

**NÜKLEİK ASİT BAZLARI İÇEREN KRIYOJELLERİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOKROMATOGRFİDE ADSORBENT OLARAK
KULLANIMI**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NUCLEIC ACID
BASES INCORPORATED CRYOGELS AND THEIR USE AS
ADSORBENT FOR BIOCHROMATOGRAPHY**

KAZIM KÖSE

DOÇ. DR. LOKMAN UZUN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

KAZIM KÖSE'nin hazırladığı “**Nükleik Asit Bazları İçeren Kriyojellerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Biyokromatografide Adsorbent Olarak Kullanımı**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli

Başkan

.....

Doç. Dr. Lokman Uzun

Danışman

.....

Prof. Dr. Serap Şenel

Üye

.....

Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Bora Garipcan

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21/08/2014

Kazım Köse

ÖZET

NÜKLEİK ASİT BAZLARI İÇEREN KRİYOJELLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve BİYOKROMATOĞRAFİDE ADSORBENT OLARAK KULLANIMI

Kazım KÖSE

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Lokman UZUN

Ağustos 2014, 95 sayfa

Kriyojel teknolojisi günümüzde farklı alanlarda etkili olan birçok uygulamaya sahiptir. Bu tez çalışmasında kodlama, kod çözme, düzenleme ve gen ifadesinde çok önemli role sahip biyolojik moleküllerden biri olan RNA'nın yüksek kapasite ve düşük maliyetle saflaştırılabilmesi için mevcut yöntemlere alternatif olarak adenin ve guanin takılı kriyojellerin geliştirilmesi ve bu adsorbanın RNA saflaştırma performansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Adsorban olarak adenin ve guanin içeren poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-adenin) [poli(HEMA-MAD)] ve poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-guanin) [poli(HEMA-MAG)] kriyojeller kullanılmıştır. Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojeller yarı donmuş çözelti ortamında, HEMA ile MAD/MAG monomerlerin kopolimerizasyonu ile üretilmiştir. Kriyojeller Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskop (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) yöntemi, termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme testi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Kullanılan poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojellerin şişme oranları sırasıyla %496 ve %510 olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon deneyleri, farklı ortam koşullarında (pH, başlangıç RNA derişimi, sıcaklık ve etkileşim süresi) kesikli sistemde incelenmiştir. Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG)

kriyojellerin maksimum RNA adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla 11.86 ve 11.94 mg/g olarak bulunmuştur. 5 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir düşüş gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler

RNA Saflaştırılması, RNA Kromatografisi, RNA, Kriyojeller.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NUCLEIC ACID BASES INCORPORATED CRYOGELS AND THEIR USE AS ADSORBENT FOR BIOCHROMATOGRAPHY

Kazım KÖSE

Philosophy of Doctorate, Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lokman UZUN

August 2014, 95 pages

Cryogel technology has many diverse applications in many different areas nowadays, effectively. In this study, development of adenine and guanine incorporated cryogels as an alternative to conventional techniques for costly effective high capacity purification of large biomolecule RNA having many important roles as encoding, decoding, transcription and translation, and gene expression and commonly found within every living things, and additively determination of purification performance of this adsorbent(s) was aimed. Adenine and guanine incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-adenine) [poly(HEMA-MAD)] and poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-guanine) [poly(HEMA-MAG)] cryogels were used. Poly(HEMA-MAD) and poly(HEMA-MAG) cryogels are obtained in a partially frozen aqueous medium by copolymerization of monomers MAD and MAG with HEMA. Cryogels were characterized via Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR),

scanning electron microscopy (SEM), the Brunauer - Emmett - Teller (BET) method, thermo gravimetric analysis (TGA), and swelling test methods. Swelling ratios of poly(HEMA-MAD), and poly(HEMA-MAG) cryogels used were found as 510% and 496%, respectively. Adsorption experiments were performed for different conditions (pH, initial RNA concentration, temperature and interaction time) via batch system. Maximum RNA adsorption capacities of poly(HEMA-MAD) and poly(HEMA-MAG) cryogels were found as 11.86 and 11.94 mg/g, respectively. At the end of the 5 adsorption-desorption cycle, there was no significant decrease observed in adsorption capacity.

Key Words

RNA Purification, RNA Chromatography, RNA, Cryogels.

TEŞEKKÜR

BIOREG'in kurucusu, Türkiye'de ve Dünya'da Biyokimya konusunda ciddi başarılarla imza atmış, değerli hocam ve örnek aldığım insan

Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

ve

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta yararlanmama olanak sağlayan değerli hocam,

Danışmanım Doç. Dr. Lokman Uzun'a;

tezimin yürütülmesindeki her türlü desteklerinden ve dostane yaklaşımlarından ötürü derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sadece akademik anlamda değil, hayata dair elinden gelen hiçbir yardımı esirgemeyen, laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, sadece bana değil zorda kalan her insana ulaşan, ulaşmaya çalışan Hocam ve Abim

Prof. Dr. Dursun Ali Köse'ye

saygı, sevgi ve minnettarlığımı sunarım.

Yardıma ihtiyacım olduğu zamanlarda yardımına koşan ve özveri ve emek konusunda hiçbir şeyi esirgemeyen iş arkadaşlarım

Emre Avcı ve Gülçin Alp Avcı'ya,

Yardıma ile laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran, Hitit Üniversitesi'nde ve Çorum'da rehberliğini, arkadaşlığını ve deneyimlerini esirgemeyen, yemek arkadaşım, laboratuvar yoldaşım

Kadir Erol'a,

ve

Hayatta zorlandığım her anda yanımda bulduğum, bilgisi, tecrübesi, maddi ve manevi yardımlarıyla Hacettepe Üniversitesi'nde bulunduğum her anda ve sonrasında hep yanımda olan-olduğunu hala hissettiğim can arkadaşım

Ömer Arslan'a

şükran ve minnet dolu en özel teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda emeği geçen bütün Biyokimya Araştırma Grubu hocaları, öğrencileri ve çalışanlarına, hayatımın her aşamasında, gücümü kaybettiğim anlarda sevgi ve dostluğunu her zaman hissettiren tüm arkadaşlarıma,

Her fırsatta bana moral kaynağı olan sevgili ablam

Ümmühan Mesci'ye,

Beni her zaman özveriyle, güvenle destekleyip, bu duruma gelmemi sağlayan sevgili annem ve babam

Fadime Köse ve Abdilkadir Köse'ye,

en içten duygularıyla sonsuz teşekkürler.

*Kazım Köse
Ankara, 2014*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER	4
2.1. Afinite Kromatografisi	4
2.2. Afinite Kromatografisi Uygulamalarının Genel Formatı.....	5
2.3. Nükleotidler.....	8
2.3.1. Nükleotidlerin Kısa Tarihi	8
2.3.2. Nükleotidler.....	9
2.3.2.1. Nükleotidler İle İlgili Önemli Noktalar.....	10
2.3.2.2. Nükleik Asitler ve Nükleik Bazların Karakteristik Yapısı.....	10
2.4. Ribonükleik Asit (RNA).....	13
2.4.1. RNA'nın Yapısı	15
2.4.2. RNA ile İlgili Önemli Buluşlar	18
2.4.3. RNA Saflaştırma Teknikleri.....	19
2.4.3.1. Farklı Kolon Türleri ve Eluent Kimyası.....	21
2.4.3.2. RNA Kromatografisi	22
2.4.3.3. RNA'nın Enzimatik Muamelesi ve Analizi	25
2.4.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.5. Kriyojel Teknolojisi ve Polimerizasyonu.....	29
2.5.1. Kriyojellerin Gelecekteki Uygulamaları	29
2.5.2. Kriyojellerin Yapısal ve Adsorpsiyon Karakterizasyonu	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	31
3.1. Kimyasal Maddeler	31
3.2. Kriyojellerin Hazırlanması.....	31
3.2.1. Fonksiyonel Monomerlerin Sentezi	31
3.2.2. Kriyojellerin Sentezi	32
3.3. Monomerlerin ve Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	33
3.3.1. FTIR Analizi	33

3.3.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi	33
3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	33
3.3.4. Termogravimetrik (TGA) Analiz.....	34
3.3.5. Şişme Testi	34
3.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	35
3.4.1. Poli(HEMA-MAD) Kriyojeller ile Adsorpsiyon Çalışmaları	35
3.4.2. Poli(HEMA-MAG) Kriyojeller ile Adsorpsiyon Çalışmaları	35
3.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	35
3.5. Doğal Kaynaktan RNA Adsorpsiyonu	36
3.6. Elektroforetik Uygulama	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Monomerlerin ve Kriyojellerin Karakterizasyonu	38
4.1.1. Monomerlerin Karakterizasyonu.....	38
4.1.2. Kriyojellerin Karakterizasyonu	43
4.1.2.1. FTIR Analizi	43
4.1.3. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi	46
4.1.4. Yüzey Morfolojisi.....	47
4.1.5. TGA Analizi.....	50
4.1.6. Şişme Testi	52
4.2. Sulu Çözeltilerden RNA Adsorpsiyonu	53
4.2.1. Poli(HEMA-MAD)-100 Kriyojeller ile RNA Adsorpsiyonu	53
4.2.1.1. pH etkisi	54
4.2.1.2. Başlangıç RNA Derişiminin Etkisi.....	56
4.2.1.3. Sıcaklığın Etkisi.....	56
4.2.1.4. Etkileşim Süresinin Etkisi	57
4.2.2. Poli(HEMA-MAG) Kriyojeller ile RNA Adsorpsiyonu	58
4.2.2.1. pH Etkisi.....	59
4.2.2.2. Başlangıç RNA Derişimin Etkisi.....	60
4.2.2.3. Sıcaklığın Etkisi.....	61
4.2.2.4. Etkileşim Süresinin Etkisi	61
4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	62
4.4. Doğal Kaynaktan RNA Adsorpsiyonu	64
4.5. Elektroforetik Ayırma.....	65
4.6. Literatür İle Karşılaştırma	66
4.7. Matematik Modellemeler	67
4.7.1. Adsorpsiyon İzotermi.....	67
4.7.2. Adsorpsiyon Kinetik Modelleme	72

5. YORUM	77
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Tıbbi uygulamaları olan RNA molekülleri [47].	15
Çizelge 2.2. RNA elde etmede kullanılan izolasyon teknikleri (nt: nükleotid, PAGE: poliakrilamid jel elektroforezi, cGMP: en son elde edilen üretim uygulaması) [47].	20
Çizelge 2.3. RNA elde etmede kullanılan saflaştırma teknikleri (PAGE: poliakrilamid jel elektroforezi, SEC: Boyut dışlama kromatografisi, dsRNA: çift sarmal RNA, SPE: katı faz ekstraksiyonu, DEAE: dietilaminoetil) [47].	26
Çizelge 2.4. RNA saflaştırılması için kullanılan afinite kromatografi teknikleri (cGMP: en son elde edilen üretim uygulaması, PAGE: poliakrilamid jel elektroforez, SRP: sinyal tanıma partikülü, ncRNA: kodlamayan RNA, rRNA: ribozomal RNA, SPE: katı faz ekstraksiyonu) [47].	27
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kriyojellere ait sentez bilgileri.	33
Çizelge 4.1. Nükleotid bazlardaki iyonlaşabilen atomlara ait pK _a değerleri [158].	54
Çizelge 4.2. RNA adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.	72
Çizelge 4.3. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri.	74
Çizelge 4.4. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri.	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin genel formatı [26].	5
Şekil 2.2. Tipik bir immunoafinite analizinde gerçekleşen süreç.	6
Şekil 2.3. Nükleotidlerin yapısı [42].	10
Şekil 2.4. Nükleik asitlerin yapısındaki temel pürin ve pirimidin bazları [42].	11
Şekil 2.5. Değişmiş nükleozidler olarak bilinen bazı ikincil pürin ve pirimidin bazları a) DNA'ya ait ikincil bazlar; b) tRNA'ya ait ikincil bazlar. [42].	12
Şekil 2.6. Watson ve Crick tarafından baz çiftleri için tanımlanan hidrojen bağı modelleri [42].	13
Şekil 2.7. RNA'nın 3 boyutlu yapısı. (a) Maya'ya ait fenilalanin tRNA'sının 3 boyutlu yapısı; (b) Bitki virüsünden alınan çekiç başlı ribozim; (c) <i>Tetrahymena thermophila</i> protozoa'sından alınan intron olarak bilinen mRNA dizisi [42].	17
Şekil 3.1. a) MAD ve b) MAG sentezi	32
Şekil 4.1. a) MAD ve b) MAG monomerlerine ait NMR verileri.	41
Şekil 4.2. a) MAD ve b) MAG monomerlerinin FTIR spektrumları.	42
Şekil 4.3. Poli(HEMA-MAD) kriyojellerin moleküler formülü.	44
Şekil 4.4. Poli(HEMA-MAD) kriyojellere ait FTIR spektrumu.	44
Şekil 4.5. Poli(HEMA-MAG) kriyojellerin moleküler formülü.	45
Şekil 4.6. Poli(HEMA-MAG) kriyojellere ait FTIR spektrumu.	45
Şekil 4.7. a) Poli(HEMA-MAD)-100 ve b) Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait BET analizleri.	47
Şekil 4.8. SEM görüntüleri; a) Poli(HEMA-MAD)-50, b) Poli(HEMA-MAD)-75, c) Poli(HEMA-MAD)-100.	48
Şekil 4.9. SEM görüntüleri; a) Poli(HEMA-MAG)-50, b) Poli(HEMA-MAG)-75, c) Poli(HEMA-MAG)-100.	49
Şekil 4.10. a) Poli(HEMA-MAD)-100 ve b) Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait TGA-DTA grafikleri.	51
Şekil 4.11. Sentezlenen kriyojellerin optik görüntüleri.	52
Şekil 4.12. Adenin içeren kriyojeller [poli(HEMA-MAD)-100] ile RNA'nın etkileşimi.	53
Şekil 4.13. Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.	55

Şekil 4.14.	Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojelleri ile RNA adsorpsiyonuna RNA başlangıç derişiminin etkisi: pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.....	56
Şekil 4.15.	Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat.....	57
Şekil 4.16.	Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), T: 25°C.....	58
Şekil 4.17.	Guanin içeren kriyojeller [poli(HEMA-MAG)] ile RNA'nın etkileşimi.	58
Şekil 4.18.	Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.....	59
Şekil 4.19.	Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojelleri ile RNA adsorpsiyonuna RNA başlangıç derişiminin etkisi: pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi 1 saat, T: 25°C.....	60
Şekil 4.20.	Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi 1 saat.....	61
Şekil 4.21.	Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), T: 25°C.....	62
Şekil 4.22.	Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.....	63
Şekil 4.23.	Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.....	63
Şekil 4.24.	Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100, poli(HEMA) ve ticari kite ait, sulu RNA (başlangıç RNA derişimi 100 mg/L) çözeltisi ve Rotavirüs bulunduğu bilinen çözeltiden (başlangıç RNA derişimi: 157 mg/L) elde edilen RNA adsorpsiyon-desorpsiyon sonuçları.	65
Şekil 4.25.	Poli(HEMA-MAD)-100 (2., 3. ve 4. bandlar) ve Poli(HEMA-MAG)-100 (6., 7. ve 8. bandlar) kriyojellerden a) sulu çözeltide ve b) doğal ortamda RNA'nın elektroforetik ayrımı	66
Şekil 4.26.	Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermeleri	70

Şekil 4.27.	Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermleri	71
Şekil 4.28.	Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-birinci derece kinetik modeli.	74
Şekil 4.29.	Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-ikinci derece kinetik modeli.	74
Şekil 4.30.	Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-birinci derece kinetik modeli.	76
Şekil 4.31.	Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-ikinci derece kinetik modeli.	76

1. GİRİŞ

Proteinlerin, peptitlerin ve hatta günümüzde yeni yeni araştırılmaya başlayan RNA ve DNA izolasyonu, ayrılması ve saflaştırılması biyolojik bilimler ve biyoteknolojinin neredeyse tüm alt bölümlerinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojinin daha ileri düzeyde gelişmesi ayırma uygulamalarındaki gelişmelere önemli ölçüde bağlıdır. Hedef molekül derişiminin oldukça az olduğu (10^{-1} - 10^{-6} ppm) ve hatta bunlara eşlik eden ve oldukça derişik ve büyük moleküllerden bu hedef molekülleri ayırmanın gerektiği çözeltiler ile çalışmaya olanak sağlayacak yeni seçici teknikler gereklidir. Yapısal ve fonksiyonel analiz çalışmaları için ön şart, elde edilecek hedef molekülün saflığıdır. Günümüz dünyasında yüksek ayırıcılığa sahip kromatografi teknikleri klasik ayırma tekniklerini geride bırakmıştır. Ayırma işlemleri, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklere (molekül büyüklüğü, net yük, biyospesifik ve hidrofobik özellikler gibi) bağlıdır [1,2]. Afinite kromatografisi teşhis, izolasyon, ayırma ve biyolojik moleküllerin saflaştırılması için köklü bir yöntemdir ve son derece spesifik moleküler tanıma temeline dayanmaktadır [3-5]. Afinite kromatografisinde genel olarak ligand olarak isimlendirilen özgül tanıma yeteneğine sahip bir molekül mikro- veya nano-partikül veya membran şeklindeki çözünmez katı polimerik bir destek malzemeye takılır. Hedef molekülün uygun şartlar için hazırlandığı çözeltilisi uygun koşullar altında (pH, sıcaklık, derişim vb.) hedef molekülü tanıyacak ligandların takıldığı kromatografik kolondan veya kriyojelden geçirilir ya da kesikli sistemde hedef molekül seçici olarak ayrılır. Hedef molekül yakalama işlemleri başarıyla gerçekleştirildikten sonra ayrıştırılmak istenen hedef molekül pH, iyonik şiddet veya sıcaklık gibi etkenler değiştirilerek ya da özel çözelti veya yarışmalı ligandlar kullanılarak, ligand ve hedef molekül arasındaki bağın kırılmasıyla ayrılır ve saf halde elde edilir [5].

