerini koordine etmektedirler. AGO bağlı miRNA' lar moleküler ağırlık olarak 100 kilodalton (kDa) ile 2 megadalton (MDa) aralığında farklı kompleksler içerisinde yer almaktadırlar (Höck et al., 2007).

1.2.1. RNA susturma yolları ve argonat proteinleri

Küçük kodlanmayan RNA (ncRNA)' lar ya eksojen kaynaklıdır ya da hücreler tarafından endojen olarak üretilmektedirler. Şekil 1.2' de çeşitli küçük RNA molekülü kaynakları görülmektedir.



Şekil 1.2. Küçük RNA moleküllerinin çeşitli kaynakları (Hutvagner & Simard, 2008)

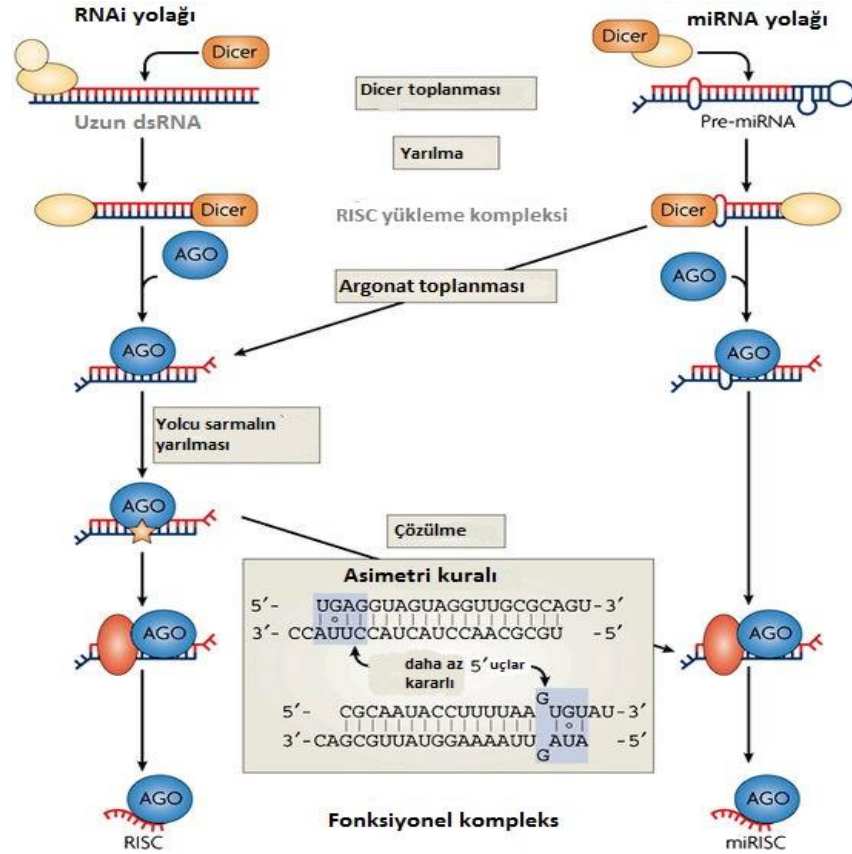
miRNA, siRNA ve dsRNA molekülleri hücrenin içerisine dışarıdan sokulduğunda bir RNase-III tipi bir enzim olan dicer (Dcr) enzimi tarafından küçük RNA' lara bölünmektedir. Endojen küçük RNA' lar ise bir dizi enzimatik aktiviteler aracılığı ile üretilmektedirler.

dsRNA molekülleri belirli bazı proseslerden geçtikten sonra küçük RNA dupleksinin bir sarmallarından biri AGO proteinleri ile bir araya gelerek fonksiyonel RISC' i oluşturmaktadırlar.

Küçük RNA' ların işlenmesi ve AGO proteinleri üzerine yüklenmesi türden türe değişiklikler göstermektedirler (Förstemann, Horwich, Wee, Tomari, & Zamore, 2009; Steiner et al., 2007).

siRNA yolağında, siRNA dupleks molekülü üzerindeki dicer-2 (Dcr-2) ve dsRNA bağlayıcı R2D2 proteinlerinin bağlanma yönlendirilmesi siRNA sarmallarından hangi

birinin AGO kompleksine yükleneceği açısından belirleyici rol oynamaktadır (Tomari, Matranga, Haley, Martinez, & Zamore, 2004). R2D2 daha kararlı uca bağlanırken, Dcr-2 daha az kararlı uca alınmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Argonat -küçük RNA komplekslerinin toplanması (Hutvagner & Simard, 2008)

RISC yükleme kompleksi (RLC) olarak adlandırılan bu kompleksin Dcr-2 ve AGO2 arasındaki bir etkileşim ile holo-RISC olarak bilinen bir AGO kompleksini oluşturduğu öne sürülmüştür (Tomari & Zamore, 2005). AGO2 siRNA duplexi ile birleştiğinde, argonat proteinini yolcu sarmal olarak adlandırılan aktif olmayan siRNA sarmalını yaracak ve böylece çözülme başlayacak ve son olarak da yolcu sarmalın argonatın aktif RISC kompleksi ve küçük RNA'yı oluşturmak üzere ayrılması ile de süreç tamamlanır (Tomari & Zamore, 2005). Argonat proteinine bağlı kalan sarmalın

seçimi asimetri kuralı olarak bilinen küçük RNA' nın 5' uçlarının termodinamik kararlılığı ile yönlendirilir.

1.2.2. miRNA ile siRNA' lar

siRNA ve miRNA' lar ile ilgili fonksiyonel anlamda birçok benzerlik ve de farklılıklar söz konusudur. Bu durum bu moleküllerin birbiri ile yoğun bir şekilde karıştırılmasına neden olmaktadır. Öncelikle şunu ifade etmek gerekir ki miRNA ile siRNA hareketlerini net sonuç bakımından ayırt etmek mümkün değildir. miRNA ve siRNA arasındaki benzerlik ve farklılıklara ilişkin bilgiler aşağıdaki Tablo 1.1' de ifade edilmektedir.

Tablo 1.1. *miRNA ile siRNA arasındaki farklar*

	miRNA	siRNA
Kaynak	Eksojen; virüsler, transpozonlar, sentetik dsRNA' lar	Endojen; genom tarafından kodlanmış
Oluşma şekli	Viral dsRNA' degradasyonu; hücrede vektör bazlı yabancı gen ekspresyonu; deneysel olarak hücre içerisine sokulması	Endojen gen transkripsiyonu
Sentez enzimi	RNA polimeraz III; U6 promoter; <i>in vitro</i> transkripsiyon için diğer RNA polimeraz	Daha çok RNA polimeraz II, biraz RNA polimeraz III, doğal transkripsiyon
dsRNA	Yanlış eşleşme olmaz	Yaygın olarak bir veya daha çok yanlış baz eşleşmesi gözlenir
Boyut	21- 23 nükleotid	19- 25 nükleotid
Uç yapısı	3' dinükleotid çıkıntısı	3' dinükleotid çıkıntısı
Hedef	mRNA (sadece bir tane)	mRNA (100 veya daha fazlası kadar sayıda)
Hedef ile etkileşim	Mükemmel baz eşleşmesi; tasarım yolu ile	Mükemmel ya da mükemmel olmayan baz eşleşmesi; yaygın olarak 1 veya daha çok yanlış baz eşleşmesi

Tablo 1.1. (devam) *miRNA ile siRNA arasındaki farklar*

Hücresel eylem	mRNA yarılmaması	mRNA yarılmaması (bitkilerde) veya küçük dsRNA bölgesinin geçici oluşumu
Kökteş proteine etkisi	Protein ekspresyonunun bozulması	Protein ekspresyonu tamamen bozulur ya da translasyon geçici olarak baskılanır

Nitekim bu moleküller arasındaki esas fark bu moleküllerin ne yaptığı ile ilgili değil, bu moleküllerin nereden geldikleri ile ilgili olmaktadır. miRNA' lar hücrenin genomik DNA' sında bulunan genlerden transkribe edilirken, siRNA' lar dışarıdan gelmektedir. siRNA' lar ya uzun dsRNA' ların degradasyonunun/prosesinin, ekspresyon vektörünün ürettiği shRNA' nın prosesinin ya da direkt transfeksiyon ile girmesinin sonucudur. Bütün proses hakkında düşünmenin en iyi yolu ve miRNA ve siRNA' nın gen susturma prosesini etkileyebilmesinin yolu onların gerçek anlamda paralel yollarda çalıştığını ve sitoplazmada birleştiklerini anlamaktan geçmektedir. Hem siRNA hem de miRNA, miRNA ve siRNA yolları çoğu organizmada farklı türlerde dicer enzimleri ile desteklense de, genel olarak dicer adı verilen bir enzimin etkisi ile olgunlaşırlar. Her iki durumda da küçük RNA' ların her türü RISC molekülüne yüklenirler. miRNA' ların temel fonksiyonu hayvanlarda translasyonel baskılama ve bitkilerde mRNA kesimi iken, siRNA sadece mRNA kesimi ile ilişkili olma eğilimindedir.

1.3. Biyomateriyaller

Biyomateriyaller tanım olarak, amaçlanan işlevini yerine getirmek üzere insan veya hayvan biyolojik sistemleri ile temas halinde olan materyallere denmektedir. Biyomateriyaller katı, sıvı, gel maddelerinin de içerisinde bulunduğu farklı tür materyallerden yapılabilir. Bu geniş tanım, biyomateriyallerin ve kullanım amaçlarının yıllar içerisinde gelişmesi ile geliştirilmiştir. Başlangıçta biyomateriyaller sadece sentetik materyaller olarak tanımlanmış olup canlı veya cansız doğal kökenli materyaller daha sonraları tanımın içerisine dahil edilmiştir. Biyomateriyallerin tanımı şu an aktif ilaçlar dışında hayvan veya insanların biyolojik sistemleri ile temas halinde olan bütün maddeleri kapsamaktadır. Biyomateriyaller başlıca olarak medikal

uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır. Bu anlamda biyolojik sistem ile temas direk veya indirekt olabilmektedir. Örneğin; hücre kültürleri ve medyalar, kan protein analizi, biyoteknolojide kullanılan biyomolekül proses kültürleri, diyagnostik gen dizileri, medikal ürünlere yönelik primer ambalaj malzemeleri, vs...

Biyomateryal kullanımı sürekli olarak artmaktadır ve birçok farklı disiplinden bilgi ve fikirleri entegre etmektedir. Bu disiplinler tıp, biyoloji, kimya, fizik, materyal ve mühendislik bilimleridir. Biyomateryaller pratik olarak bir final ürünü olarak kullanılmayıp, medikal ürünlere entegre edilmektedirler. Bu durum, biyomateryallere biyolojik yanıtı çok önemli hale getirmektedir. Biyomateryal kullanan medikal ürünlerin içerisinde basit bir dil depressöründen kompleks yapay kalp ve doku rejenerasyon ürünlerine kadar birçok ürün mevcuttur. Biyomateryaller için yapılan başka bir tanımda biyomateryallerde bulunması gereken çok önemli bir özellik vurgulanmaktadır. Biyoyumluluk adı verilen bu özellik ise materyallerin uygulandığı canlı sistemde uygun biyolojik yanıtlar üretme özelliğine denmektedir. Bu uygun biyolojik yanıtlar üretme özelliği ile kastedilen kabul edilebilir toksisite ve duyarlılaştırma, yabancı cisim reaksiyonlarının olmaması ve normal iyileşmenin desteklenmesidir.

1.3.1. Biyomateryal türleri

Biyomateryaller; sentetik (metaller, seramikler, polimerler, kompozitler), doğadan türetilmiş biyomateryaller (bitkiden türetilmiş, dokudan türetilmiş, vs...) ve yarı sentetik veya diğer adı ile hibrit biyomateryaller olmak üzere üç sınıfta incelenmektedir.

1.3.1.1. Metaller

Metalik materyaller (metaller ve alaşımlar) daha çok dental uygulamalarında ve ortopedik implantlar gibi yük taşıma uygulamalarında kullanılmaktadır. En çok kullanılan metalik materyaller medikal amaçlar için kullanılanlardır. Bunlar; paslanmaz çeliklerin farklı sınıfları, saf titanyum ve titanyum alaşımları ve kobalt bazlı alaşımlardır.

1.3.1.2. Biyopolimerler

20. yy. ortalarında polimer bilimlerinde meydana gelen atılımlar medikal uygulamalarda kullanılabilme özelliği olan çok sayıda farklı polimerlerin üretilmesini sağlamıştır. Biyopolimerler, damar protezleri, sondalar, ilaç gönderme kitleri, deri/kıkırdak gibi yük taşıma dışı uygulamalarda kullanım alanlarına sahiptirler.

1.3.1.3. Biyoseramikler

Biyoseramikler, ısıya dayanıklı polikristalin bileşiklerdir. Biyoseramiklerin biyobozunur (trikalsiyum fosfat); biyoaktif (biyocam) ve biyoinert (zirkon, alüminyum oksit) özellikleri gösteren türleri mevcuttur. Biyoseramikler genelde sert ve kırılğan bir yapıya sahiptir. Bu da bu materyallerin çoğu yük taşıma uygulamalarında kullanımı için engel teşkil etmektedir. Buna rağmen bu malzemeler yüksek basınç dayanımlarına sahip malzemelerdir.

1.3.1.4. Kompozitler

Kompozit malzemeler sentetik ve naturel olabileceği gibi her iki türdeki malzemelerin kombinasyonu da olabilmektedirler. Bu malzemeler bileşenlerinin avantajlarının bileşimi malzemeler olmakla birlikte bu materyallerin unsurları moleküler düzeyde belirgin bir şekilde birbirinden ayrılmaktadırlar. Bu malzemeler spesifik bir kullanım için tasarlanmış malzemelerdir ve medikal amaçlar için oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

1.3.1.5. Doğal biyomateriyaller

Doğal biyomateriyaller, aynı olmasa bile biyolojik sistemin metabolik yollar yolu ile tanıyıp işleyebildiği materyaller ile benzer özellikler göstermektedir. Bu materyaller, sentetik materyallerde sıklıkla karşılaşılan toksisite probleminden kaçınmayı sağlamaktadırlar. Buna ek olarak doku iyileşmesi ve entegrasyonunu destekleyen biyokimyasal sinyalleri sağlayabilme özellikleri vardır. Ancak, bu malzemelerin, düşük sıcaklıklılarda denature olabilme ve ayrışabilme, malzemelerin işlenmesi ve sterilizasyonun güçlüğü gibidezavantajları da söz konusu olmaktadır. Doğal biyomateriyaller genel olarak üç tip biyopolimerden oluşurlar:

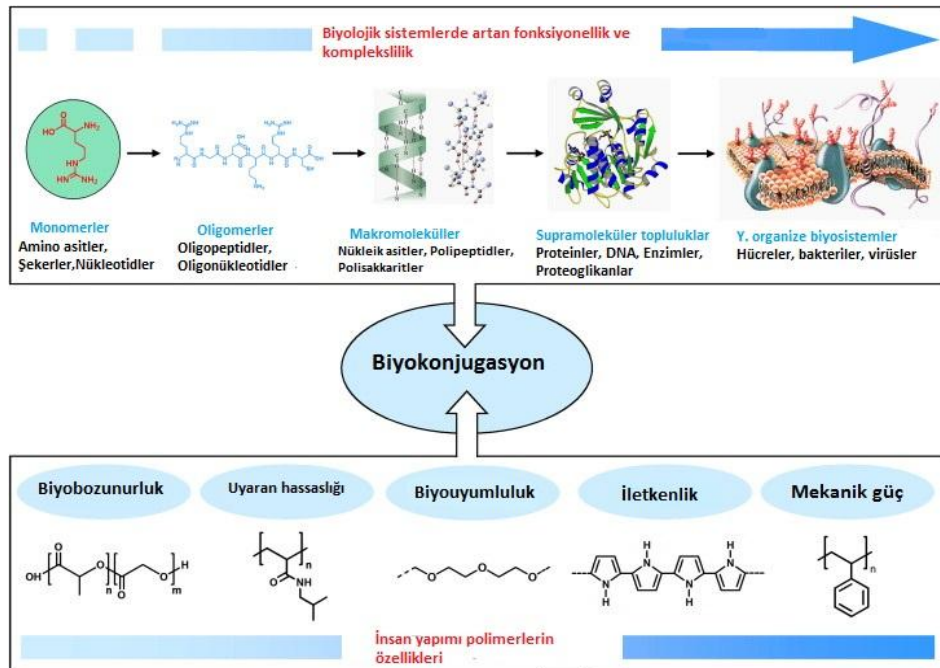
- proteinler – amino asit zincirleri (elastin, fibrin, kollojen, ipek proteini)
- polisakkaritler –şeker zincirleri (kitin, glikozaminoglikanlar)
- polinükleotidler – nükleotid zincirleri (DNA, RNA)

Doğal biyomateriyaller, bitkilerden, hayvanlardan (ksenojenik) veya insanlardan (allojenik) türetilmektedir. Doğal olarak türetilmiş biyomateriyaller canlı olmayan deselülerize ekstraselüler matriks ve diğer türevlerinin veya yaşayan canlı hücreler (otolog veya allojenik) formunda var olabilmektedirler. Doğal biyomateriyaller, çoğunlukla onarıcı materyallerdir, yerini alması planlanan dokuya benzer yapıya

sahiptirler ve de dokunun yeniden yapılanmasına, onarımına, rejenerasyonuna yardım eden birçok elemente sahiptirler (H. Shin, Jo, & Mikos, 2003).

1.4. Polimer Biyokonjugasyon

Polimer biyokonjugatlar, genel olarak biyolojik birimlere kovalent olarak bağlanmış sentetik makromoleküller olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik birimden kasıt, lipidler, nükleik asitler gibi canlı organizmada bulunabilen herhangi bir moleküldür. Bu biyolojik birim sınıfının içerisine sentetik oligopeptidler, oligonükleotidler gibi biyolojik kökenli olmayan ancak her ne kadar da insan yapımı olsa da biyolojik yapıları moleküller olarak kabul edilen moleküller de dahil olmaktadır. Aşağıda verilen Şekil 1.4, biyolojik sistemlerin doğal olarak sahip oldukları hiyerarşik organizasyonun farklı düzeylerinin (monomerik, oligomerik, polimerik, supramoleküler) polimer biyokonjugatlar oluşturmak üzere kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 1.4. Biyokonjugasyon kavramının şematik gösterimi (Lutz & Börner, 2008)

Ayrıca yine Şekil 1.4, polimer biyokonjugatlarda sentetik polimerlerin taşıdığı tamamlayıcı rolü vurgulaması açısından önem taşımaktadır. Sentetik polimerler, doğal

polimerlere oranla daha büyük bir kimyasal çeşitliliğe ve etkileyici özelliklere sahiptirler. Sentetik polimerleri cazibeli kılan bir diğer etken ise doğal polimerlere kıyasla daha ucuz olmalarıdır.

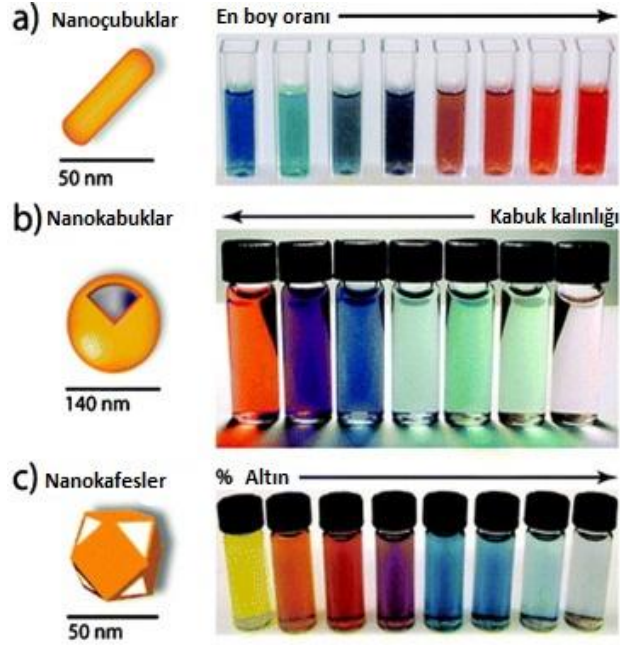
1.4.1. Moleküllerin kendiliğinden oluşumu

Moleküllerin kendiliğinden oluşumu diye adlandırılan kavram, kovalent olmayan etkileşimlerin belirleyici olduğu ve moleküllerin gelişi güzel dağılması ve spesifik olarak birleşmesi ile karakterize edilmektedir. Bu özelliğe sahip moleküllere örnek olarak proteinler, peptitler, DNA molekülleri verilebilir. Moleküllerin kendiliğinden oluşumu özelliğinden biyolojik olarak da ilham alınabilir. Örneğin; hücreler çevrelerine yanıt veren aktif yapılar olarak düşünülebilen gelişmiş mikroteknolojinin simgeleridir. Ancak; hücreler, proteinler, lipitler ve DNA gibi biyomoleküllerden oluşmakta ve bu biyomoleküller genelde fonksiyonel nanoyapılar içerisinde kendiliğinden bir araya gelmektedirler. Biyolojik olarak ilham alınan moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesi olayını taklit edebilmek için doğal olarak oluşan kendiliğinden bir araya gelme olayının özerkliği ve termodinamik stabilitesini kontrol eden güçleri iyi bir şekilde anlamak gerekmektedir. 1981 yılının başlarında, Drexler, moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesi yolu ile daha yüksek mertebeden yapıların oluşturulması için monomerik yapı taşları olarak proteinlerin kullanıldığı aşağıdan yukarıya bir yaklaşımı ile cihazlar üretmek için protein modelinin kullanılabileceğini öne sürmüştür (Drexler, 1981). Protein ve peptidler yapı taşları olarak özellikle cazip olan moleküllerdir. Çünkü protein ve peptidlerin katlanmaları, stabiliteleri ve protein-protein etkileşimlerini kontrol eden kurallara ilişkin çok şey bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak de novo tasarım alanı ortaya çıkmıştır. Şimdiye kadar çoğu de novo tasarım alanları, sonlu boyutta kendiliğinden bir araya gelmiş proteinimsi yapılar üzerine odaklanmıştır. Ancak, bu çabaların ürünü tasarım prensipleri, artık daha geniş ölçekte cihazların ve materyallerin üretimine doğru büyümekte ama zorluklar iki katına çıkmaktadır. Birincisi nanomateriyaller oluşturan kendiliğinden bir araya gelme özelliğine uygun yapı taşları tasarlamak; ikincisi ise yapıya fonksiyonellik kazandırılmasıdır. Fonksiyonellik, moleküllerin doğasında var olan son derece küçük özellik boyutlarından (bu özellik fotonik uygulamalar için gereklidir) veya kendiliğinden bir araya gelen iskele içerisinde spesifik fonksiyonel bir epitopun eklenmesi ile oluşturulmaktadır.

Geri dönüşümsüz agregasyonun aksine, kendiliğinden bir araya gelme olayı üç farklı adımdan oluşmaktadır: moleküler tanıma ve onu izleyen tersinir birleşme, kendi kendini düzeltme ve sonlanma adımları (Lehn, 2009). Nano boyutta yapıların kendiliğinden bir araya gelmesi kovalent olmayan etkileşimler aracılığı ile meydana gelmektedir. Bunlar kinetik olarak kararsız metal koordinasyonu yanı sıra hidrojen bağı, dipolleri ve formal yükleri içeren elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleridir. Bu etkileşimlerin bir çoğu büyüklük olarak küçük olsa da ($<5 \text{ kcal mol}^{-1}$) kendiliğinden bir araya gelmiş yapıda bu etkileşimlerden çok sayıda olması bu etkileşimleri önemli kılmaktadır. Özetle; moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesi olayı enerjistik olarak optimize edilmiş supramoleküler yapılar elde etmek için zayıf etkileşimlerin tersinir birleşmeleri kontrol etmesi vasıtası ile meydana gelen dinamik bir süreçtir.

1.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji geçen yüzyıldan beri bilinen bir araştırma dalıdır. Nanoteknoloji çeşitli türlerde nano boyutta materyaller üretilmesine neden olmuştur. Nanopartiküller 1-100 nm aralığında boyutlara sahip olan küçük partiküllerdir. Bu materyallerin önemi, araştırmacıların, maddenin optik özellikleri gibi fizikokimyasal özelliklerinin partikül boyutu ile değiştiğinin belirlenmesi ile anlaşılmıştır. Aşağıda verilen Şekil 1.5' den farklı boyut ve şekillerdeki nanopartiküllerin çözeltilerinin farklı renklere sahip olduğu görülmektedir. Söz konusu bu özellik, bu materyallerin biyogörüntüleme uygulamalarında kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (Dreaden, Alkilany, Huang, Murphy, & El-Sayed, 2012).



Şekil 1.5. Altın (Au) nanopartiküllerin renklerinin boyut ve şekillerine bağlılığı (Khan, 2017)

Nanopartiküller üç tabakadan meydana gelmektedirler: çeşitli küçük moleküller, surfaktanlar, metal iyonları, polimerler ile fonksiyonelize edilebilen yüzey tabakası, kimyasal olarak bütün yönleri ile çekirdekten farklı olan kabuk tabakası ve nanopartikülün temel kısmı olan ve genelde nanopartikülün kendisini ifade eden çekirdek(W. K. Shin, Cho, Kannan, Lee, & Kim, 2016). Nanopartiküller ilaç salınımı, gaz sensörü, CO₂ yakalama, çeşitli kimyasal ve biyolojik sensörler gibi uygulamalarda kullanım alanına sahiptirler. Nanopartiküller boyut, morfoloji ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılmaktadırlar. Bunların iyi bilinen bazıları; karbon bazlı nanopartiküller, metal nanopartiküller, seramik nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller, polimer nanopartiküllerdir ve lipid bazlı nanopartiküllerdir.

1.5.1. Polimer nanopartiküller

Polimer nanopartiküller, normalde organik bazlı nanopartiküllerdir. Ancak literatürde bu yapılar için toplu olarak polimer nanopartikül terimi kullanılmaktadır. Fakat spesifik olarak nanokapsüller ve nanoküreler olmak üzere iki farklı türe ayrılmaktadırlar (Şekil 1.6).

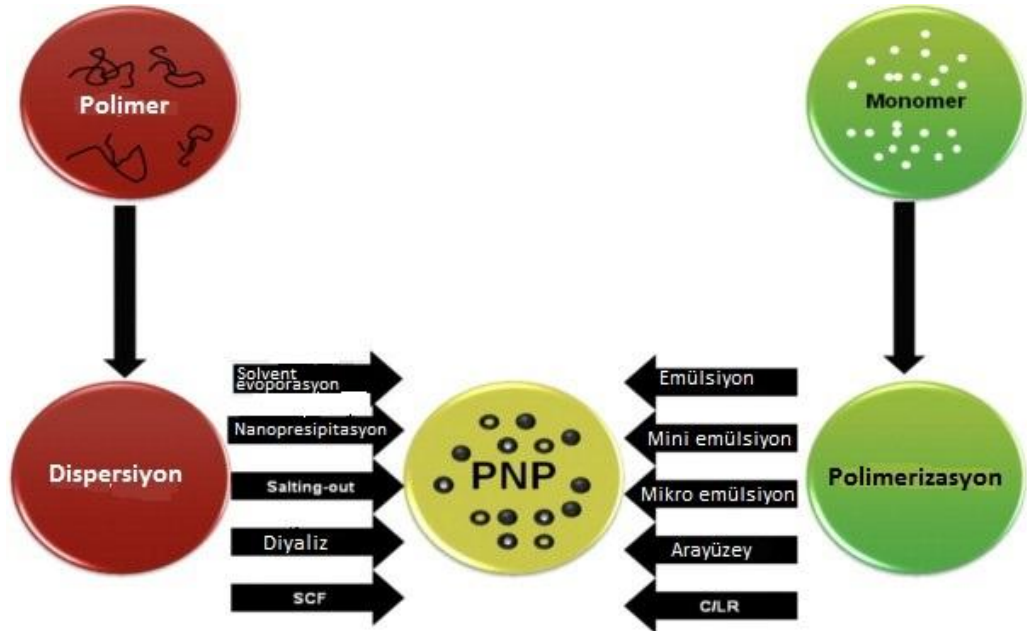


Şekil 1.6. Yağ (B) ve su (C) nano kapsüller ve polimer nanopartikül nanokürelerin (A) gösterimi

Nanoküreler, tüm kütlesi katı olan matriks partiküllerdir. Diğer moleküller küresel yüzeyin dış sınırına adsorbe olurken nanokapsüller ise katı kütle partikül içerisinde tamamen enkapsüle olmaktadır (Rao & Geckeler, 2011).

1.5.2. Polimer nanopartikül hazırlama teknikleri

Polimer nanopartiküller ya önceden oluşturulmuş polimerler ile ya da polireaksiyonlar ya da klasik polimerizasyon kullanmak suretiyle monomerlerin direkt polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Polimer nanopartiküllerin farklı hazırlanma yöntemleri Şekil 1.7’ de verilmiştir.



Şekil 1.7. Polimer nanopartikül hazırlama yöntemleri (Rao & Geckeler, 2011)

Nanopartikül hazırlamak için kullanılacak metodu seçerken birtakım faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar; partikül türü, partikülün uygulama alanı,

partikülboyutu gibi birtakım faktörlerdir. Örneğin; çevre veya medikal bir uygulama için geliştirilmek istenen bir polimerik sistem surfaktanlar veya organik çözücü kalıntıları gibi katkı maddeleri veya reaktiflerden arındırılmış olmalıdır.