Biyolojik bilimler ve biyoteknoloji alanında, proteinlerin ve peptitlerin izolasyonu, genelde değişik elektroforetik ultrafiltrasyon, çökelme, kromatografi ve diğer işlemler kullanılarak yapılmaktadır [6]. Son yıllarda biyolojik moleküllerin saflaştırılması veya ayrıştırılması amacıyla süpermakrogözenekli kriyojellerin kromatografi ortamı olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Süpermakrogözenekli kriyojeller, gözenek boyutları 5-100 μm arasında değişen birbirine bağlı gözenek ağı içermektedir. Geniş bağlı gözenekler kriyojellere, özgül süngersi yapı özelliğini kazandırmaktadır. Süpermakrogözenekli kriyojellerin süngersi morfolojisi onları, bilinen sert yapılı

monolitlerden tamamen farklı yapmaktadır. Kriyojellerin gözenek yoğunluğu ve geniş gözeneklere sahip olması, düşük akış direnci sağladığından viskoz ortamlar ile çalışıldığında büyük avantaj sağlamaktadır [7-9].

Kriyojellerin kullanıldığı teknikler içerisinde yeni yaklaşımlardan biri DNA/RNA kromatografisidir. Her iki kromatografi tekniği aslında afinite kromatografisinde kullanılan ligand tekniği, seçicilik ve geri kazanım yöntemlerine göre hareket etmektedir. Afinite kromatografisinden çok fazla olmasa da tek farkı ligand yerine nükleotidlerden birisinin seçilmesidir. Bu yöntem kullanılarak henüz DNA veya RNA izolasyonu yapılmamış olsa da ekstraksiyon, enzim veya manyetik moleküller (manyetik biyotin vb.) gibi özel tekniklerle bu işlemler yapılmaktadır. Bu yöntemler otomasyon zorluğu, yoğun çalışma gerektirmesi ve insan sağlığı ve hatta molekül yapısı açısından zararlı olabilecek organik kimyasalların kullanılması gibi dezavantajlara sahiptir.

RNA kromatografisinde kullanılacak ligandlar yine RNA veya DNA'nın birer bileşeni olan nükleotidlerdir. Böylelikle meydana gelecek olan etkileşim, doğal etkileşimi taklit edeceğinden hem güçlü hem de oldukça yüksek seçicilikte bir etkileşim olacaktır. Yine elde edilen hedef molekülün ayrılması ile doğal olarak DNA ve RNA hangi şartlardan etkilenecek ayrılıyorsa o şartlar kullanılarak yapılmasına olanak sağlayacak ve ürün de yüksek oranda ve saflıkta elde edilebilecektir. Nükleotidlerin katı desteğe takılması ekonomi, takılma işleminin kolaylığı ve adsorpsiyon kapasitesi açısından oldukça gelecek vadeden bir tekniktir.

Ribonükleik asit (RNA) kodlama, kod çözme, düzenleme ve gen ifadesinde birden çok önemli role sahiptir ve yaygın olarak her yerde bulunabilmektedir. DNA ile birlikte RNA yapısında yaşamın bilinen tüm formları için gerekli olan nükleik asitleri bulundurmaktadır. RNA tek zincirli bir nükleotid dizisinden meydana gelmektedir.

DNA gibi RNA genetik bilgi taşıyabilir. RNA virüsleri bir dizi proteini şifreleyen RNA'dan oluşan genomlarına sahiptir. Viral genom bu proteinlerin bir kısmı tarafından çoğaltılabilirken diğer proteinler virüs parçacığı yeni bir konakçı hücreye hareket ederken genomu korurlar. Viroidler patojenlerin diğer bir grubudur, ancak sadece RNA'dan oluşurlar, hiç bir proteini kodlamazlar ve bir konakçı bitki hücresinin polimerazı ile çoğaltılırlar [10]. Ters transkripsiyon virüsleri kendi RNA'larından kopyaladıkları DNA'nın transkripsiyonu ile kendi genlerini çoğaltırlar; bu DNA kopyaları daha sonra yeni RNA'ya kopya edilirler. Retro transpozonlar da birbirinden DNA ve

RNA kopyalama ile çoğalırlar [11] ve telomeraz ökaryotik kromozomların uçlarını oluşturmak için şablon olarak kullanılan bir RNA ihtiva etmektedir [12].

Çift sarmal RNA (dsRNA), tüm hücrelerde bulunan DNA benzeri iki tamamlayıcı sarmaldan meydana gelmektedir. dsRNA bazı virüslerin (çift zincirli RNA virüsleri) genetik materyalini oluşturmaktadır. Viral RNA veya siRNA gibi çift sarmal RNA hem ökaryotlardaki RNA girişimini hem de omurgasızlardaki interferon yanıtını tetikleyebilir [13-16]. Yukarıda bahsedilen özelliklerinde dolayı, mutasyonlar ya da yanlış kodlamalar nedeniyle meydana gelebilecek rahatsızlıklara çareler bulunması açısından RNA, yapısı ve etkileşimlerinin detaylı olarak araştırılması gereken bir makroyapıdır.

Bu çalışmanın amacı nükleotid (adenin ve guanin) içeren yeni polimerik malzemeler elde etmek ve RNA'nın seçici ve etkin bir şekilde izolasyonunu incelemektir. Bu çalışma 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada nükleotid içeren N-metakriloil-adenin (MAD) ve N-metakriloil-guanin (MAG) elde etmek için metakriloil klorür, adenin ve guanin ile tepkimeye sokulmuştur. Elde edilen monomerler nükleer manyetik rezonans (NMR) ve Fourier dönüşümlü infrared spektroskopi (FTIR) yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Daha sonra, komonomer olarak N-metakriloil-adenin (MAD) ve N-metakriloil-guanin (MAG) içeren poli(2-hidroksietil metakrilat) [poli(HEMA)] ayrı ayrı polimerleştirilmiş ve farklı kriyojeller sentezlenmiştir. Son aşama olarak da karakterizasyon ve adsorpsiyon çalışmaları yürütülmüştür.

Temel bileşen olarak poli(HEMA) seçilmesindeki temel sebep ise inert, mekanik dayanıklılık, kimyasal ve biyolojik açıdan kararlılığı ve muntazam raf ömrüdür. Kriyojeller, Fourier dönüşümlü infrared spektroskopi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM), Brunauer-Emmett-Teller analizi (BET), termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen nükleotid içeren katı desteklerin [poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100] RNA adsorpsiyonu farklı pH, sıcaklık, etkileşim süresi ve derişim değerlerinde kesikli sistemde yürütülmüştür. Deneyin son basamağı olarak da RNA'nın desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu yeni yöntem ligandın takılması için matriksin aktifleştirildiği geleneksel tekniklere göre oldukça avantajlıdır [17]. Bu deneyde, MAD ve MAG komonomerleri ligand olarak davranmış ve hatta destek ligand takılması için aktifleştirilmesine ve ligand immobilizasyonuna ihtiyaç kalmamıştır. MAD ve MAG komonomerleri HEMA ile ligand sızıntısı olmadan polimerleştirilmiştir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, numune bileşenlerinin saflaştırılması ve analiz edilmesi için hedef moleküle özgü bağlayıcı ajanın kullanıldığı bir kromatografi tekniğidir [18]. Bu teknikte, protein veya protein grubu ile bir kromatografi matrisine bağlı hedef moleküle özgü bir bağlayıcı madde arasında gerçekleşen biyolojik etkileşimden yararlanılmaktadır [18]. "Afinite ligandı" olarak bilinen bu madde, numune içerisindeki arzu edilen hedef molekül ile seçici olarak etkileşir ve daha sonra bir kolon içerisindeki katı destek üzerine yerleştirilir [19]. İmmobilize ligand hazırlandığında hedef molekülün izolasyonu ya da miktarının belirlenmesi için kullanılabilir [19].

Başarılı bir afinite kromatografi yöntemi için en önemli faktör immobilize edilen ligandır. Normal olarak kullanılan afinite ligandlarının büyük çoğunluğu antikolar, enzimler, taşıma proteinleri ve karbohidrat bağlayıcı proteinler gibi biyolojik bir kaynaktan gelmektedir. Buna ek olarak, sentetik ligandlar ve daha özel olarak metal iyon şelatları, boronatlar ve biyomimetik boyalar da kullanılabilir [20]. Ligandın tipine göre afinite kromatografisi, lektin afinite kromatografisi, boronat afinite kromatografisi, immün afinite kromatografisi, immobilize metal iyonu afinite kromatografisi vb. gibi farklı kromatografi teknikleri başlığı altında karakterize edilebilirler [20].

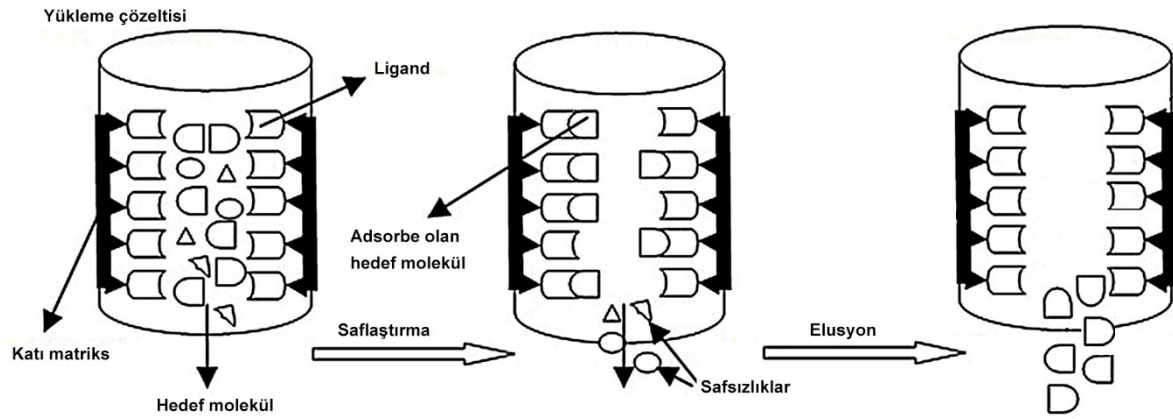
Kolon tasarımı ve kullanımı için katı destek türü de çok önemlidir. Afinite kromatografisi, sadece numune ön - muamelesi ya da hedef izolasyonu için kullanıldığı zaman agaroz veya selüloz gibi bir karbohidrat destek tercih edilir. Diğer yandan, birçok karbohidrat temelli malzemenin düşük verimlilik ve çok iyi olmayan mekanik sağlamlığı off-line yöntemler sırasında ve basınç ve akış oranının nispeten düşük olduğu kolonlarda daha iyi sonuçlar elde etmek için bunlara olan eğilimi artırmaktadır [21].

Destek türüne göre, yeni afinite kromatografisi türleri de geliştirilmektedir. Daha özel olarak ise, yüksek performanslı afinite kromatografisi (HPAC) ya da geleneksel karbohidrat bazlı desteklerden farklı olarak silika parçacıklarının HPLC ortamı olarak kullanılabilirdiği yüksek performanslı sıvı afinite kromatografisi (HPLAC) teknikleri afinite kromatografisinin yeni türlerindedir [22]. Diğer bir yaklaşım ise son zamanlarda geliştirilen monolit yapıdaki malzemelerin afinite ligandı bağlamak için kullanıldığı monolit afinite kromatografisidir [23]. HPAC'nin en önemli avantajı parçacıkların ya da sentetik polimerlerin verimlerindeki yüksek orandaki kesinlik ve doğruluktur [24].

Magdeldin ve Moser'e göre [25] afinite kromatografisi ilk olarak elli yıl önce keşfedilmesine rağmen son yıllardaki saflaştırma uygulamalarının büyük bir çoğunluğu (% 60'ın üzerinde) afinite kromatografisi uygulamaları içermektedir.

2.2. Afinite Kromatografisi Uygulamalarının Genel Formatı

Biyomolekülleri ayırmak için uygulanan geleneksel ve yüksek basınç afinite kromatografisi uygulamalarının kullanılan biçimi aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.1).

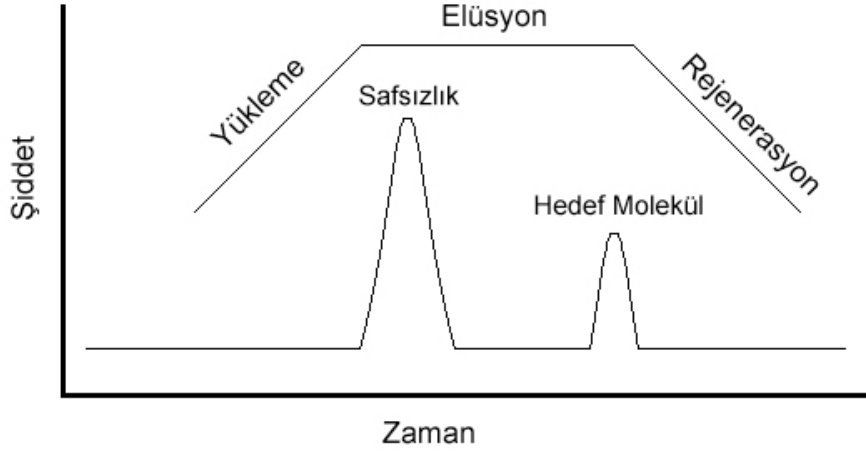


Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin genel formatı [26].

İlk adım, hedef molekülü içeren numunenin, hedef molekülün sağlam bir şekilde tutuklanan liganda bağlanmasına izin veren koşullar altında, afinite kolonuna ya da afinite işleminin gerçekleşeceği sisteme (kesikli ya da sürekli) yüklenmesini içerir. Bu tür uygulamalarda düzenli olarak ligandın ve liganda ait hedefin doğal koşullarıyla paralel pH'da hazırlanan tampon çözeltisi kullanılır. Tamponun kullanılması sırasında, ligand ile çok az veya hiç etkileşime girmeyen bileşiklerin elüsyonu gerçekleşir ve bunun sonucu olarak tutulmayan moleküller de bir pik oluşturabilir [20].

Daha sonra, ligandan tutunan hedef molekülün ayrılması bir elüsyon tamponu kullanılarak gerçekleştirilir. Bu da pH koşulları değiştirilerek veya hedefin kolondan yer değiştirmesi için sorumlu olan rakip (yarışmalı) bir ajan eklenerek elde edilebilir. Yıkama işlemi süresince serbest kalan hedef moleküllerin toplanması da mümkündür ve bu hedef moleküller farklı analizleri yapabilmek amacıyla toplanmaktadır. Elüsyon sonucu elde edilen hedefin doğrudan analizi herhangi bir spektroskopi cihazı (UV vb.) veya afinite kolonunda bir HPLC destek malzemesi kullanılarak bir on-line yöntemi ile de mümkündür. Absorbans, floresan ya da kütle spektrofotometresi gibi off-line tayin

yöntemleri ile on-line yöntemlerin birlikte kullanımı da ayrıca mümkündür. Bir sonraki uygulamadan önce kolonun yenilenmesi (rejenerasyonu) hedefin elüsyonundan sonra özgün uygulama tamponu içinden geçirilerek yapılabilir [27].



Şekil 2.2. Tipik bir immunoafinite analizinde gerçekleşen süreç.