1.5.2.1. Emulsiyon polimerizasyonu

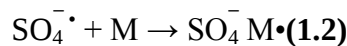
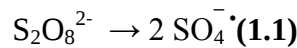
Emulsiyon polimerizasyonu çok çeşitli özel polimerlerin üretilmesinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Dispersiyon ortamı olarak suyun kullanılması bu metodu çevre dostu kılan bir etkidir ve polimerizasyon esnasında mükemmel bir şekilde ısı dağılımına yol açmaktadır.

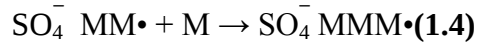
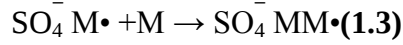
1.5.2.2. Surfaktansız emulsiyon polimerizasyonu

Konvensiyonel emulsiyon polimerizasyon sistemleri, reaksiyon sonunda üründen tamamen ayrılması gereken ve final üründen tamamen ayırmanın zor olduğu değişik miktarlarda surfaktan kullanmaktadır. Surfaktan uzaklaştırma hem zaman alıcı hem de üretim maliyetini arttıran bir durumdur. Ayrıca; günümüzde artan enerji ve çevresel kaygılar göz önünde bulundurulduğunda bu metodun ciddi dezavantajlar içerdiği görülmektedir. İşte tam bu anda surfaktansız emulsiyon polimerizasyon metodunun önemi ciddi bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Surfaktansız emulsiyon polimerizasyonu emülsifiyersiz veya sabunsuz emülsiyon polimerizasyonu olarak da bilinmektedir. Surfaktansız sistemde kullanılan reaktifler; deiyonize su, suda çözünen bir başlatıcı (potasyum persulfat) ve monomerlerdir. Bu monomerler içerisinde en yaygın olarak kullanılanları vinil ve akril monomerleridir. Böylesi polimerizasyon sistemlerinde polimer nanopartikül stabilizasyonu iyonlaştırılabilir başlatıcılar veya iyonik komonomerler kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

1.5.2.3. Emulsiyon polimerizasyon mekanizması

Stiren ve stiren tipi monomerlerin polimerizasyonu için genel olarak kabul edilen kalitatif bir teori surfaktanlı bir emulsiyon sistemi için geçmiş yıllarda önerilmiştir(Harkins, 1947). Bu teoriye göre polimerizasyon aşağıdaki şekilde ilerlemektedir. Monomerlerin çoğu damlacıklar halinde (1-10 µm) ve surfaktanların çoğu ise miseller halinde bulunmaktadır. Serbest radikaller ($SO_4^{\cdot-}$) aşağıdaki denklemlerde gösterilen persülfat ($S_2O_8^{2-}$) örneğindeki gibi başlatılmakta ve bu serbest radikaller sulu fazda monomer (M) ile reaksiyona girmektedirler.





Reaksiyon ilerlerken, oligomerik iyon içerisine dahil edilen monomer birimlerinin sayısı, hidrofobik zincir uzunluğu yüzey aktif özellikleri sunabilecek yeterli bir uzunluğa gelene kadar artmaktadır. Bu tür serbest radikal oligomerleri, monomer ile şişirilmiş miseller içerisine girebilme kabiliyetine sahiptirler ve miseller içine girer girmez, serbest radikaller diğer radikaller girene kadar büyümeye devam edip birleşerek reaksiyonun sonlanmasına neden olmaktadır (Smith & Ewart, 1948).



Böylece; monomer şişirilmiş misel daha büyük boyutlu monomer polimer partiküle dönüşür. Monomer tükenirken daha fazlası monomer damlacıklarından sulu faz boyunca polimerizasyon bölgesine difüze olmaktadır. Bu partikül başlatması bütün miseller ortadan kaybolana kadar devam etmektedir. Misellerin ortadan kaybolması durumu ise ya radikallerin yakalanması ve polimer partiküllerin oluşması yolu ile ya da emülsifiyerlerini yakalanan radikallere sahip olan komşu emülsifiyerlere vermek üzere dağıtmak suretiyle meydana gelmektedirler. Misellerin ortadan kaybolması partikül başlangıç aşamasını partikül büyüme aşamasından ayırmaktadır.

Eklenen sabun misellerinin varlığında, çoğalma aşamasından çok daha hızlı olan difüzyon prosesinin çözeltideki zincir büyümesi üzerinde baskın olması beklenmektedir. Bu nedenle yaygın zincir büyümesi işleminin oluşmasından önce serbest radikal oligomer sabun misellerinin biri tarafından yakalanacaktır. Bu durumda oluşmuş partiküllerin hepsinin, reaksiyon ortamında yeterli sayıda misel olması halinde kararlı olması gerektiği düşünülmektedir. Oluşan partikül sayısı 10^{15} - 10^{16} mL^{-1} aralığına ulaşabilmektedir. Kritik misel derişimi altındaki sabun çözeltileri ile yüzey aktif serbest radikal oligomerik türleri ve sabun moleküllerinin karışımının oluşması mümkündür. Bu durumda mililitre başına kararlı partiküllerin toplam sayısı, eklenen sabun olmaksızın gerçekleştirilen reaksiyondakine kıyasla artabilmektedir.

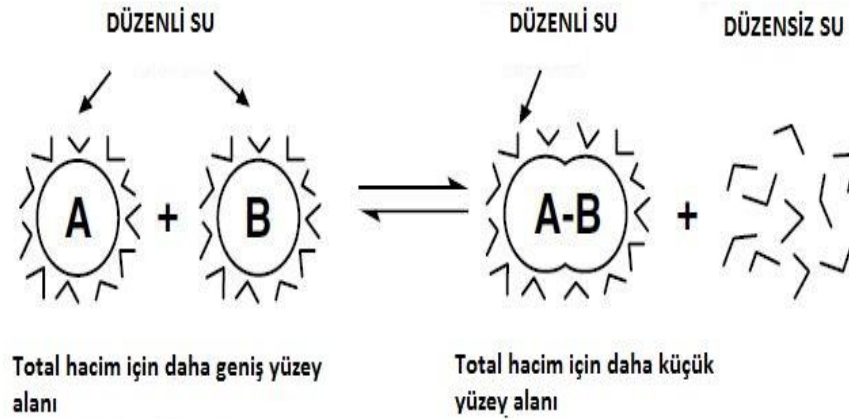
1.6. Proteinlerde Etkileşimler

Birkaç temel etkileşim proteinlerin bir arada tutulmasından sorumludur. Bu etkileşimlerin meydana gelmesinde su molekülleri önemli bir role sahiptirler. Polar

amino asit zincirleri suya hidrojen bağı katılmasına yol açabilirler veya bu etkileşimler hidrofobik amino asit zincirleri tarafından engellenebilir. Temel olarak su polar bir moleküldür ve O-H bağı bağı polarize bir bağıdır. Yani hidrojen (H) atomunun yükü oksijen (O) atomuna göre daha çok pozitif yüklüdür. Söz konusu polarite, O-H bağları ile kuvvetlendirilir. Polarite farkından dolayı su molekülü hem hidrojen bağı alıcısı hem de hidrojen bağı vericisi özelliğine sahiptir. Bu iki hidrojen molekülü uygun bir alıcı ile hidrojen bağı oluştururlar ve oksijen üzerindeki iki adet ortaklanmamış elektron çifti hidrojen bağı alıcısı olarak davranır. Mevcut çoklu hidrojen bağı alıcı ve verici bölgeleri nedeniyle su molekülü kendisi ile etkileşir. Suyun iki önemli özelliği vardır: Birincisi su yağlı yapılardan kaçır. Çünkü yağlı yapılar suyun kendisi ile etkileşmesine engel olurlar. İkincisi ise, onun hidrojen bağı ağına giren herhangi bir yapı ile uygun bir şekilde etkileşime girmesidir.

1.6.1. Hidrofobik etkileşimler

Proteinler, yağlı yapıları olabildiğince su ile temas ettirmemek için katlanırlar. Bu durum; protein katlanması, protein protein etkileşimleri, protein ligand etkileşimleri için büyük bir itici güç sağlamaktadır. Hidrofobik etkileşimler Şekil 1.8’ de gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Hidrofobik etkileşimler (Gilbert & Ph, 2000)

Kimyasal bir tepkimede itici güç, bu kimyasal tepkimenin meydana gelmesini sağlayan durumdur. Bu etkileşim serbest enerjideki azalmanın çoğuna katkıda bulunan bir etkileşimdir. Protein (ve DNA) katlanması için itici gücün çoğunu hidrofobik etkileşimler temin etmektedir. Su hidrofobik yan zincirlerin dışına sızarken, proteinlerin

birbirine uzak olan kısımları daha kompakt bir yapı oluşturmak üzere bir araya gelirler. Çoğu globüler proteinlerin hidrofobik çekirdeği oldukça kompakt bir yapıya sahiptirler.

Bir hidrofobik grubu, su içerisine koymak yapılması çok zor olmaktadır. Normal şartlar altında su molekülü kendisi ile geniş bir hidrojen ağı oluşturmaktadır. Su molekülleri sürekli olarak hareket halindedir ve kendisi ve komşu su molekülleri ile birlikte sürekli olarak hidrojen bağları yapıp ve mevcut hidrojen bağlarını yıkıma uğratmaktadır. Bir hidrofobik molekül, suda çözündüğü zaman hidrofobik moleküllere yakın su molekülleri komşu su molekülleri ile çok sayıda ve çok farklı yönlerde hidrojen bağı oluşturmaktadırlar. Hidrofobik gruplar ile temas halindeki su molekülleri daha düzenli bir hale gelirler. Bu durumda, bu düzenlilik hali su moleküllerinin boşlukta mevcut çok sayıda düzenlenme yollarının kısıtlanması anlamını taşımaktadır. Bu durum, suyun entropisinde olumsuz bir azalmayı temsil etmektedir. Diğer moleküllerin yokluğunda bu su moleküllerinin artan düzenlenmesi hidrofobik moleküllerinin çözünmez olmasına yol açmaktadırlar.

Hidrofobik etkileşimler, proteinleri (ve DNA' yı) bir arada tutan olumlu etkileşimlerin çoğunu temsil etmektedir. Proteinler için, hidrofobik etkileşimlerin sonucu kompakt bir yapıdır. Bu yapıda hidrofobik yan zincirlerin birbiri ile temas halinde olduğu bir hidrofobik çekirdek oluşumu söz konusudur.

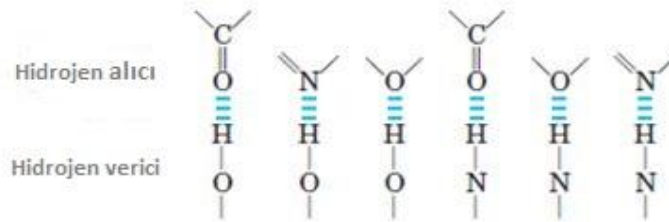
1.6.2. Van Der Waals etkileşimleri ve London dispersiyon kuvvetleri

Bu etkileşimler, atomlar arasında meydana gelen çok kısa mesafeli etkileşimler olup atomlar birbirine çok yakın bir konumda istiflendiği zaman meydana gelmektedirler. Hidrofobik bir etki, atomları çok yakın bir şekilde bir araya getirdiği zaman, London dispersiyon kuvvetleri ve van der Waals etkileşimleri devreye girerler. Bu durum, molekülleri birbirine daha çok yaklaştırmakta ve boşluklarının daha da azalmasına neden olmaktadır.

1.6.3. Hidrojen bağları

Hidrojen bağı, donör bir hidrojen atomuna sahip bir atom ile alıcı bir elektron çiftine sahip diğer atom arasında hidrojen atomunun paylaşılması anlamına gelmektedir. Proteinlerde gözlemlenen bu sekonder yapı söz konusu bu hidrojen bağlarını kaybetmekten uzak durma eğiliminin bir sonucudur. Su hem bir hidrojen bağı vericisi hem de bir hidrojen bağı alıcısı olarak davranmaktadır. Katlanmamış bir proteinde, hidrojen bağı donörleri ve alıcıları su ile hidrojen bağı oluştururlar.

Hidrojen bağları sadece suya özgü değildirler. Genellikle bir çift ortaklanmamış elektrona sahip, hidrojen alıcı bir grup olan oksijen veya azot atomu ve hidrojen donörü olan diğer elektronegatif bir atoma kovalent bağlı bir hidrojen (H) atomu arasında da hidrojen bağı oluşmaktadır (Şekil 1.9). Karbon (C) atomlarına bağlı hidrojen atomları H bağına katılmazlar. Çünkü C atomu ile H bağı arasındaki elektronegativite farkı çok azdır. Bu da C-H bağının polaritesinin çok düşük olduğu anlamına gelmektedir. Bunun neden olduğu bir durum da bütanolün (117 derece) kaynama noktasının bütana (-0,5 derece) göre oldukça yüksek olması durumudur.



Şekil 1.9. Hidrojen bağları (Gilbert & Ph, 2000)

1.6.4. Ligand bağlama spesifikliğı

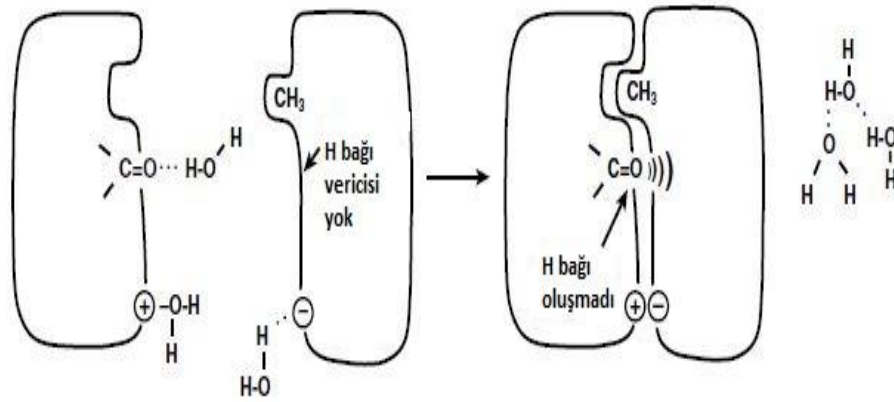
Bir protein ile küçük bir molekül veya diğer bir protein arasındaki etkileşimin özgüllük derecesi bu moleküllerin şekilleri, yükleri gibi etkenler bakımından birbirilerini tamamlayıcı nitelikte olmaları ile ilişkilidir. İyon-iyon ve hidrojen bağı etkileşimleri protein stabilitesine çok katkıda bulunmazlar. Çünkü katlanmış bir proteindeki bu etkileşimler, kolaylıkla bu moleküllerin bireysel anlamda su ile etkileşimleri vasıtası ile değiştirilebilirler. Ancak; bu etkileşimlerden elde edilebilecek özgüllüğün derecesi oldukça büyüktür. Sıkı bir bağlanmanın gerçekleşebilmesi için protein ve ligandı her şekilde tamamlayıcı olmalıdırlar. Bu tamamlayıcılık unsurları yük, şekil, boyut, hidrojen bağı donör ve alıcı bölgeleridir.

Hem protein hem de ligandlar ayrıldıkları zaman suda kolaylıkla çözünmektedirler. Protein yüzeyleri etkileştiği zaman su dışlanır, hidrojen bağları kırılır ve oluşur, sonuç olarak protein ve ligand birbirlerine bağlanır.

Protein katlanmasında olduğu gibi ve aynı nedenlerden dolayı, hidrofobik etkileşimler böylesi reaksiyonlar için gerekli serbest enerjinin çoğunu

karşılamaktadırlar, fakat etkileşim ile sudan uzaklaştırılan polar gruplar, birleşmiş halde uygun partnerler bulmak zorundadırlar.

Optimal olmayan bir ligandın bir proteine bağlanmasının zayıf olması, ligandın proteinin bağlanma bölgesi içerisine sığacak doğru bir boyuta sahip olmamasından değil, protein üzerindeki tamamlayıcı grubun su ile sahip olduğu olumlu etkileşimi, ligand ile olumlu bir etkileşim vasıtasıyla eşit ölçüde telafi edememesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Protein- ligand etkileşimi (Gilbert & Ph, 2000)

İkincil yapının oluşması ile olduğu gibi ligand ve protein arasında oluşabilecek çoklu hidrojen bağları ligandın su ile yaptığı hidrojen bağlarından daha kuvvetli ve olumlu olabilmektedir. Hidrojen bağı aslında ligandların proteine bağlanmasının serbest enejisine olumlu katkılar yapabilmektedir. Sonuç olarak; sudaki bu fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimi anlamak, aynı zamanda DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-protein, RNA-protein, protein-protein gibi etkileşimlerin de anlaşılması anlamına da gelmektedir.

Özetle, iki proteinin veya bir protein ile küçük bir molekülün bağlanmasındaki özgüllük, etkileşen moleküllerin yük, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, şekil anlamında tamamlayıcı olması ihtiyacından kaynaklanmaktadır. Olası etkileşim türlerinden herhangi biri karşılanamaz ise etkileşimin gücü azalmaktadır. Tablo 1.2' de kimyasal bağ türlerine ve bağ enerjilerine ilişkin bilgiler verilmiştir.

Tablo 1.2. *Kimyasal bağ türleri ve enerjileri*

Bağ türü	Bağ enerjisi (kcal/mol)
Kovalent bağ	40- 140
Güçlendirilmiş iyonik bağ	10
İyonik bağ	5
Hidrojen bağı	1- 7
İyon-dipol bağı	1-7
Dipol-dipol bağı	1-7
Van der Waals	0.5-1
Hidrofobik	1

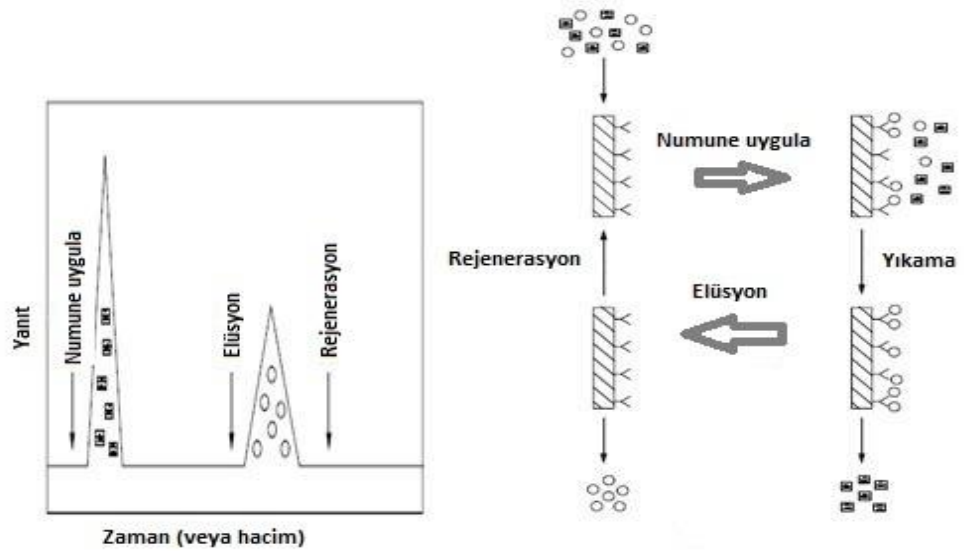
1.7. Afinite Kromatografisi

Kimyasal ayırma, modern araştırmanın en temelinde yer almaktadır ve kompleks bileşikler işlemek için geniş olarak kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisi bu anlamda geniş aralıkta örnekler ile çalışabilme olanağı tanıdığı için oldukça popüler bir tekniktir. Uygun bir destek materyali ile birleştirildiğinde, bu teknik kimyasal tayin ve ölçüm amacı ile yüksek performanslı ayırmalar veya ürün saflaştırılması için kurulan sistemler içerisinde uygulanabilmektedir. Geniş aralıkta durgun ve hareketli fazların kullanılabilmesi bu tekniği bu ayırmaların temelinde kullanılabilecek fiziksel ve kimyasal türler açısından oldukça ensek kılmaktadır.

Söz konusu bu ayırma tekniklerinden biri afinite kromatografisi tekniğidir. Bu teknik çoğu biyolojik sistemlerde meydana gelen enzim-substrat, antikor-antijen gibi tersinir ve spesifik etkileşimlerin kullanımına olanak tanımaktadır. Bu etkileşimler afinite kromatografisinde, uygun bir katı destek üzerine etkileşen moleküllerden birinin immobilize edilmesi ile kullanılmaktadır. Katı destek üzerine immobilize edilen moleküle terminolojik olarak ligand adı verilmektedir.

Şekil 1.11, afinite kromatografisi yapmak için kullanılan temel bir şemayı göstermektedir. Bu yaklaşımda, ilgili bileşiği içeren numune ligand molekül bağlanması için uygun özellikleri içeren bir mobil faz varlığında afinite kolonuna enjekte

edilmektedir. Bu kolon ile zayıf bir şekilde etkileşime giren mobil faza uygulama tamponu denilmektedir. Bu kromatografi tekniğinde numune kolondan mobil faz eşliğinde geçerken afinite ligandına tamamlayıcı özelliğe sahip bileşikler ligandlara bağlanacaktır.



Şekil 1.11. Afinite kromatografisinin temel bir şeması

Bu tekniğin yüksek seçiciliğinden dolayı numune içerisinde bulunan diğer türler bağlanmamış türler piki olarak kolondan ayrılacaktır. Afinite tabanlı ayırma işlemlerinde numuneden ayrılması istenen maddeyi çoğu kez bir veya iki adımda, 100 ile birkaç 1000 kat kadar bir saflaştırma verimi ile elde etmek mümkündür.

1.7.1. İmmünoafinite kromatografisi

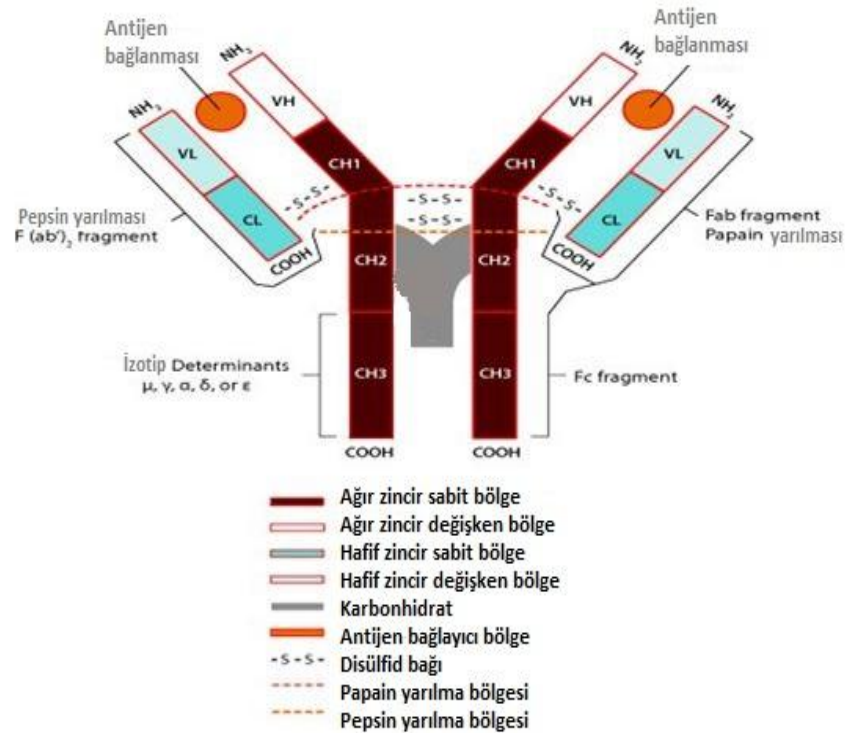
İmmünoafinite kromatografisi, durgun fazın içerisine antikor veya antikor ile etkileşen herhangi bir maddenin immobilize edildiği bir kromatografik metottur. Antikorlar, diğer moleküller ile etkileşimlerde yüksek bir seçiciliğe sahiptir.

1.7.1.1. Antikor yapısı

İmmünoafinite kromatografisinde ana unsur antikorlardır. Basit olarak ifade etmek gerekirse bir antikor, yabancı bir ajan veya bir antijene yanıt olarak vücut tarafından üretilen bir glikoproteindir. Yapılan araştırmalar vücudun 10^6 ile 10^8 çeşit antikor üretebildiğini göstermektedir. Bunların her birinin farklı bir antijene bağlanabilme özelliği bulunmaktadır. Bir antikorun (immunoglobulin G veya IgG)

temel yapısı tipik olarak iki özdeş ağır zincir ve de iki özdeş hafif zincir olmak üzere toplamda dört adet polipeptid zinciri içermektedir. Bu polipeptid zincirleri disülfid bağları ile birbirine bağlanmıştır. Bu polipeptid zincirleri, Y veya T şeklinde bir yapı oluşturmaktadırlar. Gövde bölgesi antikorun polipeptid zincirlerine kovalent olarak bağlı bir dizi karbonhidrat kalıntısı içermektedir. Antikorun daha üstteki uçlarında iki adet antijen bağlayıcı bölge bulunmaktadır. Antijen bağlanma bölgelerinin içerisinde veya yakınında yer alan bölgeler, aminoasit bileşiminin bir türden diğerine oldukça değişkenlik gösterdiği alanlardır. Bu özellik nedeniyle vücut yabancı ajanlara veya antikorlara karşı birbirinden farklı bağlanma afinitesi ve spesifikliğine sahip farklı antikorlar üretebilmektedir.

İmmünoglobülinler B lenfositleri tarafından üretilirler ve plazma içerisine salgılanırlar. Şekil 1.12’de bir immünoglobülin monomerinin temel yapısı gösterilmiştir.



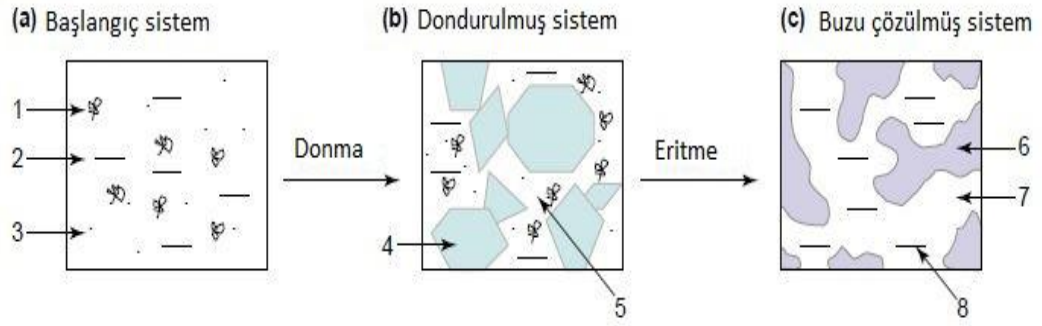
Şekil 1.12. Bir immünoglobülin monomerinin temel yapısı

Bir antijen üzerindeki antikor bağlanma bölgelerine epitop adı verilmektedir. Bir yabancı ajanın antijenik olabilmesi için, immün sistem tarafından tanınabilecek ve

işlenebilecek kadar büyük olması gerekmektedir. Bu büyüklük rakamsal olarak birkaç bin dalton (Da) mertebesinde olmalıdır. Ancak, birçok pestisit ve ilaçlar gibi küçük moleküller taşıyıcı proteinler gibi daha büyük türlere bağlandıklarında bir immün yanıt oluşturabilme özelliğine sahip olmaktadır. Bu taşıyıcılara bağlanmış ajanlara hapten adı verilmektedir.