Afinite kromatografisi "açık/kapalı" veya basamak elüsyon modu olarak bilinen hedefin yakalanması ve elüsyonu işlemlerini içermektedir [28]. Özellikle tıp ve ilaç analizleri ile ilgili uygulamalarda, sadece bileşikleri izole etmekte değil, aynı zamanda numune hazırlama işlemi amacıyla da geniş bir uygulama aralığında kullanılmaktadır. Bu seçimin yapılmasının ana nedeni, bu işlemin basit, esnek, seçici ve nispeten kullanımının kolay ve rahat bir şekilde karakterize edilebilir olmasıdır [18]. Buna ek olarak, HPAC uygulamaları ya da HPLC sistemlerinin bir parçası olarak uygun hale getirilen afinite kolonları kullanıldığında bu formatın otomasyonu oldukça kolaydır. Sonuçta, bu yöntem analitlerin doğrudan tespiti için de kullanılabilir. Bu nedenle elüsyon modu basamağında, on-line absorbans ya da floresan dedektörleri kullanılmaktadır. Bunların dışında, kütle spektrometresi uygulamaları ve kolon sonrası reaktörler de kullanılabilir [29].

Zayıf afinite kromatografisi (WAC) veya dinamik afinite kromatografisi (DAC) tutulan hedefin immobilize edilmiş liganda zayıf veya orta derecede afinite gösterdiği düşünülen, izokratik yıkama işleminin gerçekleştirildiği farmasötik ve biyomedikal çalışma alanlarındaki pek çok uygulamada kullanılan afinite kromatografisi için farklı bir yaklaşımdır. Bu sistemlerin geliştirilmesi hem numune uygulaması ve hem de elüsyon tamponu olarak kullanılması için tek bir hareketli faz uygulamasının kullanılabilirliğine olanak verir [28].

Genel olarak afinite kromatografisi seçici numunelerin miktar ölçümü ve klinik numunelerin incelenmesi amacıyla uygulanan geleneksel uygulamalara alternatif olarak geliştirilen bir yaklaşımdır. Bu yöntemin en büyük avantajı, klinik kimya alanında analiz edilecek olan her bir bileşik için bağımsız bir afinite sistemi oluşturulabilmesidir. Doğrudan veya dolaylı çözünen madde belirlenmesinde kullanılan birçok kullanılabilir ligand ve çalışma biçimi seçeneği vardır.

Afinite kromatografisi biyomedikal ve ilaç analizi alanlarında kullanılan ayırma yöntemleriyle ilgili değerli ve önemli bilgiler sağlar. Bu nedenle, son yıllarda, afinite kromatografisi odaklı çalışmalarda önemli oranda bir artış vardır. Şu ana kadar kolona yerleştirilen desteğin türü (geleneksel karbohidrat ya da HPLC destekler), elüsyon yöntemi (gradyan ya da izokratik elüsyon) ve afinite ligandları (lektinler, boronatlar, antikolar, immobilize edilmiş metal iyonları, boya ligandları veya aptamerler) gibi tüm mekanizmanın bazı parçalarını değiştirerek bir dizi farklı mod incelenmiştir. Ayrıca, bu türün, özellikle de tayin işlemi için ters fazlı HPLC ya da kütle spektrometresi gibi diğer analitik teknikler ile kombinasyonu tatmin edici sonuçlar sağlayabilir [20].

Ek olarak, afinite kromatografisi bilgi ufuklarını genişletmek ve tekniği farklı bir yaklaşımla yeniden ele almak isteyen birçok araştırmacıya yardımcı olacak şekilde birçok yeni uygulamada ve yenilikçi buluşlarda kullanılmıştır. Daha özel olarak ise, farklı çözünenler arasındaki biyolojik etkileşimler ve yarışmalı etkiler, bağlanma bölgelerini ilgilendiren karakteristik iki örnektir. Afinite kromatografisinin izleyen yıllarda şu ana kadarkinden çok daha hızlı bir gelişme içerisinde olacağına ve bu gelişme sayesinde bu tekniği kullanan yeni uygulamalar ve yöntemlerin kullanılmaya başlayacağına hiç şüphe yoktur. Araştırmacılar, bu tekniğin birçok sorunu çözeceğine ve gerçekten karmaşık numunelerde bile farklı biyolojik ve farmakolojik ajanların analizi sırasında tam olarak birçok soruya cevap bulacağına inanmaktadırlar.

Son olarak, klinik laboratuvarlarda afinite kromatografisi kullanılarak değerli bilgiler elde edilebilmektedir. Kiral ilaçların analizi veya ilaç ve hormon-protein bağlanmasının incelenmesi gibi bir dizi önemli test ve uygulamaların yürütülmesine de imkân sağlayabilecektir. Bunların büyük çoğunluğu özel testler olup, araştırmacıların ve bilim adamlarının daha fazla klinik numune ya da klinik uygulamaları keşfetmek veya araştırmak için bile daha ileride afinite kromatografisini kullanacağını göstermektedir.

Bu nedenle, afinite kromatografisinin geleceği, sadece biyo-enformatik araçlardaki etkileyici ilerleme ile değil aynı zamanda bilim adamlarına sağlam, yüksek afinite

ligandları [30] seçebilme olanağı sağlayan kütüphanelerin oluşturulması açısından da umut vericidir. Yüksek verimli tarama teknolojilerinin hızla gelişmesi de bu seçeneğin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır.

Afinite kromatografisi, immobilize ligand ve bir bağlanma eşi arasında gerçekleşen ve birbirine özgü bağlanma etkileşimine dayanan bir ayırma yöntemidir. Örnek olarak antikor-antijen, enzim-substrat ve enzim-inhibitör etkileşimleri verilebilir. Dolayısıyla saflaştırma derecesi etkileşimin özelliğine bağlı olarak oldukça yüksek olabilir ve sonuç olarak saflaştırma stratejisinde eğer tek adım değilse genel olarak son adım olan parlatma aşamasıdır.

Afinite kromatografisi çoğu protein saflaştırma işleminde yüksek seçicilik, çözünürlük ve kapasite sunmaktadır. Bu, saflaştırma için bir proteinin biyolojik yapısı veya fonksiyonunu kullanma konusunda avantaj sağlamaktadır. Sonuç olarak, başka bir yöntemle zaman alıcı ve karmaşık saflaştırma işlemi afinite kromatografisi ile genellikle kolayca ve kısa zamanda gerçekleştirilebilir.

Bağlanma afinitesi göstermek için yaygın olarak kullanılan analogi kilit ve anahtar ilişkisidir. Bir proteinin yüzeyi üzerinde bulunan benzersiz bir yapı sadece ona karşılık gelen anahtar ve kromatografik bir destek üzerindeki belli bir liganda bağlanan kilittir [31].

2.3. Nükleotidler

2.3.1. Nükleotidlerin Kısa Tarihi

1869'da Miescher kirlenmiş bandajlardan nüklein izolasyonunu gerçekleştirdi. 1902 yılında nadir gözlenen bir genetik bozukluk olan Alkaptonüri hastalığını araştırırken özel, belirli bir enzimin yokluğuna belirli bir genin sebep olduğunu buldu. Daha sonra, 1903 yılında Sutton kromozom yapısını keşfetti. Bundan 10 yıl sonra Morgan gen haritalaması konusunda eşsiz bir başarı gösterdi. 1926 yılında Sumner üreazı saflaştırdı ve enzimlerin de protein olması gerektiğini belirledi. 1928 yılında Dönüşüm İlkesi'ni ortaya attı. Ölü bakterilerden canlı hücrelere aktarılan bir kimyasalın genetiği dönüştürülmüş soyları meydana getirmesine dayanan bu ilke günümüzde birçok alanda etkisini artarak göstermektedir. 1944 yılında Avery, McCarty ve Macleod Griffith'in belirlediği "dönüşüm ilkesi"ni DNA'ya uyarlamayı başardılar. 3 yıl sonra Chargaff baz eşleştirmeyi başardı ve bunun temellerini belirledi. Günümüzden yaklaşık 60 yıl önce Franklin DNA'nın X-ışınım sonuçlarını elde etti ve 1953 yılında Watson ve

Crick şu anki çalışmaların temelini oluşturan ve birçok konuda araştırmacılara yol gösteren DNA'nın çift sarmallı yapısını tanımladı [32].

Watson ve Crick modelini destekleyen deneysel kanıtlar *Nature* dergisinin aynı sayısında yayımlanan beş makalede yer aldı [33]. Bunlardan Franklin ve Gosling'in makalesi, Watson ve Crick modelini kısmen destekleyen, kendi X-ışını kırınım verileri ve analiz yönteminin ilk olarak yayımlanmış şekliydi [34, 35]. Derginin aynı sayısında DNA yapısı hakkında Maurice Wilkins ve iki arkadaşının bir makalesi de vardı, onların *in vivo* B-DNA X-ışını kırınım görüntüleri üzerinde yaptıkları analizler, iki sayfa geride Crick ve Watson tarafından önerilen çift sarmal modelini destekliyordu [36]. 1962'de Franklin'in ölümünden sonra Watson, Crick ve Wilkins birlikte Nobel Fizyoloji veya Tıp dl'nü kazandılar [37]. O zamanki Nobel dlleri ödülün ancak hayatta olan kişilere verilmesine izin veriyordu. Keşif için kimlerin hak alması gerektiği konusunda tartışmalar hala devam etmektedir [38].

Crick, 1957'de yaptığı etkili bir sunumda, moleküler biyolojinin "Merkezi Dogması"nı ortaya koyarak DNA, RNA ve proteinler arasındaki ilişkiyi, bu konuda kanıtlar henüz tamamen ortada değilken, özetledi ve ayrıca "adaptör hipotezi"ni dile getirdi [39]. Çift sarmallı yapının ortaya attığı kopyalama mekanizmasının teyidi, 1958'de yayımlanan Meselson-Stahl deneyi ile de kanıtlandı [40]. Crick ve arkadaşları tarafından yapılan diğer çalışmalar genetik kodun, kodon olarak adlandırılan, örtüşmeyen baz üçlülerinden oluştuğunu gösterdi, bu sayede Har Gobind Khorana, Robert W. Holley ve Marshall Warren Nirenberg genetik kodu ozdler [41]. Bu keşifler moleküler biyolojinin temellerini atan keşifler olmuştur.

2.3.2. Nükleotidler

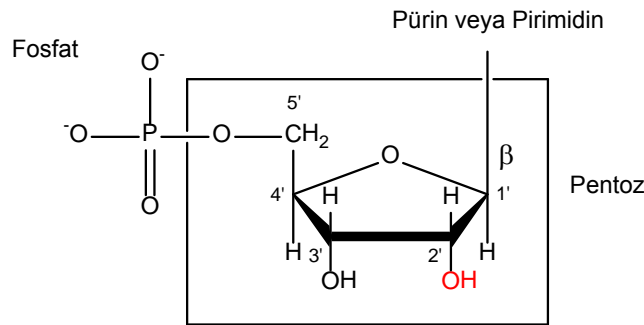
Nükleotidler hücre metabolizmasında çeşitli rollere sahiptir. Bu roller metabolik işlemlerdeki enerji döngüsü, hormonlar ve diğer hücre dışı uyaranlara hücrenin yanıt vermesi için gereken temel kimyasal bağlantılarda yer alma ve enzim kofaktörler ve metabolik ara maddelerin bir dizi yapısal bileşenleri olma şeklinde örneklendirilebilir. Son olarak ve kesinlikle en önemlisi, genetik bilginin moleküler deposu olarak Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) ve Ribonükleik Asit (RNA) bileşenleridir. Her proteinin ve nihai olarak her biyomolekln ve hücrenel bileşenin yapısı hücrenin nükleik asitlerinin nükleotid dizisinde programlanmış bir bilginin ürünüdür. Genetik bilginin saklanması ve bir kuşaktan diğerine iletirme yeteneği, yaşam için temel bir koşuldur.

2.3.2.1. Nükleotidler İle İlgili Önemli Noktalar

Bir hücredeki her bir proteinin ve her RNA'nın nükleotid dizisine karşılık gelen amino asit dizisi, hücrenin DNA'sında bir nükleotid dizisi tarafından belirlenir. DNA molekülünün ister protein ister RNA olsun işlevsel biyolojik bir ürünün sentezi için gerekli olan bilgileri içeren bölümüne gen denilmektedir. Bir hücre genellikle binlerce gen ve DNA molekülü içermektedir ve doğal olarak çok büyük olma eğilimindedir. DNA'nın bilinen tek işlevi depolama ve biyolojik bilgi iletimidir. RNA'nın ise daha geniş bir işlev yelpazesi ve hücrede bulunan farklı türleri vardır. Ribozomal RNA (rRNA)'lar protein sentezini gerçekleştiren ve ribozomu oluşturan komplekslerdir. Mesajcı RNA (mRNA)'lar genetik bilgiyi bir veya birkaç genden karşılık gelen proteinlerin sentezinin gerçekleştiği ribozoma taşıyan araçlardır. Taşıyıcı RNA (tRNA)'lar ise mRNA'daki bilgilerin güvenilir bir şekilde belirli amino asit dizilere dönüştürülmesinde görev alan uyarlayıcı moleküllerdir.

2.3.2.2. Nükleik Asitler ve Nükleik Bazların Karakteristik Yapısı

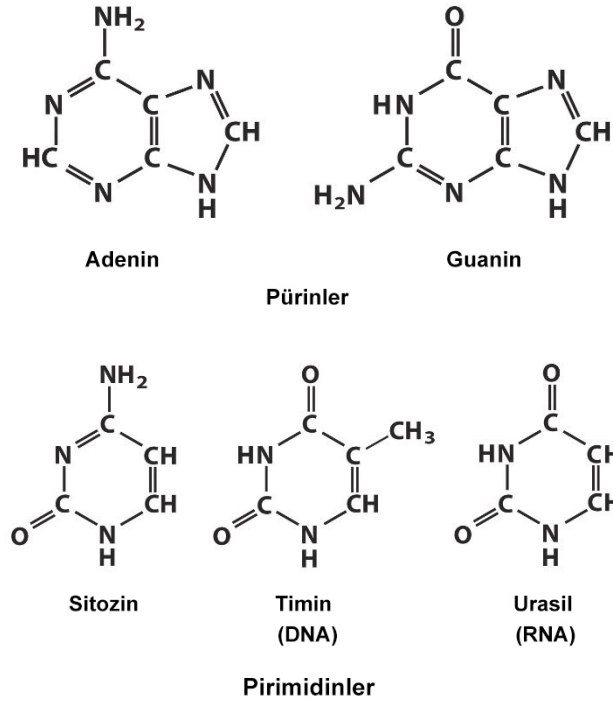
Nükleotidlerin üç karakteristik bileşeni vardır: (1) Azot ihtiva eden bir baz, (2) bir pentoz, ve (3) bir fosfat (Şekil 2.3). Fosfat grubuna sahip olmayan moleküle nükleozid adı verilmektedir. Azotlu bazlar iki ana bileşiğin, pirimidin ve pürin türevleridir. Bazlar ve ortak nükleotidlerin pentozu heterosiklik bileşiklerdir. Ana yapıların içindeki karbon ve azot atomları çok sayıda türevlenmiş bileşiklerin isimlendirilmesi ve tanımlanmasını kolaylaştırmak için geleneksel olarak numaralandırılmıştır. Nükleotidlerin pentozlarında ve nükleozitlerde karbon numaralarını farklı kılmak için azotlu bazların atomlarına üs (') işareti eklenmiştir.



Şekil 2.3. Nükleotidlerin yapısı [42].

Bir nükleotidin bazı N-glikozid bağına (pirimidinlerin N-1 ve pürinlerin N-9) kovalent olarak 1' pentoz karbonundan bağlanır ve fosfat 5' karbonundan esterleştirilir. N-glikozid bağı O-glikozidik bağ oluşumunda olduğu gibi su elemanlarının uzaklaştırılması (pentozdan bir hidroksil grubu ve bazdan bir hidrojen) ile elde edilir.

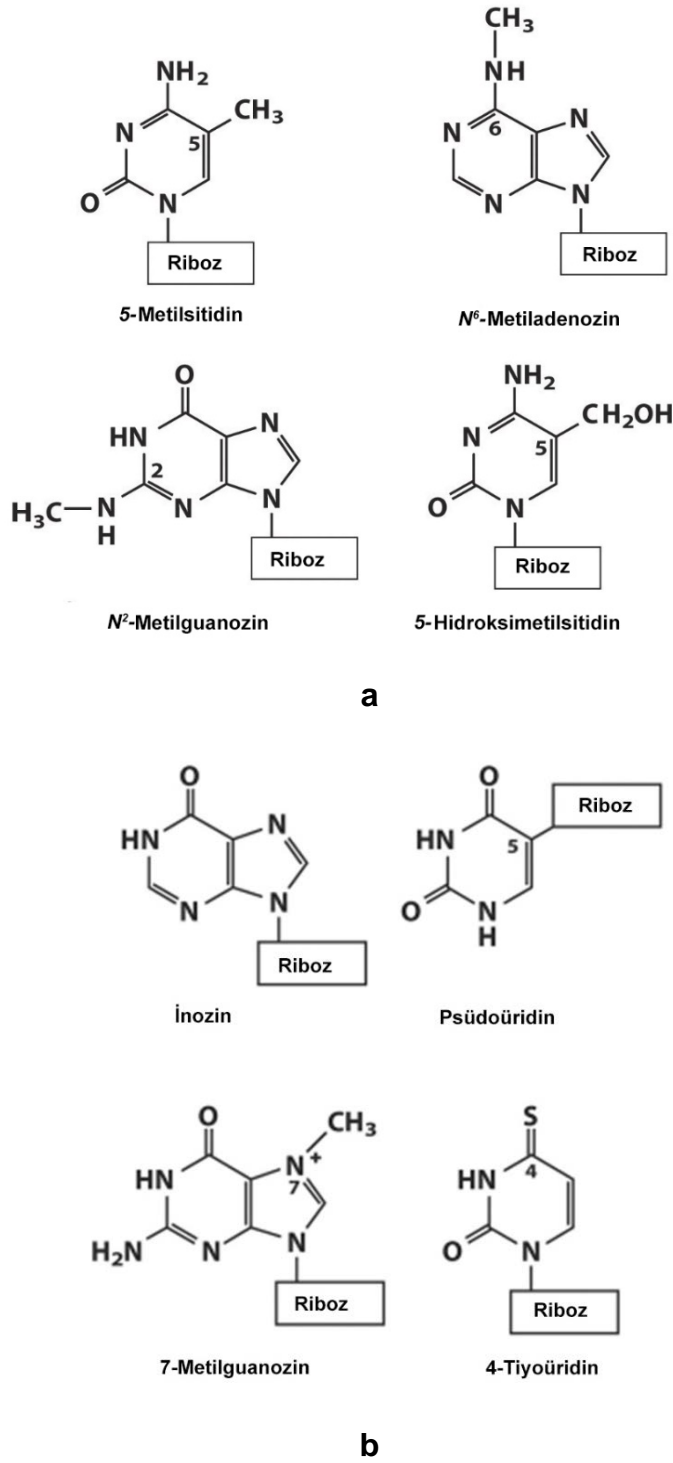
DNA ve RNA her ikisi de iki temel pürin bazı, adenin (A) ve guanin (G), ve iki temel pirimidin bazı içermektedir. DNA ve RNA'nın her ikisinde de bulunan pirimidin bazı sitozin (C)'dir, ancak ikinci temel pirimidin aynı değildir: DNA'daki pirimidin bazı timin (T), RNA'daki ise urasil (U)'dir. Sadece nadiren timin RNA'da ya da urasil DNA'da meydana gelebilir. Beş ana bazın yapıları Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Nükleik asitlerin yapısındaki temel pürin ve pirimidin bazları [42].

Nükleik asitlerde iki pentoz türü vardır. DNA'nın tekrar eden deoksiribonükleotid birimi 2'-deoksi-D-riboz ve RNA ribonükleotid birimleri de D-riboz ihtiva etmektedir. Nükleotidlerde, her iki pentoz tipi de β -furanoz (furan yapısına benzeyen kapalı, beş üyeli bir halka) formunda bulunmaktadır.

DNA'daki özel uzun A, T, G ve C nükleotid dizileri genetik bilginin deposu durumundadır. Temel pürin ve pirimidinlerden oluşan nükleotidler en yaygın olmakla birlikte, DNA ve RNA'nın her ikisi de aynı zamanda bazı küçük bazları da içermektedir (Şekil 2.5). Bunların en yaygını DNA'daki temel bazların metillenmiş formları ve bazı viral DNA'larda ise belirli bazların hidroksimetillenmiş veya glikozillenmiş halleridir. DNA moleküllerindeki değişmiş veya olağandışı bazlar genellikle genetik bilgiyi düzenleyen veya korunmasında rol oynayan yapılardır. Pek çok türün ikincil bazları ayıca RNA'da ve özellikle tRNA'da bulunmaktadır [42].

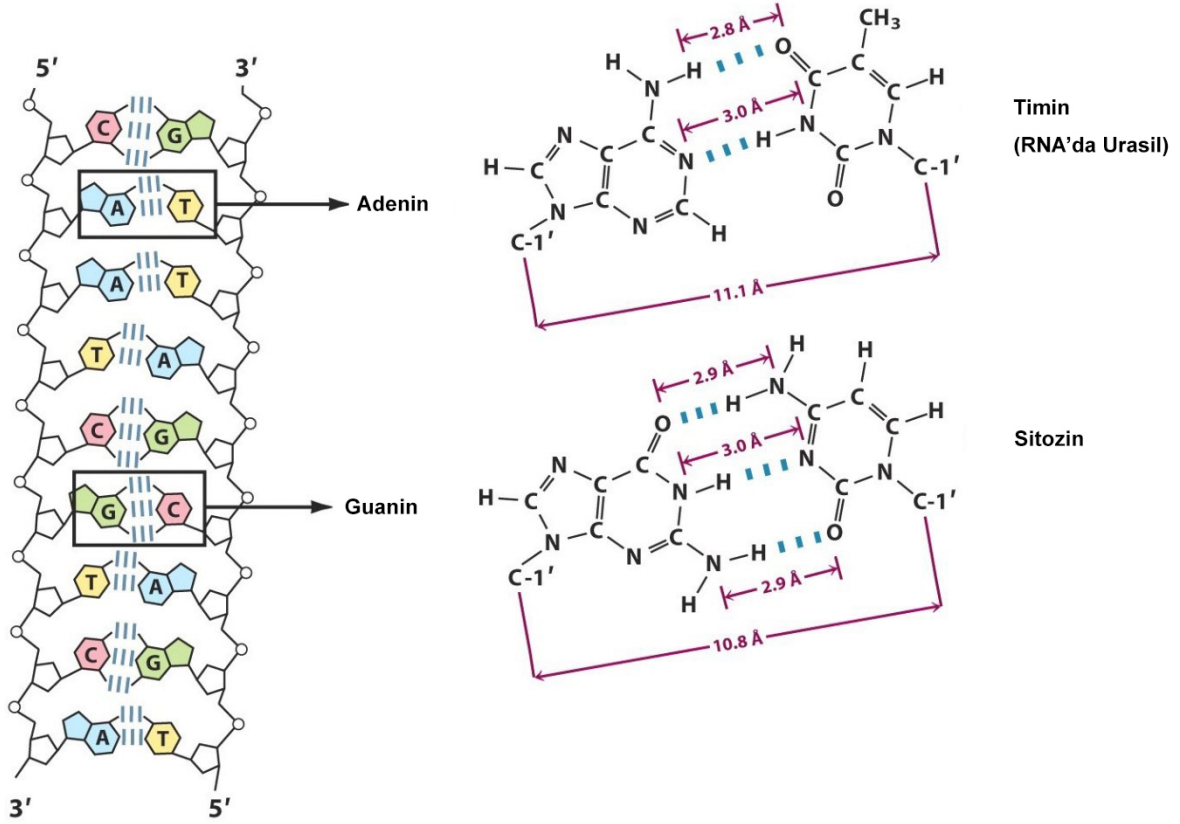


Şekil 2.5. Değişmiş nükleozidler olarak bilinen bazı ikincil pürin ve pirimidin bazları

a) DNA'ya ait ikincil bazlar; b) tRNA'ya ait ikincil bazlar. [42].

Aşağıdaki şekilde nükleotidler arasında RNA ve DNA'nın bir arada durmasını ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmelerini sağlayan hidrojen bağları ve bağ uzunlukları gösterilmektedir.

Bu tez araştırmasındaki temel saflaştırma prensibi bu seçici hidrojen bağlarının eşlenik bazlar arasında oluşumuna dayanmaktadır.



Şekil 2.6. Watson ve Crick tarafından baz çiftleri için tanımlanan hidrojen bağı modelleri [42].

2.4. Ribonükleik Asit (RNA)

Ribonükleik asit (RNA) kodlama, kod çözme, düzenleme ve gen ifadesinde birden çok önemli role sahip olan ve yaygın olarak her yerde bulunabilen büyük biyolojik molekül ailesidir. DNA ve RNA, proteinler ile birlikte yaşamın bilinen tüm formları için gerekli olan üç temel makromolekülden oluşan nükleik asitleri ihtiva etmektedir. DNA gibi, RNA da bir nükleotid zincirinden meydana gelmektedir, ancak genellikle tek ipliklidir. Birçok virüs kendi genetik bilgilerini bir RNA genomu kullanarak kodlarken, hücreler organizmalar belirli proteinlerin doğrudan sentezi için gerekli olan genetik bilgiyi aktarmak (guanin, adenin, urasil ve sitozin nükleotidleri genellikle G, A, U ve C harfleriyle gösterilir) için mesajcı RNA (mRNA)'yı kullanırlar.

Bazı RNA molekülleri hücre içerisinde biyolojik reaksiyonları katalizleme, gen ifadenmesinin kontrolü, ya da hücreler sinyallere verilen yanıtları algılama ve iletişim sağlamada etkin bir rol oynamaktadır. Bu aktif işlemlerden biri mRNA moleküllerinin ribozomlarda proteinlerin doğrudan sentez işlevini gerçekleştiren evrensel bir görevi

kabul edilen protein sentezidir. Bu işlem, ribozomal RNA (rRNA)'nın proteinleri oluşturmak için amino asitleri bir araya getirmek için bağlandığı ribozoma, amino asitlerin taşınması için taşıyıcı RNA (tRNA) moleküllerini kullanır.

DNA ile karşılaştırıldığında RNA'nın kimyasal yapısının DNA'ya çok benzer olduğu söylenebilir ancak üç temel konuda farklılık gösterirler:

- Çift sarmallı DNA'nın aksine, RNA pek çok biyolojik görevinde tek sarmallı bir moleküldür ve çok daha kısa bir nükleotid zincirine sahiptir. Bununla birlikte, RNA tamamlayıcı bir baz çifti vasıtasıyla, tRNA'da olduğu gibi, iç çift sarmal ipliği oluşturabilir.
- DNA *deoksiriboz* ihtiva ederken, RNA *riboz* (deoksiribozda 2' konumundaki pentoz halkasına bağlı hiçbir hidroksil grup yoktur) içermektedir. Hidrolize daha yatkın olduğundan bu hidroksil grupları, bazik koşullarda RNA'nın DNA'dan daha az kararlı olmasına sebep olur.
- Adenin için tamamlayıcı baz DNA'daki gibi timin değil timinin metillenmemiş bir biçimi olan urasildir [43].

DNA gibi; mRNA, tRNA, rRNA, snRNA'lar ve diğer kodlama yapmayan RNA'lar da dahil olmak üzere pek çok biyolojik olarak aktif olan RNA, RNA parçalarının katlanmasına ve çift sarmal oluşturmak için kendisiyle eşleşmesine izin veren öz bütünleyici diziler içerebilmektedir [44]. RNA'ların analizi bunların son derece yapılandırılmış olduğunu ortaya çıkarmıştır. DNA'nın aksine, RNA'ların yapıları uzun çift sarmal içermekten ziyade proteinlere benzer yapılar halinde birlikte paketlenmiş kısa sarmal yığınından ibarettir. Bu şekilde, RNA'lar enzimler gibi kimyasal katalizleri de gerçekleştirebilir [45]. Örneğin, bir peptit bağı oluşumunu katalize eden ribozomun yapısının belirlenmesi, aktif bölgesinin tamamen RNA'dan oluştuğunu ortaya koymuştur [46].

Çizelge 2.1. Tıbbi uygulamaları olan RNA molekülleri [47].

RNA türü	Hücre fonksiyonu	Tıbbi boyutu	Kaynaklar
<i>Protein sentezi</i>			
Mesajcı RNA (mRNA)	Proteinler için kodlar	Aşı	
Ribozomal RNA (rRNA)	Translasyon	Antibiyotik hedef	[48-51]
Taşıyıcı RNA (tRNA)	Apoptoz düzenlenmesi	Pek çok hastalığı anlama	
<i>Post-transkripsiyonel modifikasyon veya DNA replikasyonu</i>			
Küçük nükleer RNA (snRNA)	Uç birleştirme ve diğer	Pek çok hastalığı anlama	
Küçük çekirdekçik RNA (snoRNA)	fonksiyonlar RNA'lara ait nükleotid modifikasyonu	Pek çok hastalığı anlama	[52, 53]
<i>Düzenleme</i>			
Antisens RNA	Transkripsiyonel söndürme mRNA stabilizasyonu veya yıkımı	RNA translasyonu inhibitörü	[54, 55]
MikroRNA (miRNA)	Translasyon bloğu mRNA yarılmaması ve translasyon baskılama	Gen susturma	[56, 57]
Küçük müdahaleci RNA (siRNA)	mRNA yarılmaması ve translasyon baskılama	Gen susturma	[58, 59]
Ribozimler	RNA enzim. RNA yarılmamasını katalizleme ve ligasyon reaksiyonları	mRNA tekrar programlaması ve onarımı	[60]
Riboswitch	Küçük metabolitlere bağlanarak gen ifadesini düzenleme	Gen ifadesini düzenleme Anti bakteriyel ilaç hedefi	[61-63]
Aptamerler	Belirli bir hedef moleküle yüksek afinite ile bağlanan riboswitchin oligoribonukleotid parçası	Çeşitli hedef proteinleri inhibe eden tuzak mekanizması	[64, 65]

2.4.1. RNA'nın Yapısı

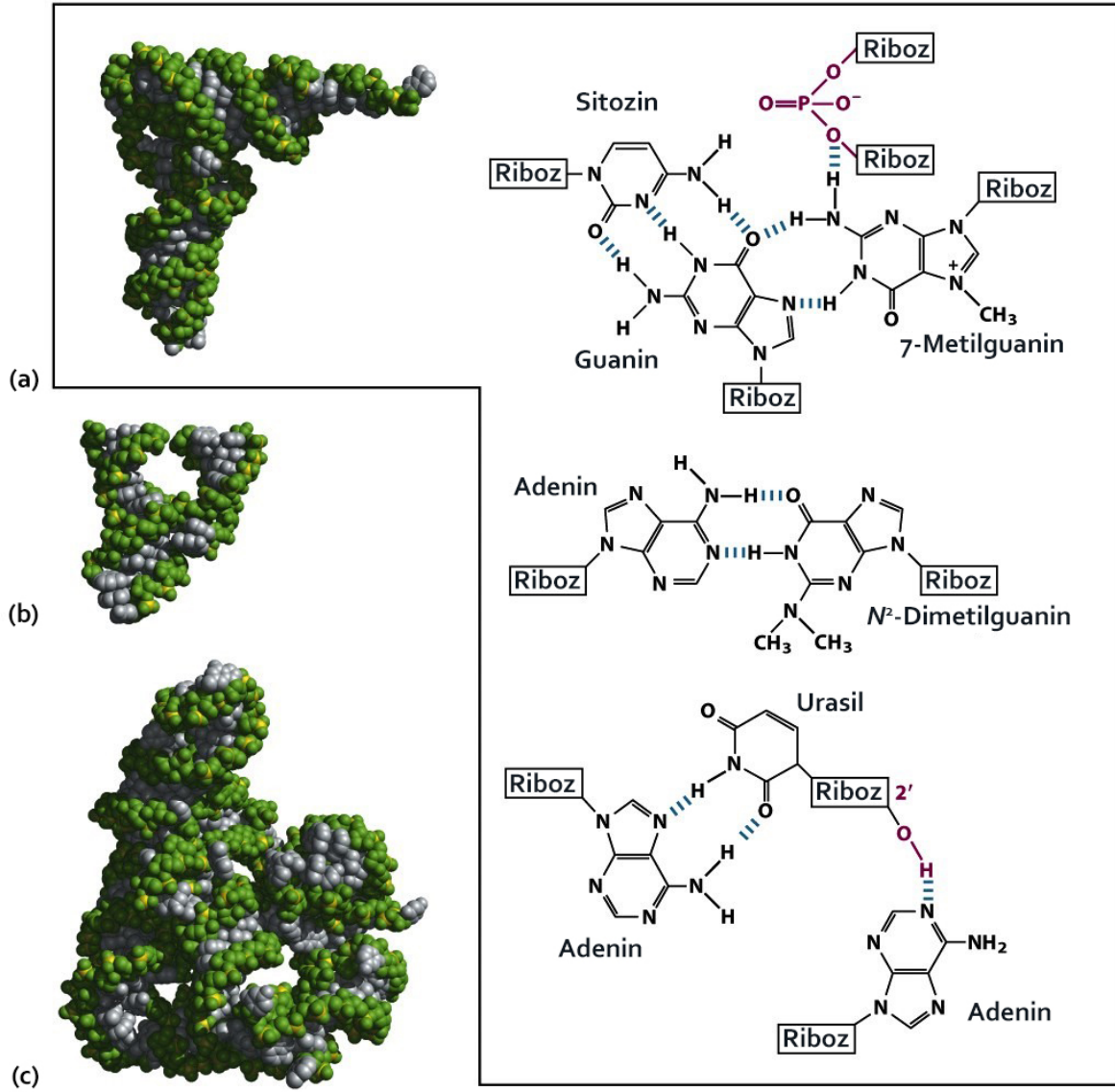
RNA'daki her bir nükleotid üzerinden 1' numaralı karbondan 5' numaralı karbona kadar bir riboz şekeri içerir. Bir baz, genel olarak adenin (A), sitozin (C), guanin (G) ya da urasil (U), 1' pozisyonundan bağlanmıştır. Adenin ve guanin pürin bazlarıdır; sitozin ve urasil ise pirimidin bazlarıdır. Bir fosfat grubu, ribozun 3' pozisyonuna ve bir yanındakinin ise 5' pozisyonuna bağlanmıştır. Fosfat gruplarının her biri, RNA'nın yüklü

bir molekül (polianyon) olmasını sağlamakta ve buna bağlı olarak RNA molekülleri fizyolojik pH'da negatif bir yüke sahip olmaktadır. Bazlar, sitozin-guanin, adenin-urasil ve guanin-urasil arasında hidrojen bağları oluştururlar [66]. Bununla birlikte, bir grup adenin bazının bir bölgede birbirlerine bağlanması [67] ya da bir guanin - adenin baz çiftine sahip GNRA (GNRA tetraloop: RNA'nın ikincil yapı oluşturan kollarının uçlarını birleştiren halka şeklindeki dörtlü baz yapısı, burada N: A, C, G yada U'dir; R ise A yada G'dir [68]) dörtlü döngüsü [66] gibi diğer etkileşimler de mümkündür.