1.8. Polimerik Kriyojeller

Kriyojeller, monomerik veya polimerik öncüllerin kısmen dondurulmuş çözeltileri içerisinde oluşan jel matrisleridir. Kriyojeller, tipik olarak birbirine bağlı makrogözenek veya süper makrogözeneklere sahip olmaktadır. Söz konusu bu özelliklerden dolayı herhangi bir boyuttaki çözünen madde, bir engel ile karşılaşmaksızın kriyojel içerisinde difüze olabildiği gibi, nano ve hatta mikropartiküllerin kütle transferleri de bu yapılar ile mümkün olabilmektedir. Kriyojellerin bu benzersiz yapısı, sahip oldukları fiziksel, osmotik ve kimyasal stabilite, onları biyolojik nanopartiküllerin (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tüm hücrelerin kromatografisi için çekici bir matris haline getirmektedir. Kriyojellerin oluşumu Şekil 1.13' deşematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.13. Kriyojel oluşumunun şematik gösterimi: 1,çözelti içerisindeki makromoleküller; 2, çözücü; 3, düşük moleküler ağırlıklı çözünenler; 4, donmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, bir kriyojelin polimerik çerçevesi; 7, makrogözenekler; 8, çözücü

Kriyotropik jelasyon dondurulmamış sistemlerde elde edilen jeller ile kıyaslandığında temel olarak farklı morfolojilere sahip polimerik materyaller üretir. Kriyojeller kovalent, iyonik veya kovalent olmayan türlerde olabilirler. Kriyojel içerisindeki makrogözeneklerin boyutu, birkaç mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar

değişiklik gösterebilmektedir. Kriyojellerin üretilmesi de benzer materyallerin üretilmesine kıyasla daha kolay yapılabilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

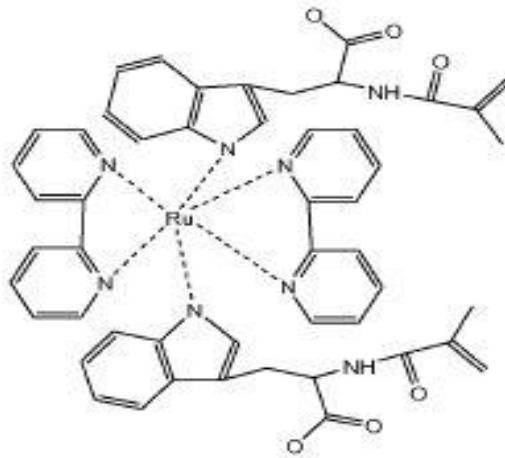
Bu çalışmada AGO2 proteini kaynağı olarak kullanılacak sığır karaciğeri taze dondurulmuş olarak marketten, karaciğer dokusunun ekstrakte edilmesinde kullanılan proteaz inhibitör kokteyli, Ditiyoeritrol (DTT) ve Anti- AGO2 monoklonal antikoru, örneklerin toplam protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan Bovine Serum Albumin (BSA), bikinkoninik asit (BCA) tayin kiti, N,N'-Metilenbisakrilamid (MBAAm), Amonyumpersülfat (APS) ve N,N,N',N'- Tetraetilmetilendiamin (TEMED), doğal jel elektroforezi için kullanılan Agaroz, nano- AGO2 polimer partiküllerin sentezinde kullanılan polivinil alkol (Mw 125,000), nano- AGO2 polimer partiküllerin miRNA bağlama etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan miR- 335 ve agaroz jeli görüntülemeye kullanılan SYBR Green, çalışmalar dahilinde kullanılan diğer kimyasallardan Trizma base, Metanol (CH₃OH) ve Etanol (C₂H₅OH) Sigma Aldrich' ten satın alınmıştır. Kriyojel sentezi için kullanılan 2-Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros firmasından tedarik edilmiştir. Denature jel elektroforezi için kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS), Alfa Aesar' dan, Hidroklorik asit (HCl) Merck' ten, Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen firmasından, Sodyum klorür Kimetsan' dan satın alınmıştır.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen kriyojelin karakterizasyonu için Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometresi, kriyojelin ve sentezlenen nano AGO2 kopolimer partiküllerin yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı, nano-AGO2 kopolimer partiküllerin partikül boyut ve de zeta potansiyeli dağılımlarının belirlenmesinde Malvern firmasının Zeta Sizer cihazı (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, Worcestershire, UK), AGO2 proteinin immunoafinite kromatografi metodu ile saflaştırılmasında AKTA Explorer FPLC, denature jel ve doğal jel elektroforezi yöntemleri ile yapılan karakterizasyon işlemleri için Thermo Scientific P9DS dikey elektroforez sistemleri, agaroz jel elektroforez ile yapılan bağlama çalışmaları Cleaver Scientific yatay jel elektroforezi sistemleri,

standart grafiklerin oluşturulmasında ve örneklerin absorbanstalarının ölçülmesinde Biotek Synergy H1 hibrid mikropılaka okuyucu kullanılmıştır. Çalışmalar esnasında gerçekleştirilen bütün pH ölçümleri HANNA H1 2211 pH/ORP metre ile, bütün tartımlar Ohaus Pioneer analitik terazi ile ve de bütün karıştırma işlemleri Jeiotech Multi-Channel manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Ayrıca; bu çalışmada kullanılan saf su Thermo Scientific Smart Pure saf su cihazından temin edilmiştir.

2.2. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) Kriyojel Sentezi

Kriyojel sentezi ANADOLUCA metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1185 µL deiyonize su ile 75 µL HEMA karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın üzerine 14, 15 mg MBAAm eklenmiş ve çözünönceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen karışıma 28, 06 µL bis(2-2'-bipiridil)(MATrp)₂-Rutenyum (II) (Şekil 2.1) ve 1, 5 mg.ml⁻¹ derişimdeki anti- AGO2 standart monoklonal antikorundan 28, 06 µL eklenerek elde edilen toplam karışım azot atmosferinde 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışım daha sonra buz banyosu içerisinde alınmış karışımın üzerine serbest radikal polimerizasyonu başlatmak üzere 1, 3 mg APS ve de 1, 25 µL TEMED eklenmiştir. Karışım kısa bir süre karıştırıldıktan sonra plastik bir enjektör içerisinde dökölerek -18 °C' de polimerleşmesi için bekletilmiştir. Sentezlenen kriyojel (poli(HEMA-ko-anti-AGO2) oda sıcaklığında bekletilerek içerisindeki safsızlıklar ve bağlanmayan türleri uzaklaştırmak amacı ile kolon hacminin 30 katı hacimde deiyonize su ile yıkanmıştır.



Şekil 2.1. bis(2-2'-bipiridil)(MATrp)₂-Rutenyum (II) molekülünün kimyasal yapısı

2.3. Kriyojel Karakterizasyonu

Bölüm 2.2. de belirtildiği gibi sentezlenen poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojellerin karakterizasyonları su tutma kapasitesi, Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskop (SEM) analizleri ile yapılmıştır.

2.3.1. Su tutma kapasitesi testi

Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) ve poli(HEMA) kriyojellerinin su tutma kapasitesi testi distile su içerisinde yapılmıştır. Öncelikle kuru formdaki kriyojel dikkatli bir şekilde tartılıp kriyojelin kuru ağırlığı not edilmiştir. Daha sonra kuru formdaki kriyojelin üzerine pipet ile doygunluk noktasına kadar distile su eklenmiş ve kriyojel tartılmıştır. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) ve poli(HEMA) kriyojellerinin su tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik 2.1' e göre hesaplanmıştır.

$$SD = (W_1 - W_0) / W_0(2.1)$$

W_0 : Kuru polimer ağırlığı

W_1 : Şişirilmiş polimer ağırlığı

SD : Şişme derecesi

2.3.2. SEM ile yüzey morfolojisinin incelenmesi

Kriyojellerin yüzey morfolojisini incelemek için SEM fotoğrafları çekilmiştir. Bu amaçla numune altın ile kaplama yapılmadan önce sıcaklığı 40 °C' ye ayarlanmış etüv içerisinde bir gece boyunca kurutulmuştur. Numunelerin üzeri SEM analizinden önce altın ile kaplanmıştır.

2.3.3. FT-IR analizi

Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) ve poli(HEMA) kriyojelin FT-IR spektrumu almadan önce numuneler bir gece önceden etüvde kurutulmuştur. KBr ile numuneler pellet formuna getirildikten sonra FT-IR spektrofotometre ile spektrumlar alınmıştır.

2.4. AGO2 Saflaştırılması

AGO2 proteinin saflaştırılması, marketten temin edilen taze dondurulmuş sığır karaciğerinden tek adımda poli(HEMA-ko-anti-AGO2) immunoafinite kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

2.4.1. Karaciğer dokusundan sitoplazmik ekstraktın hazırlanması

Karaciğer dokusundan sitoplazmik ekstrakt hazırlanması daha önce Hogan ve ark.'nın gerçekleştirdiklerigibi yapılmıştır (Hogan et al., 2014). Bunun için marketten dondurulmuş olarak temin edilen 20 gram taze sığır karaciğeri dokusu 60 mL ekstraksiyon tamponu (20 mM tris-HCl tamponu pH 8.0, 1 Mm MgCl₂, %1 triton-x 100, proteaz inhibitör kokteyli, 1 mM DTT, 100 mM NaCl) içerisinde homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Ardından ekstrakt içerisindeki hücre artıklarını uzaklaştırmak üzere +4 °C' de 1000 g devirde 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant başka bir tüp içerisine aktararak 12000 rpm devirde 1 saat süre ile santrifüj edilip bu işlem sonucunda elde edilen süpernatant süzme işleminden geçirildikten sonra saflaştırma amacıyla kullanılmıştır.

2.4.2. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) afinite kromatografisi

Saflaştırma işlemi FPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için daha önceden FPLC cihazına takılıp 20 mM tris-HCl pH 8.0 tamponu ile dengelenmiş kriyojel kolona, daha önce hazırlanan sığır karaciğeri sitoplazmik ekstraktından 0,1 mL enjekte edilmiştir. 0,3 mLdak⁻¹ akış hızı ile 20 mM tris-HCl pH 8.0 tamponu belirli bir süre geçirildikten sonra kriyojele bağlanan türler 20 Mm tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl tamponu ile elüe edilmiş ve fraksiyon toplayıcı yardımı ile toplanmıştır.

2.4.3. Total protein tayini

Miktarı bilinmeyen numunenin toplam protein miktarı Sigma-Aldrich BCA protein tayin kiti ile yapılmıştır. Kısaca 0, 200, 400, 600, 800, 1000 µg.mL⁻¹ derişimlerinde standart sığır albumin örnekleri ile standart grafik oluşturulmuştur. Derişimi bilinmeyen örneğin absorbansı, çizilen standart derişime karşı absorbans grafiğinde interpolate edilerek içerisindeki protein miktarı belirlenmiştir.

2.4.4. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE Laemmli metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). Bu amaçla; % 10 ayırma jeli ve % 5 derişimde yükleme jeli hazırlanmış ve analiz edilecek örnekler yükleme jelinde 16 mA akım altında, ayırma jelinden 30 mA akım altında yürütülmüştür. Arkasından standart gümüş boyama prosedürü kullanılarak jelin boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.4.5. Elektroforetik hareketlilik değişimi analizi

AGO2 proteinin elektroforetik değişimi analizi literatürdeki prosedüre uygun olarak yapılmıştır (Kristie & Roizman, 1986). Bunun için % 5 derişiminde doğal poliakrilamid jel önceden hazırlanmıştır. Bu amaçla; saflaştırılan numune önceden her 500 ng ekstrakt içerisinde 200 ng monoklonal anti-AGO2 ve kontrol grubu olarak yine her 500 ng ekstrakt için 200 ng monoklonal anti-insülin antikoru bağlama tamponu (50 mM tris-HCl pH 7.5, % 0,1 triton-X 100, % 10 gliserol, 10 mM DTT, 5 mM EDTA) içerisinde oda koşullarında 1 saat süre ile etkileştirilmiştir. Etkileştirilen örnekler, ticari ssdna ve etkileştirilmemiş saflaştırılan numune jel elektroforez tankına yüklenip elektroforez işlemi $10V.cm^{-1}$ koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Jel daha sonra standart gümüş boyama prosedürü kullanılarak boyanmıştır.

2.5. AGO2 Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonları

AGO2 nanopartiküllerin sentezi ANADOLUCA metoduna göre yapılmıştır. Sentezlenen nanopartikülleri karakterize etmek için ortalama boyutları, yüzey morfolojileri ve de yüzey yükleri belirlenmiştir. Son aşamada ise sentezlenen AGO2 partiküllerin miRNA bağlanma etkinlikleri ticari miRNA kullanılarak belirlenmiştir.

2.5.1. Nano-AGO2 partiküllerin hazırlanması

Emülsiyon ortamı oluşturmak üzere 0,5 gram PVA (125.000 Da) daha önceden +4 °C' de soğutulan 45 mL deiyonize su içerisinde homojenize edilmiş ve akabinde ısıtıcılı karıştırıcıda 90-100 °C' de sıcaklıkta çözünmesi sağlanmıştır. Saflaştırılan örneğin 2000 ppm'lik 3mL hacmindeki çözeltisi deiyonize su içerisinde hazırlanmış ve daha önceden DMSO içerisinde dispers edilen 18 µL hacminde bis(2-2'-bipiridil)(MATrp)₂-Rutenyum (II)ile 30 dakika boyunca 150 rpm devirde karıştırılarak etkileştirilmiştir. Bu karışım, daha sonra daha önceden hazırlanan emülsiyon ortamına ilave edilmiş ve kısa bir süre karıştırıldıktan sonra karışımın üzerine 10.000 ppm derişiminde hazırlanmış APS' den 100 µL eklenerek polimerizasyon başlatılıp 150 rpm devirde, oda koşullarında ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinden sonra karışım 12.000 rpm devirde 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. Pellet aynı çözücü içerisinde süspanse edilerek tekrar 12.000 rpm devirde 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi 2 defa tekrar edilmiştir.

2.5.2. Nano-AGO2 zeta boyut ve zeta potansiyeli analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin ortalama boyutları, partikül boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri Zeta-Sizer ile belirlenmiştir. Zeta-Sizer ile analiz yapılmadan önce nanopartikül numunesi ultrasonik banyo içerisinde dispers edilmiş ve numune gözle bakıldığında hafif bulanık olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir.

2.5.3. Nano-AGO2 elektron mikroskobu analizi

Nano-AGO2 partiküllerin morfolojileri Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu ile incelendi. Numune analiz edilmeden önce 40 °C’ de etüv içerisinde bir gece boyunca kurutulmuştur. Toz haline getirilen numune iletken bir karbon şerit vasıtasıyla mikroskop tutucu üzerine sabitlenerek hazırlanmıştır.

2.5.4. Nano-AGO2 partiküllerin total protein miktarı tayini

Nano-AGO2 kopolimer partiküllerin protein miktarı Bradford metoduna (Bradford, 1976) göre ticari Bradford reaktifi (Sigma) ile belirlenmiştir. Kısaca 0, 1-1,4 mg.mL⁻¹ derişimlerinde standart BSA numuneleri hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA numuneleri ve derişimi bilinmeyen numuneden 5 µL hacimde ve Bradford reaktifinden 250 µL hacimde örneklerin üzerine eklenmiştir. Numuneler yaklaşık 2 dakika süre ile oda sıcaklığında yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübe edilip akabinde oda sıcaklığında 5 dakika çalkalamadan inkübe edildikten sonra 595 nm dalga boyunda Synergy H1 hybrid mikropilaka okuyucu ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Bilinmeyen numunenin protein miktarı, ölçülen absorbans standart BSA grafiğinde interpole edilerek belirlenmiştir.

2.5.5. Nano-AGO2 partiküllerin miRNA bağlama analizi

Toplamda 240 ng nano-AGO2, artan derişimlerde (0-3,3 µM) ticari miR-335 ile bağlama tamponu (30 mM tris-HCl pH 7.5, 0, 10 mgmL⁻¹ BSA, 5 mM DTT, 2 mM MgCl₂) içerisinde her biri 10 µL hacminde karışımlar halinde hazırlanmış ve oda koşullarında 1 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. EMSA analizi %3,5 agaroz jel kullanılarak yapılmıştır. Agaroz jel 25 mL 0,5x TB (Tris-Borat) tamponu içerisinde hazırlanmış ve agaroz jel 25 Vcm⁻¹ koşullarında 30 dakika süre ile yürütülmüştür. Hemen ardından jel daha önceden 0,5x TB tamponu ile seyreltilerek hazırlanmış SYBR green (10 000 x) floresans boya içerisinde 40 dakika süre ile oda koşullarında hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra jel görüntüleme cihazı ile 254 nm UV ışını altında

fotoğraf çekilmiştir. Jeldeki bantların densitometrik analizi İmageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır (http-1). Ayrışma sabiti (K_d), İmageJ ile hesaplanarak elde edilen veriler Graphpad Prism programında bir spesifik bağlanma bölgesi formülü kullanılarak hesaplanmıştır (http-2).