RNA'yı DNA'dan ayıran önemli bir yapısal özelliği de riboz şekerindeki 2' pozisyonunda bulunan bir hidroksil grubunun varlığıdır. Bu fonksiyonel grubun varlığı DNA sarmalında oldukça yaygın olarak gözlemlenen B-formundan ziyade A formunda bir geometriye sahip olmasına yol açar [69]. Bu durum çok derin ve dar temel bir kanal ve sığ ve geniş ikincil bir kanal ile sonuçlanır [70]. 2'-hidroksil grubunun bulunmasının diğer bir sonucu da bir RNA molekülü (yani, çift sarmal oluşumuna karışmayan)'nın yapısal olarak esnek bölgelerinde, omurgayı bölmek için bitişik fosfodiester bağına kimyasal olarak saldırabilir olmasıdır [71]. RNA sadece dört baz (adenin, sitozin, guanin ve urasil) ile kopyalanır [72]; fakat, bu bazlar ve bağlı şekerler RNA'lar olgunlaştıkça çeşitli şekillerde değiştirilebilir. Bununla birlikte, ribozomal RNA'daki transkripsiyon sonrası değişikliklerin çoğu, onların, normal işlevi için önemli olduğunun bir göstergesi olarak, peptidil transferaz merkezi ve alt birim ara yüzü gibi son derece işlevsel bölgelerde meydana gelmektedir [73].

Tek-sarmal RNA moleküllerinin işlevsel formu, proteinlerdeki gibi, sıklıkla belirli bir üçüncül yapı gerektirmektedir. Bu yapı için gerekli yapı iskelesi molekül içindeki hidrojen bağları olan ikincil etkileşimlerle sağlanmaktadır. Bu, saç tokası yapısı, yığınlar ve iç döngüler gibi ikincil yapı elemanlarından oluşan bazı tanımlanabilen "etki alanlarına" neden olur [74]. RNA yüklü olduğundan, birçok ikincil ve üçüncül yapıyı dengelemek için Mg^{2+} gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır [75].

Mesajcı RNA (mRNA) DNA'dan aldığı bilgiyi hücre içindeki protein sentezinin (translasyon) gerçekleştiği yer olan ribozoma ve sonrasında taşıyıcı RNA'ya aktarır. mRNA'nın kodlama dizisi üretilen proteindeki amino asit dizisini belirler [76]. Birçok RNA proteini kodlamaz (ancak transkripsiyonel üretiminin yaklaşık %97'si ökaryotlardaki protein içermeyen kodlamalıdır) [77-80].



Şekil 2.7. RNA'nın 3 boyutlu yapısı. (a) Maya'ya ait fenilalanin tRNA'sının 3 boyutlu yapısı; (b) Bitki virüsünden alınan çekiç başlı ribozim; (c) *Tetrahymena thermophila* protozoa'sından alınan intron olarak bilinen mRNA dizisi [42].

Kodlayıcı olmayan olarak isimlendirilen RNA'lar ("ncRNA"), kendi genleri (RNA genleri) tarafından kodlanabilirler, ama aynı zamanda mRNA intronlarından da elde edebilirler. [81]. Kodlayıcı olmayan RNA'ların en belirgin örnekleri arasında her ikisi de translasyon sürecine katılan taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) olarak verilebilir [43]. Gen düzenlemesinde, RNA işleme ve diğer görevlerde de yer alan kodlayıcı olmayan RNA'lar da vardır. Bazı RNA'lar diğer RNA moleküllerini kesme ve bağlama gibi kimyasal reaksiyonları katalizleyebilir [82] ve ribozomdaki peptit bağı oluşumunun katalizlenmesinde bulunabilir [46]. Bu RNA türleri ribozim olarak adlandırılır.

2.4.2. RNA ile İlgili Önemli Buluşlar

RNA hakkındaki araştırmalar birçok önemli biyolojik keşfi beraberinde getirmiş ve çok sayıda Nobel Ödülünün alınmasını sağlamıştır. Nükleik asitler 1868'de Friedrich Miescher tarafından bulunmuştur ve çekirdekte bulunduğundan dolayı 'nüklein' olarak adlandırılmıştır [46]. Daha sonra bir çekirdeği olmayan prokaryotik hücrelerin de nükleik asitleri içerdiği keşfedilmiştir. 1939 yılında protein sentezinde RNA'nın rolü olduğu düşünülmekteydi [83]. Laboratuvarda RNA sentezlenebilmesine izin veren enzimi keşfeden Severo Ochoa 1959 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü kazandı (Arthur Kornberg ile paylaştılar) [84]. Bununla birlikte, Ochoa tarafından keşfedilen enzim (polinükleotid fosforilaz)'in RNA sentezinden değil, RNA bozulmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. 1956 yılında Alex Rich ve David Davies, yapısı X-ışını kristalografisi ile tespit edilebilen [85] ilk RNA kristalini oluşturmak için iki ayrı RNA ipliğini hibridize etti. Maya tRNA'sının 77 nükleotidden oluşan dizisi, Robert W. Holley tarafından 1965 yılında bulundu [86] ve bu Holley'e 1968 Nobel Tıp Ödülü'nü kazandı (Har Gobind Khorana ve Marshall Nirenberg ile paylaştılar). 1967 yılında, Carl Woese, RNA'nın katalitik olabileceği varsayımında bulundu ve yaşamın en erken formlarının (kendini kopyalayan moleküller) genetik bilgi taşımak ve biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek için RNA'dan yararlanmış olabileceğini -bir RNA yaşamı- öne sürdü [87, 88]. 1970'lerin başında retrovirüsler ve ters transkriptaz enzimi keşfedildi ve bu da ilk olarak enzimlerin RNA'yı DNA'ya (genetik bilgi iletimi için olağan rotanın tersi) kopyalayabileceğini gösterdi. Bu çalışma için David Baltimore, Renato Dulbecco ve Howard Temin 1975 yılında Nobel Ödülü kazandı. 1976 yılında Walter Fiers ve ekibi bir RNA virüs genomunun (bakteriyofaj MS2) ilk tam nükleotid dizisini belirledi [89]. 1977 yılında, her iki memeli virüsü ve hücresel genlerde intronlar ve RNA uç birleştirme keşfedilmiş ve bu da Philip Sharp ve Richard Roberts için 1993 Nobel ödülüyle sonuçlanmıştır. Katalitik RNA molekülleri (ribozimler) 1980'li yılların başında keşfedildi ve yine bu da Thomas Cech ve Sidney Altman'a 1989 Nobel ödülünü kazandırmıştır. Günümüzde genlerin RNA girişiminin bir sonucu olduğu bilinen, tanıtılmış genlerin bitkinin kendi benzer genlerini susturabildiği 1990 yılında *Petunia*'da bulunmuştur [90, 91]. Yaklaşık olarak aynı zamanda, şimdi mikroRNA denilen RNA'nın *C. elegans* gelişiminde rol oynadığı saptandı [92]. RNA girişimi konusundaki çalışmalarıyla ilgili Andrew Fire ve Craig Mello 2006 yılında Nobel ödülü aldı. Aynı yıl Roger Kornberg RNA'nın transkripsiyonu üzerine çalışmaları sonucunda Nobel alan diğer bilim adamıydı. Gen

düzenleyici RNA'ların keşfi genlerin susturulması için siRNA gibi RNA'dan yapılan ilaç geliştirme girişimlerine yol açmıştır [93].

2.4.3. RNA Safılaştırma Teknikleri

RNA güçlü bir biyolojik malzemedir. Doğrudan doğruya birçok biyolojik işlevleri yerine getirmede ya da kontrol etmede yer alan aktif bir moleküldür. Biyolojik hücrel süreçlerde mevcut bulunan RNA'nın çeşitli rollerinin açığa çıkarılması, hastalıkların teşhisi, anlaşılması ve tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Hemen her gün yeni bir ilacın bulunacağı ya da hastalıkların tedavisinde yeni yöntemlerin ortaya çıkacağını gösteren yeni çalışma ve araştırmalar rapor edilmektedir. Nitekim bazı çalışmalar bu hastalıkların bir gün etkili bir şekilde tedavi edileceğini gösterir şekilde umut vaat etmektedir. Hangi durumda olursa olsun RNA'nın ve işlevinin anlaşılması hayatın tam anlamıyla anlaşılması için gerekli olan anahtarlarından biridir.

Hücre içinde her biri çeşitli ve önemli işlevleri yerine getiren çok farklı RNA türleri bulunmaktadır. Bu RNA'ların rollerinin ortaya çıkarılması ve anlaşılması sadece biyolojinin daha iyi anlaşılması için değil, aynı zamanda gelişmekte olan tedaviler için de oldukça önemlidir. Bu rollerden bir kaçını saymak gerekirse RNA'lar transkripsiyonda (pri-RNA, mRNA), uç uca eklemeye (snRNA), çevrimde (translasyon) (tRNA, tmRNA) ve transkripsiyon sonrası düzenlemede (siRNA, miRNA) yer almaktadır.

Oldukça sağlam ve kalıcı olan DNA'nın aksine RNA yapısal olarak kararlı değildir. RNA aynı zamanda kırılabilir, elde etmesi ve tekrar eski haline getirilmesi zor olan bir moleküldür. Proteinler, hücre ile, dikkatli bir şekilde RNA'nın sentezinin ve bozulmasının denetlenmesi ve aktif olan proteinlerin kontrolü ile, RNA kullanılarak DNA'nın ifade edilmesiyle sentezlenir. "Eski" RNA hala proteinlerin önceki ifadelerinden elde edilirse yeni proteinlerin üretilmesi için RNA vasıtasıyla DNA'nın ifade edilmesi mümkün olamazdı. Sonuç olarak, hücreler, rutin olarak "eski" RNA'yı RNaz enzimi kullanarak uzaklaştırmaktadır (yok etmektedir). Ne yazık ki, biyolojik hücre işlevi için mevcut olan RNaz aynı zamanda RNA toplamayı zorlaştırabilir ve bu toplama ve kullanım için kullanılan herhangi bir işlemde bunların dikkate alınması gerekmektedir [94].

RNA için kullanılabilir çok sayıda kit bulunmaktadır. Buradaki tehlike bir kitin tam olarak çözülmesi gereken probleme uymaması veya probleme uygun kitin henüz elde edilememiş olmasıdır.

Çizelge 2.2. RNA elde etmede kullanılan izolasyon teknikleri (nt: nükleotid, PAGE: poliakrilamid jel elektroforezi, cGMP: en son elde edilen üretim uygulaması) [47].

Yöntem	Prensip	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynaklar
Asit guanidinyum Tiyosiyanat-fenol-kloroform	Kaotrop hücre lizisine yardımcı olur ve RNaz'ları inaktive eder. DNA ve proteinler denatüre edilir ve asit ve fenol / kloroform ekstraksiyonu sırasında organik fazda uzaklaştırılır. RNA alkol ve tuz ile çöktülür.	Ucuz, RNaz'lara karşı gelişmiş koruma, İyi verim ve saflık	Toksik kimyasalların gereksinimi, Zaman alıcı işlem, Son derece operatör bağımlı, Enzim aktivitesini inhibe etme	[95]
Silika saflaştırması	Kaotrop hücre lizisine yardımcı olur ve RNaz'ları inaktive eder. Kaotrop varlığında, polianyonik RNA ve DNA hidrojen bağı etkileşim yolu ile silika partiküllerine bağlanır. DNA DNaze ile parçalanır. Kirlenici maddeler yıkanır ve RNA düşük iyonik şiddet ile elue edilir.	Hızlı, Organik çözücü ya da alkolle çöktürme gerektirmez, Otomasyona tabi	Düşük bağlama kapasiteleri, Katı yüzeylere adsorpsiyon / desorpsiyon mekanizmalarına dayanan saflaştırma, DNA veya RNA arasında ayırım yapmaz, DNaz muamelesi gerektirir	[96]
Preparatif denatüre edici PAGE	Molekülleri elektrik yüklerine ve zincir uzunluğunun bir fonksiyonu olan hidrodinamik özelliklerine göre ayırır. Arzu edilen RNA, jel matrisinden ayrılır, konsantre hale getirilir, tampon içinde dengelenir ve tekrar katlanır.	Yüksek düzeyde saflaştırılmış ürün	Zaman alıcı işlem, Kirlenici girişimi, Denatürasyon koşulları, kullanılır, Düşük verim	[97, 98]
Lityum klorür çöktürmesi	Uzun veya kısa RNA dizilerinin safsızlıklardan seçici olarak ayrılması. Yüksek konsantrasyonda LiCl, birkaç saat veya bir gece boyunca -20°C'de inkübe edilerek saf olmayan RNA preparatlarına ilave edilir. Çöktürülen veya üst faz gerekli RNA tipine göre elde edilir.	Küçük RNA'ların uzun RNA'lardan ayrılması, Uzun RNA'ların <i>in vitro</i> transkripsiyon sentez safsızlıklarından geri kazanımı.	Verimsiz çöktürme, Preparatlara lityum metali eklemek, İzolasyon geliştirmek için fenol / kloroform ekstraksiyonu yapmak, Zaman alıcı işlem	[99-102]

Bu işi yapmak için var olan kiti değiştirmek mümkün olsa da, araştırmacı kitin sahip olduğu kimyayı anlamadığında ya da gerekli kimyanın nasıl kontrol edildiğini, manipüle edildiğini ve duruma uygun hale getirilme işlemlerini bilmediğinde kit ile çalışmak sonuç verememektedir.

Bu kitlerde kullanılan kimyanın temelinde (i) katı-faz özütleme, (ii) sıvı kromatografisi ve/veya (ii) kimyasal reaktifler bulunmaktadır. RNA katı-faz özütleme ve sıvı kromatografisiyle RNA ayırma benzer ilkeler doğrultusunda faaliyet göstermektedir. Katı-faz yüzeyler, çekme veya kromatografi ortamındaki fonksiyonel gruplarla RNA molekülleriyle etkileşmektedir. Ortamın yüzey kimyası iki durumda da oldukça benzer olabilir veya bazen aynı bile olabilir. Her iki teknoloji de yüzey ile RNA'nın kimyasal etkileşimine benzer yöntemlerle çalışılır. Ayrıca, bu etkileşimleri kontrol etmek ve çalışan RNA malzeme miktarlarını toplamak için kullanılan yöntemlerin her ikisi de benzerdir. Katı-faz özütleme ve sıvı kromatografisi arasındaki fark molekül sınıflarının ayrılıp ayrılmaması veya bireysel moleküller üzerine yüksek çözünürlükte ayrımların gerçekleştirilip gerçekleştirilemediğidir. Katı-faz özütleme RNA'nın belirli bir tür veya sınıfını çekmek için kullanılabilirken, kromatografi, sınıfları veya tek tek molekülleri ayırmada kullanılabilir. Bununla birlikte, her iki teknoloji de yüzey ile RNA arasındaki benzer kimyasal etkileşim yöntemleriyle çalışır. Bu etkileşimi kontrol etmek ve çalışan RNA malzeme miktarlarını toplamak için kullanılan yöntemler de benzerdir. [94].

2.4.3.1. Farklı Kolon Türleri ve Eluent Kimyası

Sıvı kromatografisinin, proteinlerin ayrılması, organik ve inorganik iyonlar, küçük organik moleküller, karbohidratlar ve amino asitler de dahil olmak üzere pek çok uygulama türleri için kullanılabileceği özellikle son 20 yılda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [103-107]. Nükleik asitler gibi büyük biyolojik moleküllerin ayrılması kolon kimya ve enstrümantasyon tekniklerinden daha sonra gerçekleştirilmiştir.

RNA, kromatografik koşullar altında ayrılması en zor olan malzemelerden biridir. Bunun bir nedeni RNA'nın son derece büyük bir molekül olması ve RNA türleri arasındaki farkların neredeyse yok denecek kadar az olmasıdır. RNA molekülleri, çökmesine ya da geri dönüşü olmayan boru, cam hamuru, kolon ya da kromatografik sisteminin diğer bileşenlerine adsorbe olmasına neden olan kirlenmelere maruz kalmaya oldukça açıktır. Son olarak bilinmelidir ki RNA doğada çok hızlı parçalanır ve tekrar kararlı hale gelmesi ya da getirilmesi oldukça güçtür. RNA Kromatografisi ise bu

güçlüklere bir çözüm yolu bulmaya çalışmaktadır. Bu ayırma işlemi RNA moleküllerinin ayırma işleminden önce kararlılığının sağlanması ve ayırma işlemi boyunca ve bittiğinde de toplanan RNA'nın yine kararlılığının korunmasını içermektedir. Buradaki sorun her yerde ribonükleaz (RNaz) enzimlerinin olması ve dolayısıyla RNA yıkımını önlemek için onların kontrolü veya uzaklaştırılması gerekliliğidir.

Kolon içinde yer alan adsorban, kolon seçiciliğini sağlayan işlevsel grupların bağlı olduğu çekirdek bir substrat yapısına dayanmaktadır. Substrat (ya da seçici bağlanmayı sağlayan yapı-ligand) eş biçimlilik, boyut, kimyasal ve mekanik kararlılık ve parçacık yüzeyine uygun işlevsel grupları bağlama kolaylığı kriterlerine göre seçilir. Katı-faz alt-substrat malzemeleri genellikle silika, polimer ya da agaroz çekirdek parçacıklarına dayanmaktadır. İnert olma ve pH kararlılığındaki problemlerden dolayı polimer bir substrat genelde RNA kromatografisi için kullanılırken RNA Afinité Kromatografisi genelde agaroz temelli substratlar ile uygulanır.

Ayrılması istenen bileşiğin türüne ve istenen ayırıştırma mekanizmasına göre iyon-değişimi, ters-faz ya da afinite kimyasal gruplar bu çekirdek substrat yapılara bağlanabilir. Tüm bu gruplar, RNA ayırma işlemi için kullanılmaktadır.

Bu seçiciliğin kontrolü tuz, tampon, asit, baz ve farklı organik çözücüler de dahil olmak üzere bileşikler kolondan aşağı akıtmak için kullanılan farklı türde yıkama çözeltisi kullanılarak sağlanır. Seçicilik, numune bileşiğin kolon ya da membran üzerine adsorbe edilebilirliğine ya da elüsyon çözeltisi içerisinde çözünebilmesi ya da desorbe olabilirliğine göre seçilmektedir. Ayırma devam ettikçe eluent bileşimini değiştirmek için kullanılabilen basamaklı veya doğrusal gradyanlar bir bileşiğin kolon aşağı doğru hareket ettiği ya da kolonda tutunduğu konusunda ek kontrol sağlayabilir. Membran ile ayırım yapıldığında ise bu tür bir gradyana gerek kalmayacaktır. Genellikle kolon üzerinde, numune bileşiğini korumak için bütün safsızlıkların ilk olarak yıkanması avantajlıdır. Daha sonra koşullar değiştirilerek yıkama kolaylıkla sağlanmaktadır [94]. Membranlarla yapılan ayırma işleminde ise yine yıkama çözeltisindeki ya da numunedeki safsızlıklar bir kolon yardımıyla uzaklaştırıldığında yüksek çözünürlükte analizler yapmak mümkün olacaktır.

2.4.3.2. RNA Kromatografisi

1960'ların sonlarında başlayan sıvı kromatografisi geliştirilmiş teori ve cihaz kullanımı ile aniden ve büyük ölçüde değişmiştir. Bunun bir sonucu olarak, sıvı kromatografisi

yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak yeniden adlandırılmıştır. Bir süreç olarak HPLC, geliştirilmiş otomatik pompa ve dedektörleri ile birlikte, organik alkil gruplarının bağlı katmanlarına sahip silika dolgu malzemelerinden oluşan yüksek performanslı kolonlar yapılmaya başlanmış ve 1960'ların sonu ve 1970'lerin başında tamamen ticari hale gelmiştir. Bu yeni dolgu malzemeleri onlara küçük paslanmaz çelik kolonlara muntazam bir şekilde dolgu elde etme olanağı sağlayan küçük parçacık boyutuna (ortalama 10 µm) sahiplerdi. Bu gibi kolonlar malzemelerin daha çok sayıda bandın ayrılması ve daha küçük elüsyon hacimlerinin kullanılmasına olanak verecek şekilde çok sıkı bantlara ayrılmasına izin vermektedir. Buna ek olarak, yeni cihazlar gradyan yıkama teknolojisinin kullanımı ile ayrımların geliştirilmesini sağlamaktadır.

Sıvı kromatografisi cihaz sistemleri bir pompa, bir enjektör, bir kolon ve bir dedektör kullanmaktadır:

- Pompa yıkama sıvısının, doğru bir şekilde, düzgün, az titreşimlerle ve yüksek geri basınç şartlarında (normalde 1000-2000 psi), hassas bir şekilde kolon üzerinden otomatik olarak pompalanmasını sağlar.
- Enjektör kolona giren yıkama sıvısı akışının içine numunenin kesin ve doğru bir şekilde enjeksiyonunu sağlar.
- Dedektör kolondan ayrılan malzemenin sürekli olarak algılanması ve otomatik kaydını sağlar.

Cihaz ve kullanımındaki gelişmeler HPLC başarısı için büyük ölçüde önemli yere sahiptir. İyi işleyen bir sistemin anahtarı kolon ve kolon ile birlikte etkileşime giren bileşen karışımları ve elüsyon sıvısıdır. Bugüne kadar, kromatografik araştırmalarında en önemli atılımlar kolon ile elde edilmiştir. Günümüzde eğilim genellikle 2 µm boyutuna sahip kolon dolguları ile ayırma sağlayan daha küçük parçacıklara doğru kaymaktadır. Aslında, yeni kolonlar hiç parçacık içermemektedir, ancak sadece küçük bir kılcal kolonu dolduran sürekli gözenekli polimer monolit bir çubuktan oluşmaktadır. [94]. Bu tez kapsamında geliştirilmiş olan kriyojel malzeme HPLC kolonlarında kullanılabilir hale getirildiğinde seçicilik ve geri kazanım konusunda kayda değer sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

DNA ve RNA kromatografisi ilk kez 1993 yılında Günther Bonn, Christian Huber ve Peter Oefner tarafından ortaya atılmıştır [108-110]. İyon-eşleştirme ve ters-faz kromatografisini kullanan bu yöntem tek- ve çift-sarmallı DNA'nın hızlı ve yüksek çözünürlüklü ayrımlarında kullanılmıştır. Ayrıca, ayırma genellikle 10 dakikadan daha

az bir zaman içinde gerçekleşmiş ve birçok durumda tek bir baz çifti uzunluğundaki farklı parçaların bir çözeltisi elde edilmiştir. HPLC analizinin bu formu (tamamen olmasa da) büyük ölçüde C18 alkil grupları ile işlevselleştirilmiş olan gözeneksiz, polistiren-divinil benzen polimer taneciklerin eşsiz ayırma özelliklerine dayalıdır. Bu işlemde, bir DNA örneği HPLC cihazına verildiğinde bir alkil amonyum tuzu (genellikle trietil amonyum asetat; TEAA) nötral iyon çiftleri oluşturmak üzere yıkama sıvısına ilave edilir. DNA ve RNA bölümleri önce bir kolon üzerine adsorbe edilir ve daha sonra daha küçük bölümlerin kolondan ilk olarak yıkanmasıyla ve sonrasında da daha büyük parçaların çıktığı, su ve asetonitril gradyanı ile ayrılmaktadır.

Aynı teknolojinin tek- ve çift-sarmal DNA ve RNA ayrılması için de etkili olduğu gösterilmiştir. Kullanılan yıkama sıvısının tipine bağlı olarak, tek sarmal ayırma molekülün büyüklüğü, polarite ve şekil farklılıklarına dayanmaktadır. Daha fazla polar olmayan bir yapı olması için iyon-eşleştirme reaktifi değiştirildiğinde ayırma daha çok boyut temelli olmuştur. Sıcaklık özellikle tek sarmal RNA için önemli bir parametre olurken, çift sarmal DNA ayırma genellikle boyut temellidir. Çift sarmal RNA ayırma RNA molekülünün büyüklüğü ve şekline bağlıdır [94].

Genel olarak kullanılan iyon-eşleştirme reaktifleri nükleik asidin fosfat anyon grubu ile bir polar olmayan iyon çifti oluşturan amin katyon tuzudur. TEAA (en sık kullanılan amin katyonu), sonrasında kolonun nötr apolar yüzeyine tutunan apolar iyon çiftleri oluşturmak için nükleik asit bölümleri ile eşleşebilme yeteneğine sahiptir. TEAA / nükleik asit iyon çifti bölümleri kolondan ayrıştırılana kadar polaritesini azaltmak için daha sonra yıkama sıvısına yavaş yavaş asetonitril eklenir. Gradyan yıkamada kolondan pompalanan asetonitril derişimi ayırma ilerledikçe yavaş yavaş artırılır; bu koşullar altında öncelikle daha küçük bölümler yıkanır ve asetonitril derişimindeki artışa paralel olarak giderek artan boyutta bölümler elde edilir.

RNA nükleik asit bölümleri, normal olarak kromatografik bir yöntem ile ayrılabilen birimlere göre çok büyük moleküllerdir. Örneğin, bir RNA baz çiftinin ortalama molekül ağırlığı yaklaşık olarak 660 g/mol iken çift sarmallı 100 baz-çiftinden oluşan bir RNA molekülü 66 kDa'lık ortalama bir moleküler ağırlığa sahiptir. Normal olarak 1000 baz çifti bölümü, ve hatta 2000 baz bölümüne kadar, RNA Kromatografisi kullanılarak ayrılabilir. Geliştirilen nükleotid takılı katı destek yapıları bu işlemleri nispeten daha kolay ve kısa zamanda elde etmeyi sağlayacaktır. Bu süreçte, çok hızlı bir gradyan programı (örneğin, 3-5 dak.) kullanmak mümkün olmasına rağmen bu tür hızlı bir

elüsyon programı daha düşük bir çözünürlük pahasına mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte, ayrılacak karışımın karmaşık olmadığı birçok durumda bu yeterli olacaktır. 20-30 dakikalık daha yavaş bir gradyan süreci, en yüksek çözünürlük ve en büyük ayırma pikini verecektir, ama uzun bir analiz sürecinde geri kazanım verimi önemli ölçüde azalacaktır [94].

RNA Kromatografinin en güçlü özelliklerinden biri de malzemenin kolaylıkla dedektör çıkış maddesinden doğrudan toplanarak saflaştırılabilir olmasıdır. Özellikle, belirli bir nükleik asidin çeşitli türlerini içerebilen biyolojik numunelerin saflaştırılması istenebilecektir. Diğer bir nokta ise RNA gibi malzemelerin elde edildikten sonra (enzimatik bir işlem yoluyla) bozunabilir olmasından dolayı; çöktürme veya malzemenin yüzeye kaplanması yoluyla yapılan yoğunlaştırma (deriştirme) işlemi boyunca meydana gelen madde kaybı sebebiyle yüksek oranda geri kazanımlardan bahsetmek zordur. Bu kromatografi yönteminin geliştirilmesi ve yeni nesil polimerik malzemelerin elde edilmesiyle bu tür zayıf yönler bertaraf edilebilecektir.

RNA parçası toplamadaki diğer bir önemli nokta da toplama zamanının dikkatli bir şekilde yönetimidir. Çünkü her zaman pikin elde edildiği an ile parçanın toplayıcı proba ulaştığı an arasında mutlaka bir duraklama zamanı vardır. Süreli toplama en çok güvenilen yöntem olmasına rağmen, zamanlama doğru olmaz ise pikin bir kısmını hatta tamamı kaybedilebilir. Dedektör hücresinden de pozisyon probunun ucuna kadarki boruda ölü hacim olduğunu ve bu hacim çok büyük olursa bu ayırma çözünürlüğünü yok edeceğini ve hatta ilgilenilen pikin komşu pikler ile çapraz kirliliğe uğrayacağını da değerlendirmek gerekmektedir. Normal olarak bölüm toplayıcı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilse bile piklerin elde edilmeleri arasında probun temizlenmesi de önemlidir. Kesikli sistemde yapılacak bir ayırma tekniği bu tür yönleri de iyileştirebilme yeteneğine sahip olacaktır.

2.4.3.3. RNA'nın Enzimatik Muamelesi ve Analizi

RNA, DNA yinelenmesi (replikasyonu), protein çevrimi (translasyon) ve gen ifadesinin düzenlenmesi de dâhil olmak üzere her temel biyolojik süreçte açık bir işleve sahiptir. RNA, prebiyotik dünyada yaşam için önemli moleküllerin en eskisi olduğunu gösteren çok fazla kanıtı sahip olan eski bir moleküldür. Son yıllarda, RNA ile ilgili araştırmalara artan ilgi kromatografik ayırma işlemlerindeki gelişme ile hızlı bir şekilde devam etmektedir. Bununla birlikte, yeni keşifler her zaman tetikleyici olmuştur.

Çizelge 2.3. RNA elde etmede kullanılan saflaştırma teknikleri (PAGE: poliakrilamid jel elektroforezi, SEC: Boyut dışlama kromatografisi, dsRNA: çift sarmal RNA, SPE: katı faz ekstraksiyonu, DEAE: dietilaminoetil) [47].

Kromatografik yöntem	Matris işlevselleştirilmesi	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynaklar
Ters-faz	Hidrokarbon zincirleri (normal olarak C8 veya C18) ile modifiye edilmiş silika	Hidrofobite farkına dayalı, Yüksek çözünürlük, Etkin saflaştırma	Kısa RNA dizileri (<50nt) ile sınırlı, Toksik kimyasalların gereksinimi, Denatüre edici koşulların kullanımı	[111]
İyon-eşleme ters-faz	Polistiren-divinil benzen küreler	SEC ile kombinasyonu biyolojik kodlamayan RNA'ların saflaştırılması, Preparat düzeyinde sentetik mRNA saflaştırılması, Denatüre edici olmayan koşullar, Daha basit çözümlerin kullanımı	Ölçeklendirme zorluğu, Toksik çözümlerin kullanımı	[112-114]
Jel filtrasyon	Çapraz bağlı dekstran Çapraz bağlı agaroz jel	HPLC ile artırılmış oligoribonükleotitlerde son parlatma kademesine kadar güçlü, <i>In vitro</i> olarak kopyalanmış RNA'nın preparatif PAGE saflaştırmasına etkili bir alternatif, Denatüre edici olmayan koşullar	Zaman alıcı işlem, Büyük oranda operatöre bağlı olma	[115-117]
Anyon-değişimi	Polistiren/divinil benzen poli(metil metakrilat) poli(glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) (güçlü dördüncül amin ile)	Ayrılmış tek sarmal yerine sentetik dsRNA saflaştırılması, <i>In vitro</i> olarak kopyalanmış RNA'nın preparatif PAGE saflaştırmasına etkili bir alternatif, Denatüre edici olmayan koşullar, Monolitik kolonlar kullanılarak dsRNA'nın büyük ölçekli hazırlanması	RNA katlanması kromatografik koşullardan dolayı tehlikeye düşebilir.	[102, 118, 119]
	DEAE Sefaroz	<i>In vitro</i> olarak kopyalanmış RNA'nın preparatif PAGE saflaştırmasına etkili bir alternatif, Doğal olarak katlanmış RNA, Denatüre edici olmayan koşullar, Ölçeklendirme imkanı	Saflaştırmayı sağlamak için seri bağlanmış 3 kolon, Homojen uçlarına sahip RNA'ları saflaştırmama	[120]
	Lateks kaplanmış monolit anyon-değişimi (Dördüncül amonyum iyonu, dietil metil amin)	Kısa sentetik RNA'ları izomerlerinin safsızlıklarından ayırma, Terapötik sentetik RNA'ların karakterizasyonu ve değerlendirilmesi, Yüksek verimlilik ve kapasite, Laboratuvar ölçeğinde	Ölçeklendirme zorluğu	[121]

Çizelge 2.4. RNA saflaştırılması için kullanılan afinite kromatografi teknikleri (cGMP: en son elde edilen üretim uygulaması, PAGE: poliakrilamid jel elektroforez, SRP: sinyal tanıma partikülü, ncRNA: kodlamayan RNA, rRNA: ribozomal RNA, SPE: katı faz ekstraksiyonu) [47].