3. BULGULAR

3.1. Kriyojel Karakterizasyonu

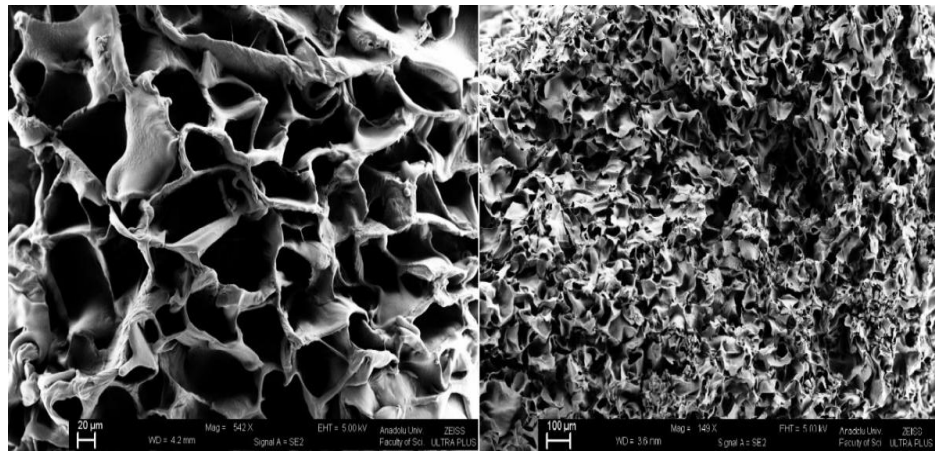
Sentezi Bölüm 2.2’de anlatılan poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojelinin karakterizasyonları Bölüm 2.3. de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Su tutma kapasitesi testi

Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojelin su tutma kapasitesi eşitlik 2.1’ e göre hesaplanmış ve 9,63 g H₂O/g kriyojel olarak bulundu. Bu değer, 1 gram ağırlığındaki kriyojelin 9,63 gram su tutabildiğini göstermekle birlikte yüksek bir su tutma kapasitesini ifade etmektedir. Poli(HEMA) kriyojelinin su tutma kapasitesi de 14,53 g H₂O/ g kriyojel olarak hesaplanmıştır. Beklenildiği üzere, poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojelinin su tutma kapasitesi değeri yapı içerisinde bulunan antikör ve çapraz bağlayıcı içerisindeki hidrofobik gruplardan dolayı daha az bulunmuştur.

3.1.2. SEM ile yüzey morfolojisinin incelenmesi

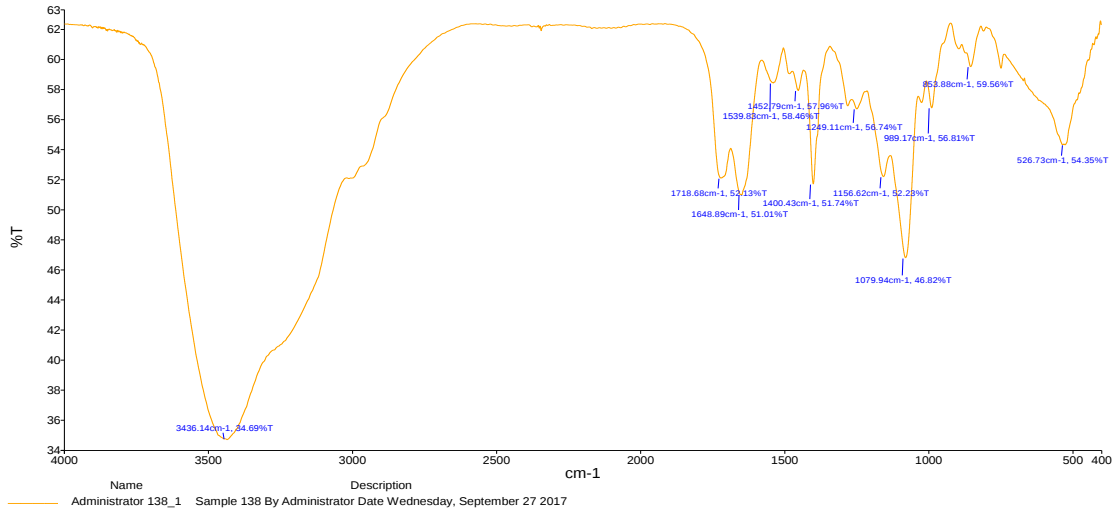
Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojelin yüzey morfolojisi Şekil 3.1’de gösterilmiştir. 20 µm den büyük gözenek boyutlarına sahip ve gözenekleri birbirine bağlı bir kriyojel, saflaştırma amacı ile kullanılacak numunelerin kriyojel boyunca maksimum oranda etkileşmesiyle, iyi bir kromatografik ayırım için zemin hazırlayacak niteliktedir.



Şekil 3.1. Poli (HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeline ait SEM görüntüsü

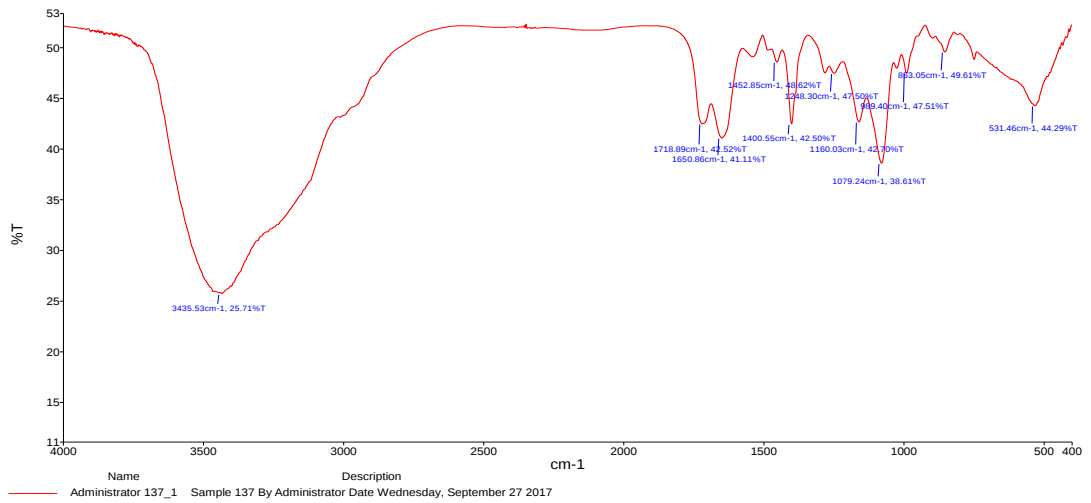
3.1.3. FT-IR analizi

Aşağıda Şekil 3.2’ de poli(HEMA-ko- anti-AGO2) kriyojeline ait FTIR spektrumu görülmektedir. Bu spektrumda poli(HEMA)’ da yer alan fonksiyonel gruplara özgü bantlar göze çarpmaktadır. Bunlar; 3400 cm^{-1} civarında (-OH gerilme), 1720 cm^{-1} civarında (C=O gerilme), 2900 cm^{-1} civarında (CH_2 gerilme), 1248 – 850 cm^{-1} aralığında(C-O-C ve C-O gerilme frekansları) bulunan bantlardır.



Şekil 3.2. Poli (HEMA-ko-anti-AGO2) kriyojeline ait FT-IR spektrumu

Aşağıda Şekil 3.3’ de poli(HEMA) kriyojeline ait FTIR spektrumu görülmektedir. Bu spektrum ile Şekil 3.2’ deki spektrum %T (%geçirgenlik) değerleri hariç birbirine benzerlik göstermektedir.



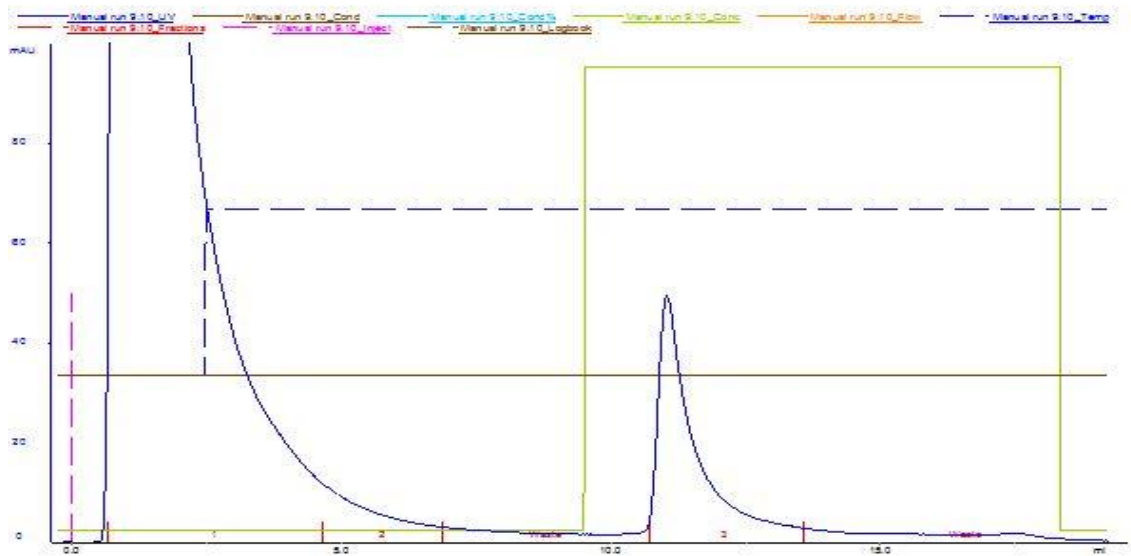
Şekil 3.3. Poli (HEMA) kriyojeline ait FT-IR spektrumu

3.2. AGO2 Saflaştırılması

AGO2 proteinin saflaştırılması marketten temin edilen taze dondurulmuş sığır karaciğerinden ve afinite kromatografisi ile tek adımda, Bölüm 2.4’ de anlatıldığı gibi ve karaciğer dokusundan sitoplazmik ekstrakt hazırlanması ise Bölüm 2.4.1’ de ifade edildiği gibi yapılmıştır.

3.2.1. Poli(HEMA-ko-anti-AGO2) afinite kromatografisi

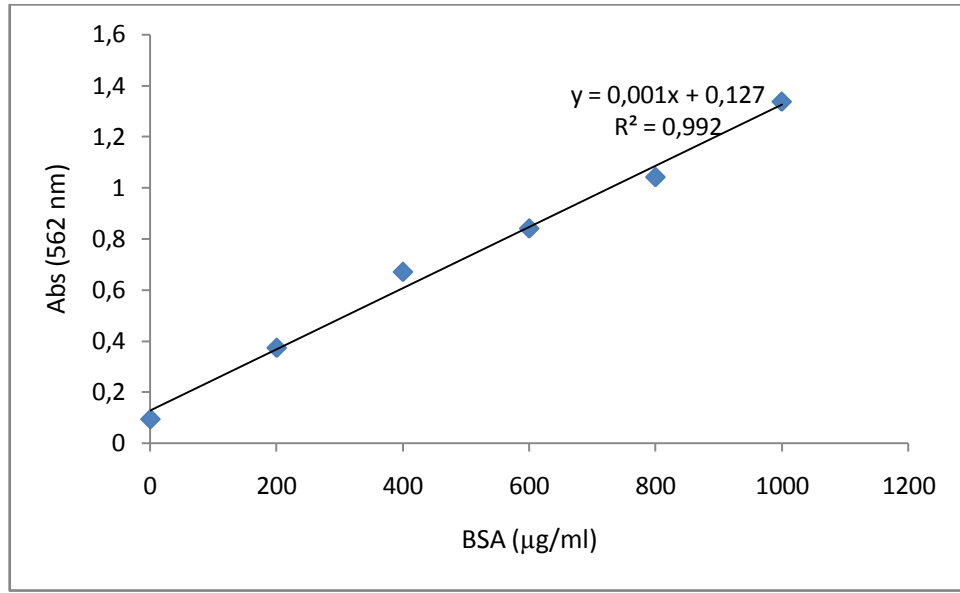
Şekil 3.3’ de AGO2 proteinin FPLC ile saflaştırılmasına ait kromatogram görülmektedir. Kriyojel kolona bağlanan numuneler 20 mM tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl tamponu ile ayrılmış ve ayrılan türler fraksiyon toplayıcı yardımı ile toplanmıştır. Şekildeki kromatogram göz önüne alındığında bağlanmayan türlerin absorbansının sıfırlandığı noktadan itibaren %100 gradiyent elüsyonu uygulanmıştır. Elüsyon tamponunun uygulanmasından kısa bir süre sonra beklenildiği üzere yaklaşık 50 mAU büyüklüğünde keskin bir elüsyon piki gözlemlenmiştir. Analiz 0,3 ml.dak⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir ve alıkonma hacmi yaklaşık olarak 10 mL olarak gözlemlenmiştir. Art arda yapılan beş analiz sonucu benzer kromatogramlar elde edilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen fraksiyonlar, içeriğindeki tuzu gidermek için diyaliz; çözücüyü uzaklaştırmak için liyofilizasyon işlemlerinden geçirildikten sonra saflık analizleri ve nano ölçekli kopolimer partikül sentezinde kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Poli (HEMA-ko-anti-Ago2) kriyojeline ait kromatogram

3.2.2. Total protein tayini

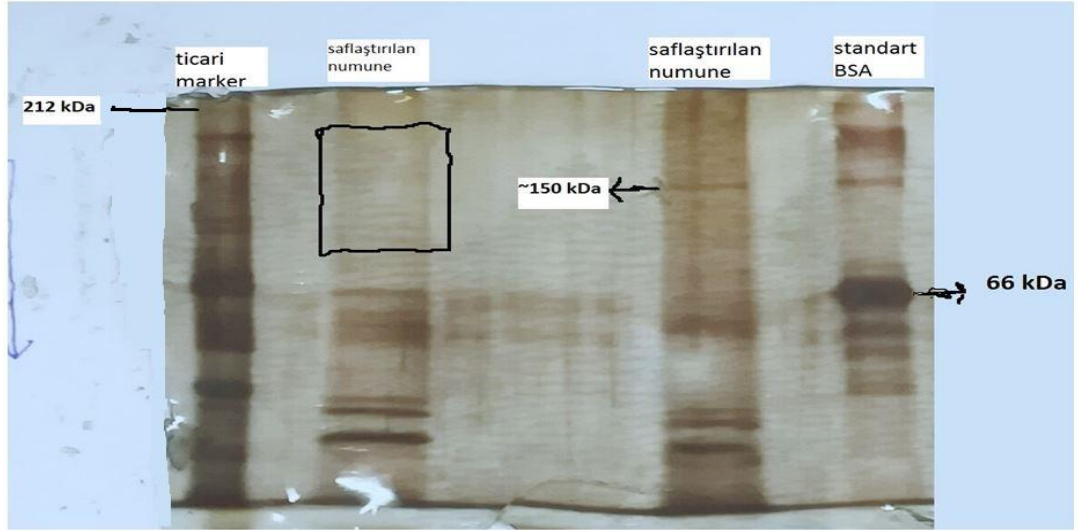
Toplam protein miktarı BCA metoduna göre ticari BCA kiti kullanılarak şekilde görülen BSA standart grafik yardımı ile hesaplanmıştır. Buradan $R^2=0,992$ olarak bulunmuş olup, Şekil 3.4’ deki grafikte görülen denklemde ölçülen absorbans değeri yerine konularak sığır karaciğeri sitoplazma ekstraktının toplam protein miktarı 858,7 ppm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Bovine serum albumin standart grafiği