Afinite türü	Prensip	Avantajlar	Sınırlamalar	Kaynaklar
Baz eşleme	mRNA molekülü üzerinde mevcut olan poli(A) kuyruğu özel olarak hareketsiz oligo (dT) ile etkileşime girer.	Yüksek mRNA verimi ve cGMP kalitesi, Toplam RNA'nın ara izolasyonu olmaksızın kullanılabilirlik	Poliadenillenmeyen mRNA'nın izole edilememesi	[122]
Afinite kuyrukları	İlgilenilen RNA Sephadex ya da streptavidin reçinelere sıkıca bağlanan işlenmiş oligoribonükleotid dizileri (aptamerler) ile etiketlenir.	Hücre lizatlarından RNA izolasyonuna olanak tanır, Doğal biyolojik etkileşimlere dayalı afinite etiketlerini kullanan sağlam metodolojiler, Afinite etiketlerinin kararlılığı, Reçineler için yüksek afinitelere sahip etiketlerin özel seçimi nedeniyle yüksek geri kazanım	Yüksek geri kazanımlar için birbirini izleyen saflaştırmalar, Geri kazanımda denatürasyon koşullarının kullanımı, RNA'ya afinite etiketinin eklenmesinde sorunlar	[123, 124]
	Sırayla, bir matris ya da ticari Ni ²⁺ -afinite kolonu üzerine immobilize edilmiş <i>Tetrahymena thermophile</i> M4 SRP RNA afinite etiketlerini ya da ilgi konusu RNA'ya dahil olmuş MS2 kaplanmış protein bağlayan kök-döngüleri özel olarak tanır.	<i>In vitro</i> transkripsiyonu ile hazırlanan RNA'nın saflaştırılmasında preparatif PAGE için etkili bir alternatif, Doğal biyolojik etkileşimlere dayalı afinite etiketlerini kullanarak sağlam metodolojiler, Yüksek kazanımlar	Zaman gerektiren tasarım koşulları, Afinite etiketlerinin kararsızlığı	[125, 126]
Amino asitler-RNA	İmmobilize amino asit histidin veya arjinin ile RNA molekülleri arasında çoklu etkileşimler meydana gelir.	Tek bir RNA türü izolasyonu, Tek bir işlemde ncRNA ve rRNA'nın eşzamanlı izolasyonu, Biyolojik toplam RNA'nın fenol/kloroform ve SPE ile saflaştırılmasına etkili bir alternatif, RNA saflaştırmada çok yönlülük, Kararlı ligandlar, Yüksek geri kazanım verimleri	Yüksek tuz konsantrasyonu gereksinimi (Histidin için)	[127, 128]

Okazaki parçaları olarak adlandırılan kısa RNA öncülleri (primerleri), DNA kalıbını kopyalamak için DNA polimeraz enziminin gerekliliği ve DNA yinelenme (replikasyon) işlemindeki rolü RNA'ya olan ilginin ilk ve önemli bir sebeplerden biridir. Bunu tRNA'nın genotip ve fenotip arasında köprü oluşturan adaptör molekülü olarak hizmet ettiğinin keşfi izlemiştir. Son zamanlarda, RNA'ların çevrim (translasyon) düzeyinde gen ifadesini düzenleyebileceklerinin keşfi, zaman içinde, ilaç tedavisinin bazı mekanizmaları ile

ilgili olarak ilginç ve potansiyel kavramlara kapılarını açabilecek olan başka bir biyolojik karmaşanın olduğu alanı doğurmuştur.

RNA'ların kendileri ve hizmet ettikleri süreçler ile ilişkili her çeşitlilikte varılan son, tüm RNA'lar için altı çizilecek noktanın hepsinin kendine özgü bir yapısının olduğudur. 3 boyutlu katlanma yeteneğine sahip yapıları onlara geniş bir fonksiyon yelpazesinde performans sağlar. Genellikle çift-sarmal olarak bulunan DNA'nın aksine, RNA tek sarmaldır. Katlanma mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, moleküle şeklini veren uzun mesafeli molekül içi (intramoleküler) etkileşimler yapma yeteneğine sahiptir. Ayrıca çeşitli RNA moleküllerinin şekillerinin ve bunların işlevleriyle olan ilişkilerinin anlaşılmasıyla sadece temel biyolojik süreçleri anlamak mümkün olmakla kalmaz; aynı zamanda gerçekçi ilaç tasarımı için de bir temel sağlanmış olur [94].

2.4.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA analizinde kullanılan en güçlü yöntemlerden biri de jel elektroforezidir. Bu teknikte, moleküller arasındaki çok küçük farkları ayırma yeteneğine sahip oldukça uzun jeller olmak üzere, yüksek derecede çapraz bağlı ve düzgün jel matrisler kolaylıkla oluşturulur. Aslında, agaroz jellerin ayırma kapasitesi, sadece tek bir nükleotid ile uzunluğu değişebilen moleküllerin çözünürlüğünü elde etmemizi sağlar. Jel elektroforezinde, RNA numunesi bir uçta jele yüklenir ve RNA'nın jel ile hareket etmesini sağlayan bir elektrik akımı uygulanır. Bunun için, RNA-numune karışımı bir uçta jele yüklenir ve bir elektrik potansiyel jelin her iki ucuna da uygulanır. Negatif yüklü katot elektrot jelin numune olan ucuna ve pozitif yüklü anot da diğer ucuna uygulanır. 1-3 kV 'lık bir potansiyel uygulandığında, RNA bölümleri jel içinde negatif yüklü anoda doğru hareket ederler. Daha küçük RNA bölümleri, boyutları bazında ayrılması gereken tek parça türlerin ayrılmasına neden olarak, jel boyunca daha hızlı bir şekilde hareket eder. Poliakrilamid jelleri uzunluk açısından sadece tek nükleotid varyasyona sahip RNA bölümlerini çözme yeteneğine sahiptir.

Yıllar boyunca, çok sayıda araştırma grubu jel elektroforezini etkili bir şekilde kullanmıştır. Tipik olarak, doğası değişmeyen jelin, jel içinde bir protein, örneğin jel-kaydırma kiti, belirli bir RNA ile etkileşime girip girmediğini belirlemek için kullanılabilir. Benzer şekilde, RNA uç uca ekleme, RNA'yı kısaltmak için tam uzunlukta bir substratın uç uca eklemeye maruz kalması ölçüsünde jel elektroforez kullanılarak analiz edilebilir. Radyoaktif fosfat ile RNA substratların enzimatik olarak uç-etiketleme işlemleri için de büyük bir hassasiyetle jel ayırma kullanılabilir [94].

2.5. Kriyojel Teknolojisi ve Polimerizasyonu

Yarı dondurulmuş şartlarda kriyojel üretimi sırasında büyüyen buz kristalleri gözenek yapıcı (porojen) olarak görev yapar. Oluşan kristallerin şekli ve boyutu numunenin çözünmesi sonrasında meydana gelecek gözeneklerin şekli ve boyutunu belirler. Bu son derece gözenekli polimerik maddeler, esas itibarıyla herhangi bir jel oluşturunca ve gözenek yapıcı maddeden üretilebilir [129]. Ayrıca, gözenek boyutunun kontrolü çeşitli biyolojik hedeflerin polimer omurgasına bağlanmış ligandların durumunu optimize etmeye izin verir. Potansiyel uygulamaya bağlı olarak, kriyotropik jelleşmenin teknolojik platformu, büyük gözeneklere ve hatta %90'a kadar gözenekliliğe sahip hücrelerin kromatografisi [130-132] için monolitik sabit faza ek olarak, potansiyel hücre iskeleleri [133-135] olarak ilgi çeken malzemeler üretmeyi sağlar. Daha küçük gözeneklere ve kalın gözenek duvarlarına sahip olan malzemelerin elde edilmesi de mümkündür. Hedef biyolojik moleküller [136] ile etkileşime girecek yeterince büyük ara yüzleri sağlayan kompleks aktif dolgu maddesi (kompozit kriyojel sistemleri)'ne sahip ya da mekanik tuzaklama aracılığıyla hücrelerin tutuklanması için kullanılabilen 1-2 mm civarında küçük gözenekli kriyojelleri bile elde etmek mümkündür [137]. Kriyojeller ve diğer makrogözenekli malzemeler (benzer büyüklükte gözeneklere sahip) arasındaki temel farklardan biri, kriyojellerin doku benzeri bir esnekliğe sahip olmaları ve tahrip edilmeden büyük çaplı deformasyonlara dayanabilmeleridir [138,139].

2.5.1. Kriyojellerin Gelecekteki Uygulamaları

Makrogözenekli kriyojellerin sahip olduğu kontrollü makrogözenek yapıları, biyouyumlulukları ve kimyasal ve mekanik sağlamlıkları gibi özelliklerinin eşsiz kombinasyonu mikrobiyal hücrelerin işlenmesi için üstün performans sergileyen makrogözenekli malzemelerin tasarımı için yeni fırsatların kapısını açmaktadır [140]. Hücrelerin tutuklanması ve kriyojellerin yüksek mekanik kararlılığa sahip olması için gerekli ılımlı koşullar sulu ve su açısından zayıf ortamlarda kullanılacak etkili biyokatalizörlerin hazırlanmasına izin verir. İlimli koşullar altında elastik kriyojellerden afinite-bağlı hücrelerin salıverilmesi (örneğin, kriyojelin mekanik sıkıştırılması yolu ile), yüksek bir kapasite (uygulanabilirlik) ve hücre kromatografisi süresince desorbe edilen hücrelerin yüksek oranda geri kazanımını sağlar [140]. Ayrıca, kriyojel monolitlerdeki birbirine bağlı büyük boyutlu gözenekler, sıvı fazın oldukça yüksek hacimlerinin hızlı bir şekilde işlenmesine izin verir. Bu nedenle, makrogözenekli kriyojel yapıdaki monolitik filtreler, hedef moleküle özgü ligandlar taşıyan, su atıklarındaki belirli hücrelerin analitik tayini veya seçici olarak yakalanabilmesi için kullanılabilir. Kriyojellerin kullanılması

mikrobiyal konsorsiyum bileşimlerini analiz etmek ya da kan veya idrarda patojenik hücrelerin tayini için öngörülebilir. Ayrıca, kriyojel kolon içinde hücrelerin tutuklanması bu tip bir kolondan hücre süspansiyonlarının pompalanmasıyla hücre-hücre etkileşimlerini incelemeye olanak sağlamaktadır [140].

Kriyojel matrislerdeki immobilize (tutuklanmış) mikrobiyal hücrelerin yüksek orandaki canlılığı bu matrislerin sürekli inokulum olarak kullanılmasını sağlar. Kriyojellerin fajlar ile bir araya getirilmesi özellikle biyomedikal alanında yeni analitik tekniklerin geliştirilmesi için ufuklar açabilir. Örnekler, farklı ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin taranması için kullanılacak afinite bağlayıcıların hızlı bir şekilde gelişmesini içermektedir.

2.5.2. Kriyojellerin Yapısal ve Adsorpsiyon Karakterizasyonu

Gözenek hacmi (V), özgül yüzey alanı (S), gözenek boyutu dağılımı (PSD), gözenek duvar kalınlığı dağılımı (PWTD), gözenek bağlantısı ve burulma gibi kriyojellerin yapısal özellikleri nesnel açıdan büyük önem taşımaktadır [141-146]. Gözeneklerin ve gözenek duvarlarının detaylı yapısına nano ölçekten ($0.4 < d_{\text{nano}} < 100 \text{ nm}$) mikro ölçeğe ($0.1 < d_{\text{micro}} < 100 \mu\text{m}$) ve hatta makro ölçeğe ($d_{\text{makro}} > 100 \mu\text{m}$) kadar özel bir ilgi gösterilmiştir. Ancak, kendi yumuşak doğası ve doğal halindeki güçlü hidrasyon yeteneğinden dolayı kriyojellerin niceleyici doku karakterizasyonu bazı zorluklar içermektedir. Bu nedenle yayınlanan çalışmalarda yapısal ve dokusal karakterizasyon sadece nitel ya da yarı-niceleyici seviyede gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyonun tipik örnekleri söz konusu parametreler (V , S , PSD ve PWTD)'in belirlenmesi olmaksızın ya da gözeneklerin ortalama boyutu ve gözeneklilik tahmini ile kurutulan veya dondurularak kurutulmuş kriyojellerin mikroskopik görüntülerini içerir. Ancak, bazı çalışmalarda, PSD ve diğer yapısal özellikler cıva porozimetri [147] ve görüntülerin analizi [142, 148-152] kullanılarak ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Nano gözeneklerden ($d_{\text{nano}} < 2 \text{ nm}$) $d_{\text{makro}} > 100 \mu\text{m}$ makrogözeneklere kadar toplam gözenek aralığının üzerinde doğal polimer kriyojellerin PSD'sini açıklayan birçok makale vardır [142, 149-152]. Bu çalışmalarda, yapısal karakterizasyon; konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), kriyo-SEM ve sonrasında gelen her iki doğal olarak hidratlanmış ve dondurularak kurutulan kriyojellerin mikroskopik görüntülerinin niceleyici analizleri olan diğer çeşitli mikroskopik tekniklere dayanmaktadır. Ayrıca, makrogözeneklerin duvarlarındaki dar gözenekler ($d_{\text{nano}} < 100 \text{ nm}$) DSC ve TG termoporometre, NMR kriyoporometre ve TSDC relaksometri kullanılarak analiz edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Maddeler

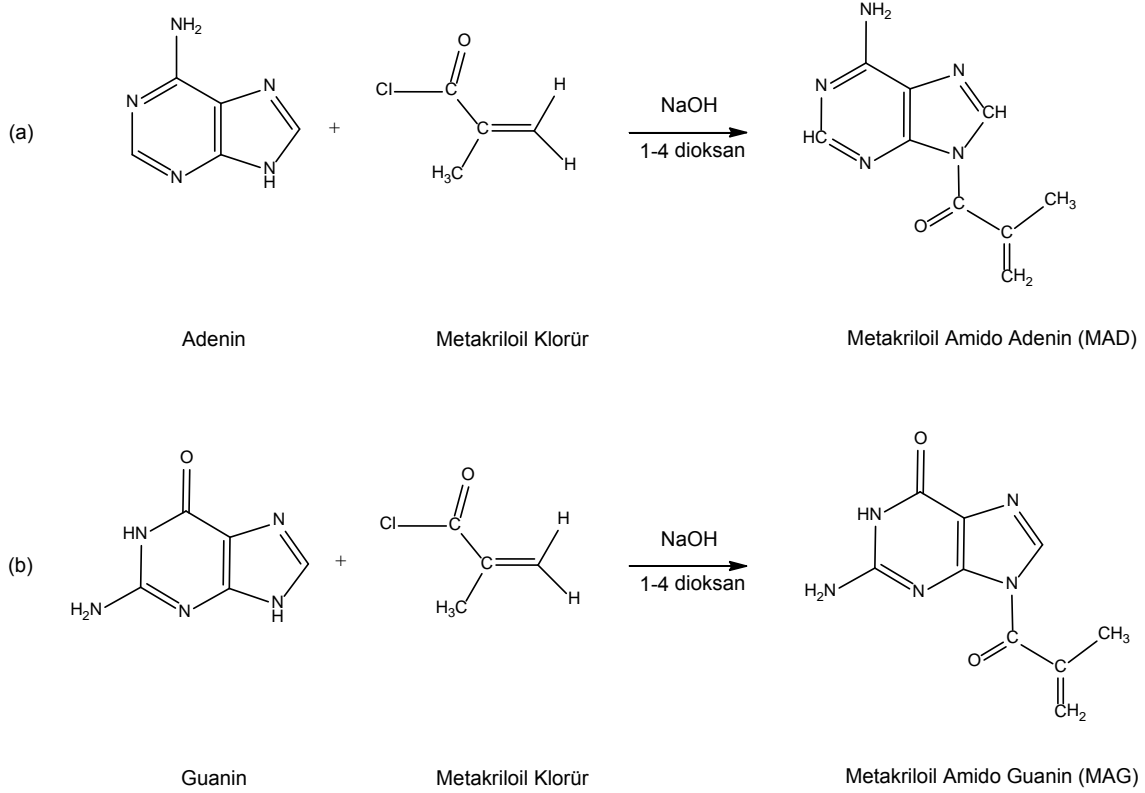
2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Sodyum lauril sülfat (SLS) Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. N-metakriloil adenin ve N-metakriloil guanin laboratuvar ortamında literatüre uygun şekilde sentezlenmiştir [153]. Monomerler kullanılıncaya kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. RNA (R6625-25G, Type VI, Torula Yeast) Sigma firmasından temin edilmiş ve -20°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) BioRad (Hercules, CA, ABD) firmasından temin edilmiştir. APS, kullanılabildiği kadar, desikatör içerisinde muhafaza edilmiştir. Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmos ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2. Kriyojellerin Hazırlanması

3.2.1. Fonksiyonel Monomerlerin Sentezi

Bu tez çalışmasında kullanılan N-metakriloil-adenin (MAD) ve N-metakriloil-guanin (MAG) monomerleri literatüre uygun şekilde sentezlenmiştir [153]. Bu amaçla öncelikle N-metakriloil benzotriazol sentezi gerçekleştirilmiştir. Benzotriazol (0.01 mol, 1.19 g) kuru toluen içerisindeki trietilamin (TEA) (0.011 mol, 1.11 g) kullanılarak çözüldü ve çözelti 0-5°C'ye kadar soğutuldu. Sabit karıştırma hızında damla damla adenin (0.01 mol, 1.35 g) veya guanin (0.01 mol, 0.15 g) eklendi. İlave işleminden sonra karışım 5 saat boyunca oda sıcaklığında reaksiyona sokuldu. Oluşan tuz çökeltisi süzüldü. Çözücünün, reaksiyona girmeyen TEA ve H-benzotriazol düşük basınç altında yağa benzeyen sarımtırak bir katı elde edene kadar damıtılmasıyla monomer (N-metakriloil adenin veya guanin) elde edildi.