3.2.3. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

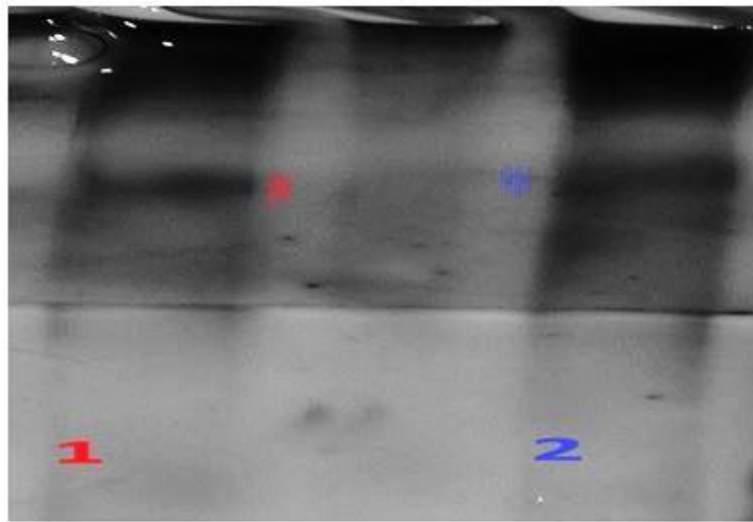
Saflaştırılan numune, ticari bir belirteç ve standart BSA numuneleri denature jel elektroforezi ile moleküler ağırlıkları farklılığı esasına göre ayrılmıştır. Şekil 3.5’ deki jel görüntüsünden anlaşılabacağı üzere saflaştırılan numune farklı moleküler ağırlıkta farklı tür proteinlerden oluşmaktadır. Monoklonal anti AGO2 çapraz bağlı bir kolon ile saflaştırma yapıldığı düşünüldüğünde saflaştırılan numune içerisinde serbest AGO2 proteinin yanı sıra AGO2’ nin etkileşim içerisinde olduğu bir takım kompleks yapılara ilişkin bantların da olduğu düşünülmektedir (Zhang et al., 2015). Ayrıca kolona spesifik olarak bağlanmayan türlerin de numune içerisinde yer alması da olasıdır.



Şekil 3.6. SDS-PAGE analizi ile örneklerin görüntülenmesi

3.2.4. Elektroforetik hareketlilik kayma analizi

Safaştırılan numunenin içerisinde AGO2 proteinin olup olmadığını tayin etmek için, safaştırılan numune (1) ve daha önceden ticari monoklonal anti- AGO2 ile etkileştirilmiş safaştırılan numune (2) doğal poliakrilamid jel elektroforezi sisteminde yukarıdan aşağıya doğru yürütülmüştür. Şekil 3.6' dan görüleceği üzere monoklonal antikor ile etkileştirilen örnek artan moleküler ağırlığı nedeniyle daha yavaş yürümüştür. Bu da safaştırılan örneğin içerisinde AGO2 proteininin bulunduğunu göstermektedir.



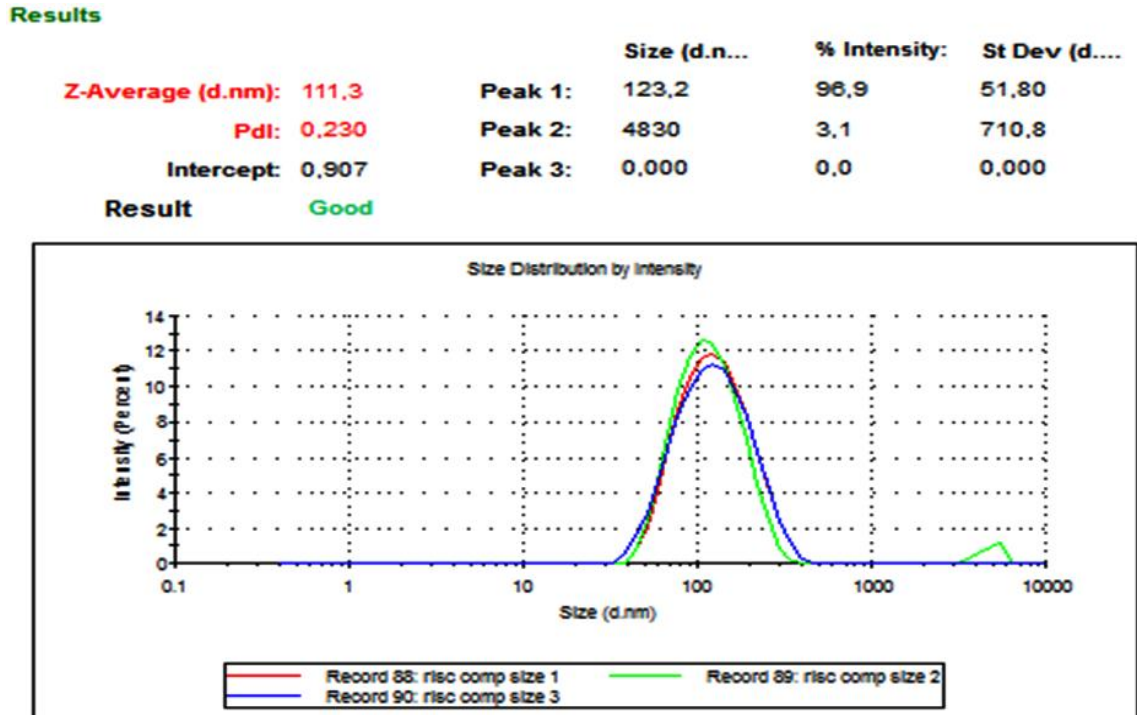
Şekil 3.7. EMSA ile örneklerin görüntülenmesi

3.3. AGO2 Nanopartiküllerinin Karakterizasyonları

Bölüm 2.5.1. de anlatıldığı gibi sentezlenen AGO2 nanopartiküllerinin karakterizasyonları aşağıda verilmiştir.

3.3.1. Nano-AGO2 zeta boyut ve zeta potansiyeli analizi

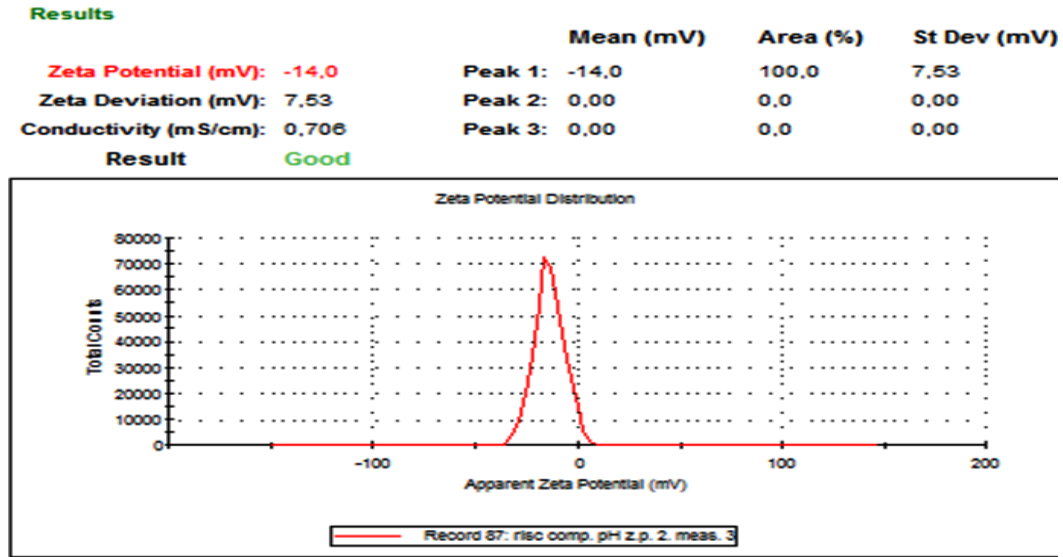
Nanopartiküllerin ortalama boyutu dinamik ışık saçılması ile ölçülmüş ve Şekil 3.7' den de görüleceği üzere $123,2 \pm 51,80$ olarak bulunmuştur. Bulunan bu değer yaklaşık olarak 45 farklı ölçümün ortalamasını yansıtmaktadır. Polidispersite indeksi 0,230 olarak bulunmuştur. Bu değer, numunenin orta derecede polidispers olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.8. Nano –AGO2 partiküllerin boyut dağılımları

Nanopartiküllerin fiziksel olarak karakterize edilmesindeki bir diğer önemli parametre de zeta potansiyelidir. Zeta potansiyeli bir katının yüzeyi ve o katının sıvısı arasında gelişen yük olarak tanımlanır. Bu nedenle kolloidal partiküllerin yüzey yükleri ve stabilitesi ile ilgili önemli bilgiler vermektedir (Article, 1993). Şekil 3.8'deki zeta potansiyeli grafiği incelendiğinde zeta potansiyelinin -14 mV olduğu görülmektedir. Bu

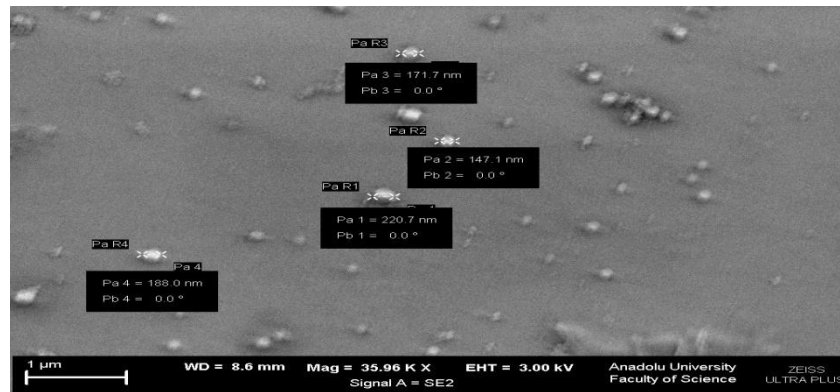
sentezlenen partiküllerin negatif yüklü olduklarını ve de orta derecede bir stabiliteye sahip olduklarını göstermektedir.



Şekil 3.9. Nano-AGO2 partiküllerin zeta potansiyeli dağılımları

3.3.2. Nano-AGO2 elektron mikroskobu analizi

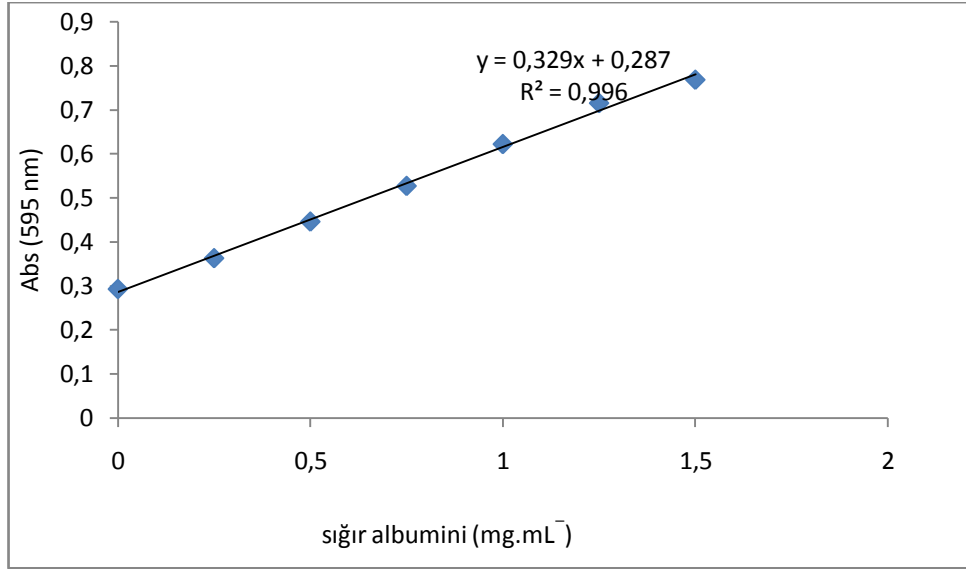
Şekil 3.9' daki nanopartiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen nanopartiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca partiküllerin boyutlarının heterojen bir dağılım gösterdiği düşünüldüğünde SEM analizinden elde edilen sonuçlar ağırlıklı olarak 100-220 nm boyutlarında partiküllerin varlığını göstermektedir ve bu sonuçlar dinamik ışık saçılması analizi ile elde edilen sonuçlar ile uyum göstermiştir.



Şekil 3.10. Nano – AGO2 partiküllerin SEM görüntüleri

3.3.3. Nano-AGO2 partiküllerin total protein miktarı tayini

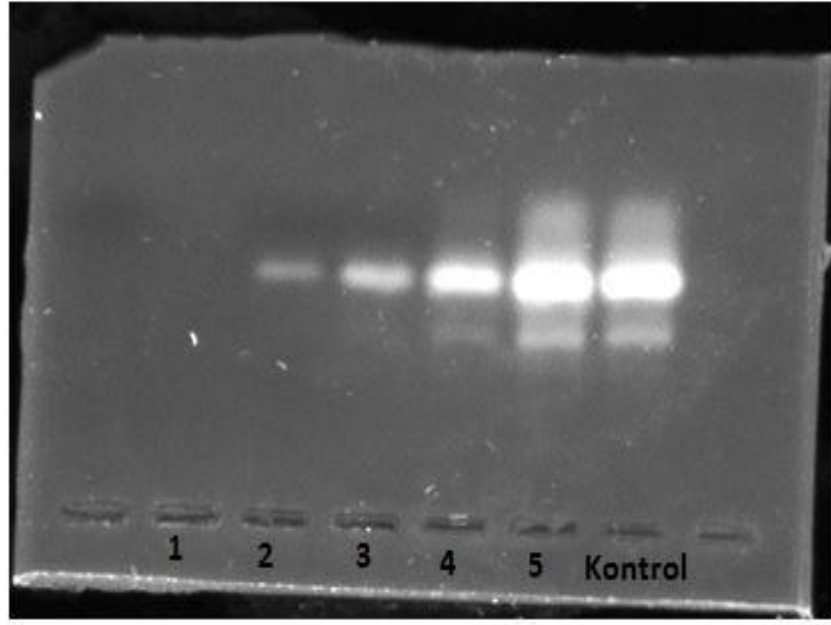
Bağlama çalışmasında kullanılacak Nano-AGO2 partiküllerin toplam protein miktarı Bradford metoduna göre ticari Bradford reaktifi kullanılarak Şekil 3.10’ da görülen BSA standart grafiği yardımı ile hesaplanmıştır. Çizilen standart grafiğin $R^2=0,996$ olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.11. Sığır serum albumini standart grafiği

3.3.4. Nano-AGO2 mirna bağlama analizi

Ticari miR- 335’ in nano AGO2 partikülleri ile bağlama afinitesini belirlemek için artan derişimlerde ticari miRNA -335 sabit miktarda nano AGO2 partikülü ile etkileştirilmiştir. Numuneler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Şekil 3.11).



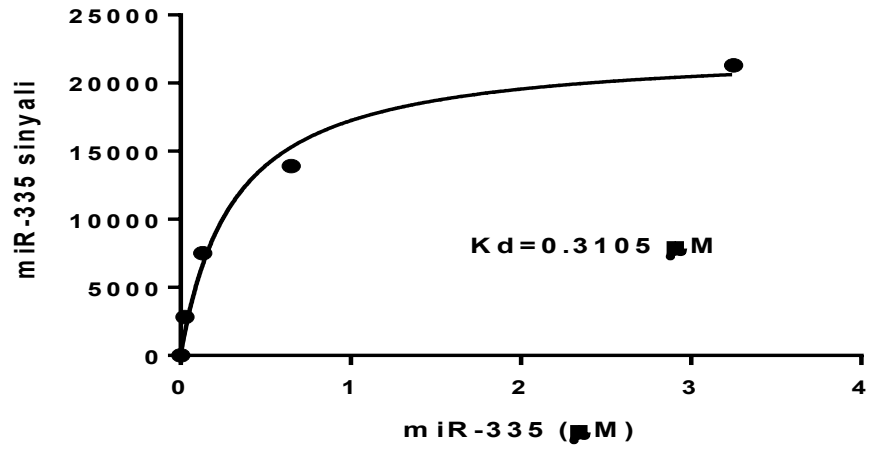
Şekil 3.12. Nano- AGO2 – miR-335 bağlama analizi

Jel üzerinde SYBR Green ile 254 nm dalga boylu ışın ile görüntülenen bandların alanı ImageJ yazılımı ile belirlenmiş ve hesaplanan band alanlarına ilişkin sayısal veriler aşağıdaki tablo 3.1’ de verilmiştir.Tablodaki veriler incelendiğinde artan miR-335 molekülünün derişimi ile bant alanlarının beklenildiği gibi artış gösterdiği ve belirli bir derişimden sonra bu artışın miktar olarak azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 3.1. miR- 335 derişimleri ve band alanları

Sıra	Derişim (μM)	Band alanı (rastgele birim)
1	0	0
2	0,026	2823,104
3	0,13	7507,874
4	0,65	13901,451
5	3,25	21297,563

Son olarak da ayrışma sabiti (K_d) Graphpad Prism aracılığı ile 0.3105 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.12).Elde edilen bu K_d değeri sentezlenen AGO2 partiküllerinin ticari miR-335 molekülüne yüksek bir afinite ile bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.13. Nano- AGO2 ile miR-335 arasındaki bağlanma izotermi

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, AGO2 proteininin saflaştırılması amacı ile poli(HEMA-ko-anti-AGO2) immunoafinite kromatografisi materyali ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir (“ANADOLUCA Patent.pdf,” n.d.). Sentezlenen bu kromatografik materyalin karakterizasyonu SEM, FTIR ve su tutma kapasitesi testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerden elde edilen bulgular literatürdeki benzer çalışmaların bulguları ile uyumluluk göstermektedir (Armutcu vd., 2014; Keçili vd., 2018; Uygun vd., 2014).

Post transkripsiyonel gen susturma işleminde rol oynayan RISC kompleksi bir proteinler topluluğudur ve bu topluluğun merkezinde AGO2 proteini bulunmaktadır. Bu çalışmada immunoafinite kromatografisi materyalinin ligandı olarak kullanılan anti-AGO2 (11A9) antikoru hem doku hem de hücrelerden AGO2 komplekslerinin etkin bir şekilde izole edilebilmesine olanak tanımaktadır (Rudel, Flatley, Weinmann, Kremmer, & Meister, 2008). Elde edilen bulgular sentezlenen bu yeni afinite kromatografisi kolon materyalinin AGO2 proteininin tek adımda saflaştırılması için kullanılabileceğini göstermektedir.

İmmünoafinite kromatografi sonucu toplanan numunelerin saflık analizi, tuz giderme ve deriştirme işlemlerinin ardından SDS-PAGE ile yapılmıştır. Şekil 3.5’ deki jel görüntüsü, band profilinin daha önce yapılan benzer çalışmalar (Roosevelt, 2000; Zhang et al., 2015) ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir. Saflaştırılan numune içerisinde AGO2 proteinin net olarak tanımlanması salt SDS-PAGE ile mümkün olmamaktadır. Numune içerisinde yer alan AGO2, EMSA ile, saflaştırılan numune ile daha önceden monoklonal anti-AGO2 ile etkileştirilen numune arasındaki rölatif göç farkından doğal poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile anlaşılmıştır.

Nano-AGO2 partiküllerin ortalama boyutlarını belirlemek için SEM ve zeta boyut analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, her iki analizden elde edilen partikül boyutu sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görülebilmektedir.

Nano AGO2 partiküllerin ticari miRNA- 335 ile yapılan bağlama çalışmasının sonucunda daha önce ifade edilen deneysel koşullarda bağlama afinitesi prism programı ile 0,3105 μ M olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, rutenyum bazlı amino asit monomerin çapraz bağlanması ile elde edilen AGO2 nanopartiküllerin ticari miR- 335’ e yüksek bir afinite ile bağlandığını göstermektedir. Elde edilen bu K_d değeri literatürde yer alan

serbest formdaki AGO2 proteinin miRNA bağlama afinitesine yönelik elde edilen K_d değerlerinden daha yüksektir (Lima et al., 2009; Rivas et al., 2005; Tan et al., 2009).

Görüldüğü kadarı ile AGO2 polimer konjugatlarının miRNA bağlama afinitesini belirlemeye yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu çalışmada elde edilen K_d sonucu literatür ile mukayese edilememektedir. Bu anlamda, yapılan çalışma özgündür.

Biyolojik sıvılar içerisindeki ekstraselüler miRNA'ların çoğu AGO2 proteinine bağlı olarak bulunmaktadır. Bu durum nükleaz enziminin yoğun olan bu sıvılarda bulunan miRNA'nın stabilitesini korumasını açıklar niteliktedir (Arroyo et al., 2011). Ayrıca; daha önce yapılan çalışmalar (Ferreira et al., 2014; Prud'homme, Glinka, Lichner, & Yousef, 2016) AGO2 proteininin alternatif bir miRNA tabanlı ilaç dağıtım sistemi olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

AGO2 proteini hem miRNA hem de siRNA bağlayıcı bir proteindir. siRNA'lar, birçok hastalıkta ilaç ile hedeflenemeyen genlerin seçici olarak hedeflenmesine yönelik büyük bir potansiyel taşımaktadır. RNAi *in vivo* etkinliği AGO2 bağlı siRNA'ların miktarı ile doğru orantılıdır (Ferreira et al., 2014; Prud'homme et al., 2016).

ANADOLUCA metodu, ılıman koşullarda pH ve sıcaklıktan bağımsız olarak protein polimer konjugatlarının sentezini mümkün kılması, destek materyallerinin aktive edilmesinde yaygın olarak kullanılan siyanojen bromür gibi tehlikeli kimyasalların kullanılmasını gerektirmemesi gibi önemli özelliklere sahiptir. Bu metoda göre sentezlenen nano AGO2 partikülleri, sahip oldukları yüksek miRNA bağlama etkinlikleri göz önünde bulundurulduğunda AGO2 proteinin konformasyonu ve fonksiyonunun korunduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Bu çalışmada; rutenyum bazlı amino asit monomerlerin AGO2 protein ile çapraz bağlanması esasına dayanan, fotosensitif mikroemulsiyon polimerizasyonu yöntemine göre sentezlenen nano AGO2 partiküller, sahip oldukları nanomolar düzeydeki miRNA bağlama afiniteleri ile yeni bir ilaç salınım sistemi, diyagnostik ve teranostik gibi alanlarda potansiyeli olan bir biyomateriyaldir. Ancak; bunun daha net bir şekilde anlaşılması için daha ileri düzeyde çalışmalara ve daha detaylı verilere ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Armutcu, C., Bereli, N., Bayram, E., Uzun, L., Say, R., & Denizli, A. (2014). Aspartic acid incorporated monolithic columns for affinity glycoprotein purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.008>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5003–5008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Article, R. (1993). PHARMACEUTICAL, 82(11).
- Bailon, P., & Berthold, W. (1998). Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1(8), 352–356.
[https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(98\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(98)00086-8)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cerutti, H., & Casas-mollano, J. A. (2008). NIH Public Access, 50(2), 81–99.
<https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x>
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2740–2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>
- Drexler, K. E. (1981). Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5275–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5275>
- Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(5), 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrd1088>
- Ferreira, R., Santos, T., Amar, A., Gong, A., Chen, T. C., Tahara, S. M., ... Hofman, F. M. (2014). Argonaute-2 promotes miR-18a entry in human brain endothelial cells. *Journal of the American Heart Association*, 3(3).

- <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000968>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
<https://doi.org/10.1038/35888>
- Förstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2009). NIH Public Access, 130(2), 287–297.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.056.Drosophila>
- Gilbert, H. F., & Ph, D. (2000). *BASIC CONCEPTS IN BIOCHEMISTRY A STUDENT â€™S SURVIVAL GUIDE Second Edition*. New York (Vol. 38).
[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(92\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0307-4412(92)90079-2)
- Harkins, W. D. (1947). A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization 1. *Journal of the American Chemical Society*, 69(6), 1428–1444.
<https://doi.org/10.1021/ja01198a053>
- HOAR, T. P., & SCHULMAN, J. H. (1943). Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. *Nature*, 152(3847), 102–103.
<https://doi.org/10.1038/152102a0>
- Hoffman, A. S., & Stayton, P. S. (2004). Bioconjugates of smart polymers and proteins: Synthesis and applications. *Macromolecular Symposia*, 207, 139–151.
<https://doi.org/10.1002/masy.200450314>
- Hogan, D. J., Vincent, T. M., Fish, S., Marcusson, E. G., Bhat, B., Nelson Chau, B., & Zisoulis, D. G. (2014). Anti-miRs competitively inhibit microRNAs in argonaute complexes. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100951>
- Höck, J., Weinmann, L., Ender, C., Rüdel, S., Kremmer, E., Raabe, M., ... Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Reports*, 8(11), 1052–1060.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401088>
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22–32.
<https://doi.org/10.1038/nrm2321>
- Keçili, R., Çelikoğlu, U., Mil, S., Ersöz, A., & Say, R. (2018). Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase.

- Adsorption Science & Technology*, 26361741876063.
<https://doi.org/10.1177/0263617418760637>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kristie, T. M., & Roizman, B. (1986). Alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes and of selected other viral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(May), 3218–3222. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3218>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lehn, J. M. (2009). Towards complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *European Review*, 17(2), 263–280.
<https://doi.org/10.1017/S1062798709000805>
- Lima, W. F., Wu, H., Nichols, J. G., Sun, H., Murray, H. M., & Crooke, S. T. (2009). Binding and cleavage specificities of human Argonaute 2. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 26017–26028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010835>
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'??-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(6), 576–577. <https://doi.org/10.1038/nsmb777>
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., ... Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Lutz, J. F., & Börner, H. G. (2008). Modern trends in polymer bioconjugates design. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(1), 1–39.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.07.005>
- MacRae, N. T. S. and I. J. (2013). The Crystal Structure of Human Argonaute2, 336(6084), 1037–1040. <https://doi.org/10.1126/science.1221551>.The
- Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Lichner, Z., & Yousef, G. M. (2016). Neuropilin-1 is a receptor for extracellular miRNA and AGO2/miRNA complexes and mediates the

- internalization of miRNAs that modulate cell function. *Oncotarget*, 7(42), 68057–68071. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10929>
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Riess, G., Nervo, J., & Rogez, D. (1977). Emulsifying properties, of block copolymers. Oil- water emulsions and microemulsions. *Polymer Engineering & Science*, 17(8), 634–638. <https://doi.org/10.1002/pen.760170822>
- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(4), 340–349. <https://doi.org/10.1038/nsmb918>
- Roosevelt, F. D. (2000). Chapter 11, 45(November), 177–182. <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3>
- Rudel, S., Flatley, A., Weinmann, L., Kremmer, E., & Meister, G. (2008). A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *Rna*, 14(6), 1244–1253. <https://doi.org/10.1261/rna.973808>
- Say, R. (2009) Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation application in life sciences and biotechnology, US Patent 20110311505A1
- Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişiman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., & Ersöz, A. (2011). A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process Biochemistry*, 46(8), 1688–1692. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.011>
- Sen, G. L., & Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology*, 7(6), 633–636. <https://doi.org/10.1038/ncb1265>
- Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353–4364. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00339-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00339-9)
- Shin, W. K., Cho, J., Kannan, A. G., Lee, Y. S., & Kim, D. W. (2016). Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO₂ Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries. *Scientific Reports*, 6(March), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep26332>

- Smith, W. V., & Ewart, R. H. (1948). Kinetics of Emulsion Polymerization Kinetics of Emulsion Polymerization. *The Journal of Chemical Physics*, 16(4), 592.
<https://doi.org/10.1063/1.1746951>
- Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., ... Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural Biology*, 10(12), 1026–1032. <https://doi.org/10.1038/nsb1016>
- Steiner, F. A., Hoogstrate, S. W., Okihara, K. L., Thijssen, K. L., Ketting, R. F., Plasterk, R. H. A., & Sijen, T. (2007). Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(10), 927–933. <https://doi.org/10.1038/nsmb1308>
- Tan, G. S., Garchow, B. G., Liu, X., Yeung, J., Morris IV, J. P., Cuellar, T. L., ... Kiriakidou, M. (2009). Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Research*, 37(22), 7533–7545.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp812>
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., & Zamore, P. D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306(5700), 1377–1380.
<https://doi.org/10.1126/science.1102755>
- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: Machines for RNAi. *Genes and Development*, 19(5), 517–529. <https://doi.org/10.1101/gad.1284105>
- Uygun, M., Şenay, R. H., Avcıbaşı, N., & Akgöl, S. (2014). Poly(HEMA-co-NBMI) monolithic cryogel columns for IgG adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1574–1584. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0624-1>
- Zhang, H., Sheng, C., Yin, Y., Wen, S., Yang, G., Cheng, Z., & Zhu, Q. (2015). PABPC1 interacts with AGO2 and is responsible for the microRNA mediated gene silencing in high grade hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 367(1), 49–57.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.010>

http-1: <https://imagej.nih.gov>

(Erişim tarihi: 01.05.2018)

http-2: <https://www.graphpad.com>

(Erişim tarihi: 01.05.2018)