Deneysel çalışma kapsamında, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'ın N-metakriloil-adenin (MAD) ve N-metakriloil-guanin (MAG) ile kopolimerizasyonu sonucu 6 çeşit kriyojel sentezlenmiş olup bu jeller dairesel membran şeklinde (çapı: 0.8 cm) kesilmiş ve köpürme bitene kadar defalarca distile su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1. a) MAD ve b) MAG sentezi

3.2.2. Kriyojellerin Sentezi

Kriyojellerin sentezinde uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: 2.45 mL HEMA, 2.55 mL distile su ve farklı oranlarda monomer (50-75-100 mg MAD ve MAG, ayrı ayrı) homojen bir çözelti elde edecek şekilde manyetik karıştırıcı içerisinde karıştırılmıştır. Sentezlerde kullanılan monomerler ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Organik faz olarak ise 0.5 g sodyum lauril sülfat, 0.6 mL EGDMA ve 9.40 mL distile su yine homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Elde edilen iki ayrı faz bir beher içerisinde karıştırılıp 20 dakika buz banyosunda soğutulmuştur. En son basamak olarak 10 mg amonyum persülfat ve 50 µL TEMED ilâve edilmiş ve iki cam plaka arasında dökülerek -12°C 'de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonra alınan kriyojeller iyice yıkandıktan sonra yuvarlak membranlar şeklinde kesilmiş ve polimerizasyona katılmayan monomerler veya sodyum lauril sülfatın temizlenmesi için 2 gün boyunca çalkalayıcıda saf su ile yıkamıştır. Sentezlenen bu kriyojeller buzdolabında saklanarak RNA adsorpsiyonu için deneysel uygulamalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kriyojellere ait sentez bilgileri.

Polimer kodu	HEMA (mL)	Monomer Türü	Monomer Miktarı (mg)
Poli(HEMA)	2.55	-	-
Poli(HEMA-MAD)-50	2.55	MAD	50
Poli(HEMA-MAD)-75	2.55	MAD	75
Poli(HEMA-MAD)-100	2.55	MAD	100
Poli(HEMA-MAG)-50	2.55	MAG	50
Poli(HEMA-MAG)-75	2.55	MAG	75
Poli(HEMA-MAG)-100	2.55	MAG	100

3.3. Monomerlerin ve Kriyojellerin Karakterizasyonu

Kriyojellerin sentezlenmesinde kullanılmış olan N-metakriloil-adenin (MAD) ve N-metakriloil-guanin (MAG) monomerlerinin yapı analizi nükleer manyetik rezonans NMR (Bruker 400 MHz, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çözücü olarak döteryumlu kloroform ($CDCl_3$) kullanılmıştır. Geriye kalan döteryumsuz çözücü ($CHCl_3$) iç referans olarak kullanılmış ve sonuçlar ppm (δ) olarak verilmiştir.

3.3.1. FTIR Analizi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin karakteristik fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi FTIR (Nicolet™ iS™10 FTIR Spectrometre, ABD) kullanılmıştır. Kriyojeller öncelikle kurutulup toz haline getirilmiş (yaklaşık 2 mg) ve toz halindeki kuru KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış pelet haline getirilerek FTIR spektrumları elde edilmiştir.

3.3.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin spesifik yüzey alanı, Brunauer-Emmett-Teller BET (AUTOSORP II 6B, Quantachrome Instruments, ABD) ile ölçülmüştür. Liyofilize edilmiş kriyojel numunelerinin gözeneklerindeki oksijen ve nemi gidermek için $135^{\circ}C$ 'de 10mbar vakum altında 6 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra numuneler oda sıcaklığında azot gazına tabi tutulmuştur. Azot adsorpsiyonu 77 K'de, desorpsiyonu ise oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu SEM (Carl Zeiss AG - EVO® 50 Series, Almanya) kullanarak incelenmiştir. Liyofilizasyon ile kurutulan kriyojel numuneleri SEM analizi için uygun

hale getirilmiş ve uygun miktar kriyojel örneği SEM tutucusu üzerine çift taraflı karbon bant ile yapıştırılmış ve ince bir altın tabakası ile vakum altında kaplanmıştır. Daha sonra elde edilen SEM numunesi cihaza yerleştirilmiş ve farklı büyütme oranlarında görüntüleri alınmıştır.

3.3.4. Termogravimetrik (TGA) Analiz

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin adenin ve guanin içeriğini saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı TGA (DTG 60H SHIMADZU, Japan) kullanılmıştır. Termo gravimetrik analiz 50 cm³/dak hava akış hızı ve 10°C/dak ısıtma hızıyla 0°C'den 900°C'ye ısıtılarak gerçekleştirilmiş ve ağırlık kayıpları izlenerek yapısal karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Şişme Testi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin şişme oranları distile su kullanılarak incelenmiştir. Deney şu şekilde yürütülmüştür: başlangıçta sabit kütleye kadar kurutulmuş kriyojel numuneleri dikkatli bir şekilde tartılmıştır (0.06 g) ve daha sonra su ihtiva eden 40 mL'lik bir beher içine yerleştirilmiştir. Numune, 30 dakika boyunca sabit bir sıcaklıkta (25 ± 0.5°C) bir izotermal su banyosu içine konulmuştur. Numune sudan çıkarılmış, bir filtre kâğıdı kullanılarak hızlıca yüzeydeki su uzaklaştırılmış ve tekrar tartılmıştır. Kuru ve ıslak numunenin ağırlık oranı kaydedilmiştir. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin su içeriği aşağıdaki ifade kullanılarak hesaplanmıştır;

$$Su\ tutma\ oranı\ \% = \left[\frac{(W_{ıslak} - W_{kuru})}{W_{kuru}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

W_{kuru} ve $W_{ıslak}$ sırasıyla kuru (su banyosuna atılmadan önce) ve ıslak (su banyosundan çıkarıldıktan sonra) kriyojel ağırlıklarını (g) göstermektedir.

Şişmiş kriyojellerin toplam hacmi yaklaşık olarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Numunenin ($m_{sıkıştırılmış\ jel}$) ağırlığı şişmiş jel matrisinin makrogözeneklerindeki serbest suyun sıkılarak uzaklaştırılmasıyla belirlenmiştir. Makrogözeneklilik oranının hesaplanması için, kriyojel 40 mL su içine atılmış ve daha sonra enjektör yardımıyla sıkılmıştır. Gözeneklilik aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

$$Makrogözeneklilik\ \% = \frac{(m_{şişmiş} - m_{sıkıştırılmış})}{m_{şişmiş}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

Tüm adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri için, sentezlenen kriyojellerin RNA adsorpsiyon kapasitelerini hesaplamada kullanılan absorbans verileri UV-VIS (Double Beam PCR 8 Scanning Auto Cell UVD-3200, Labomed, INC., ABD) cihazı kullanılarak 260 nm'de elde edilmiştir.

3.4.1. Poli(HEMA-MAD) Kriyojeller ile Adsorpsiyon Çalışmaları

Adsorpsiyon deneyleri için kesikli sistem tercih edilmiştir. Numuneler 1 mL RNA sulu çözeltisi (100 mg/L) ve 4 mL tampon (fosfat) çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. RNA çözeltisi ve tampon çözelti çalkayıcıda (100 rpm) 15 dak. karıştırılarak dengeye getirilmiştir. Daha sonra poli(HEMA-MAD) kriyojellerin ilâvesiyle adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$q = \frac{[(C_i - C_f) \times V]}{m} \quad (3.3)$$

Burada q adsorpsiyon kapasitesi (mg/g), C_i; RNA çözeltisinin adsorpsiyondan önceki derişimini (mg/L), C_f; RNA çözeltisinin adsorpsiyondan sonraki derişimini (mg/L), V; adsorpsiyon ortamının hacmini (mL) ve m ise adsorbanın miktarını (g) göstermektedir. Adsorpsiyon kapasitesine pH, etkileşim süresi, RNA çözeltisinin başlangıç derişimi ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

3.4.2. Poli(HEMA-MAG) Kriyojeller ile Adsorpsiyon Çalışmaları

Adsorpsiyon deneyleri için kesikli sistem tercih edilmiştir. Numuneler 1 mL RNA çözeltisi (100 ppm) ve 4 mL tampon (fosfat) çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. RNA çözeltisi ve tampon çözelti çalkayıcıda (100 rpm) 15 dak. karıştırılarak dengeye getirilmiştir. Daha sonra poli(HEMA-MAG) kriyojellerin ilâvesiyle adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi daha önce verilen Eşitlik 3.3'e göre hesaplanmıştır. Adsorpsiyon kapasitesine, pH, etkileşim süresi, RNA çözeltisinin başlangıç derişimi ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

3.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Kriyojellerden [poli(HEMA-MAD-100) ve poli(HEMA-MAG)-100], adsorplanan RNA moleküllerinin desorpsiyonu da kesikli sistemde çalışılmıştır. RNA adsorplanmış kriyojeller 0.1 M HCl çözeltisi bulunan 5 mL desorpsiyon ortamında, oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, RNA adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı membranlar kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. RNA desorpsiyon oranı Eşitlik 3.4'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \left[\frac{\text{Desorplanan RNA miktarı}}{\text{Toplam adsorplanan RNA miktarı}} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

3.5. Doğal Kaynaktan RNA Adsorpsiyonu

Doğal kaynaktan RNA adsorpsiyonu çalışmalarında bebeklerde akut gastroenterit hastalığına sebep olan Rotavirüsünün olduğu bilinen insan (3-5 yaş bebek) gaitası kullanılmıştır. Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılacak olan gaitanın %10 (pH:7.0, w/w) çözeltisi hazırlanmış ve sulu çözülden RNA adsorpsiyonu çalışmalarında tespit edilen optimum deney koşullarında adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller üzerinde doğal kaynaktan RNA adsorpsiyonun etkinliğini test etmek için karşılaştırma amacıyla ticari kit (BIONEER, ExiPrep™, Plus, Viral DNA/RNA) kullanılmıştır.

3.6. Elektroforetik Uygulama

Elektroforez, pozitif yüklü iyonların negatif elektroda ve negatif yüklü iyonların da pozitif elektroda hareket ettiği ve iyonların toplam yüklerine, boyutuna ve şekline göre sahip oldukları farklı hızlara göre ayrıldıkları, iyonların elektrik alandaki hareketine dayanan bir ayırma tekniğidir. Moleküllerin şekilleri ve boyutları farklı olacağından sadece kütlelerine göre değil şekillerine göre de farklı hızlarda hareket ederler. Bu da belirleyici bir faktördür. RNA'nın elektroforetik ayırımı için yatay agaroz jel elektroforez kullanılmıştır.

Jel ve yürütme tamponu hazırlamak için 100 mL 5X tris borat EDTA (TBE) stok çözeltisi 400 mL distile su içinde seyreltilerek 1X TBE çözeltisi elde edilmiştir. Hassas terazide 2 g agaroz tartılarak erlenmayer içerisine koyulmuştur. Agaroz üzerine 100 mL 1X TBE ilave edilmiş ve mikrodalga fırında en düşük sıcaklıkta agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtılmıştır. Agaroz tamamen çözüldükten sonra soğumaya bırakılmış, ancak yaklaşık 50°C'de katılaştıran agarozun katılaşmamasına dikkat edilmiştir. Jel, elektroforez tankı içindeki kalıba dökülmeden hemen önce içine renklendirici olarak 0.2 µL RNA boyası etidyum bromür (5 µL/10 mL) eklenmiştir. Kalıp içine taraklar yerleştirildikten sonra, hazırlanan jel dökülmüştür. Bu esnada oldukça yavaş ve dikkatli davranılarak jelde akım geçişini engelleyecek baloncuk oluşması önlenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dak. bekletilerek jelin katılaşması sağlanmıştır. Donduktan sonra taraklar çıkartılmış ve jel elektroforez tankı içine yerleştirilmiştir. Tankın içi jel yüzeyi kaplanana kadar 1X TBE tamponu ile doldurulmuştur. Kuyucuklara numune yükleme

işlemi için yükleme tamponu kullanılmıştır. Her numune 2 µL yükleme tamponu içinde dağıtılmıştır. Numunelerden 6 µL alınmış ve yükleme tamponu ile pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. Her agaroz jel kuyucuğuna 6 µL (yükleme tamponu ve numune) dağıtılmıştır. Saflaştırılan RNA, güç kaynağı çalıştırılarak 20 mA, 90V'de pozitif elektrota hareket ettirilerek 20 dak. yürütülmüştür. Jel tanktan çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde UV ışığı altında elde edilen bandların değerlendirilmesi yapılmıştır. İlk kuyucuğa moleküler yükleri tanımlamada yol gösterici olan marker yüklenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

RNA ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde sırasıyla çekirdek, mitokondri, kloroplast, ribozom, sitoplazma ve ribozomda bulunmaktadır. RNA'lar tek zincirli yapıdadır ve ribonükleotidlerin birbirlerine bağlanması ile meydana gelirler. En önemli görevlerinden birisi DNA'nın kopyalanarak çoğaltılmasıdır. Ayrıca protein sentezi ve hücre bölünmesinde de rol oynar. DNA moleküllerine göre daha kısadır. DNA protein üretirken kendisindeki kodun çoğaltmasına yardımcı olacak ara eleman ribonükleik asittir. RNA çoğunlukla tek sarmaldır. Hayatın genetik şifresinin aktarılmasında bu kadar önemli olan bir yapının en iyi şekilde incelenmesi ve çözülmesi gerekmektedir. Mutasyonlar, yanlış kodlamalar veya enzimatik hatalardan kaynaklanan genetik rahatsızlıkların da temelinde DNA ve RNA'da veya protein sentezinde meydana gelen aksaklıklar yatmaktadır. Bu tür konularda çalışmalar yapabilmek için gerekli olan RNA'nın en etkili, mali anlamda en iyi şartlarda ve en kısa yoldan elde edilmesi ayırma teknolojilerinin gelişmesiyle mümkün olacaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimatik, elektroforetik ve bazı kromatografik yöntemlerle [76] RNA saflaştırılması gerçekleştirilse de RNA'nın hassas bir molekül olması nedeniyle yeterli verim alınamamaktadır.

Bu tezde, RNA'nın etkin bir şekilde saflaştırılmasına yönelik monomer olarak nükleotid bazlarını (adenin ve guanin) içeren MAD ve MAG komonomerleri barındıran poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojeller hazırlanmıştır. Poli(HEMA)'nın temel bileşen olarak seçilmesindeki ana kriter önceden de bahsedildiği üzere inert olması, mekanik dayanıklılığı ve kimyasal ve biyolojik kararlılığıdır [154]. Bu işlemde, MAD ve MAG komonomeri hidrojen bağları kurarak hedef RNA ile etkileşim kuracak ve ligand immobilizasyonu için matriksin aktive edilmesine gerek kalmayacaktır. Ayrıca bu monomerlerin HEMA ile polimerize edilmesi ligand sızıntısı sorununu da ortadan kaldırmaktadır.

4.1. Monomerlerin ve Kriyojellerin Karakterizasyonu

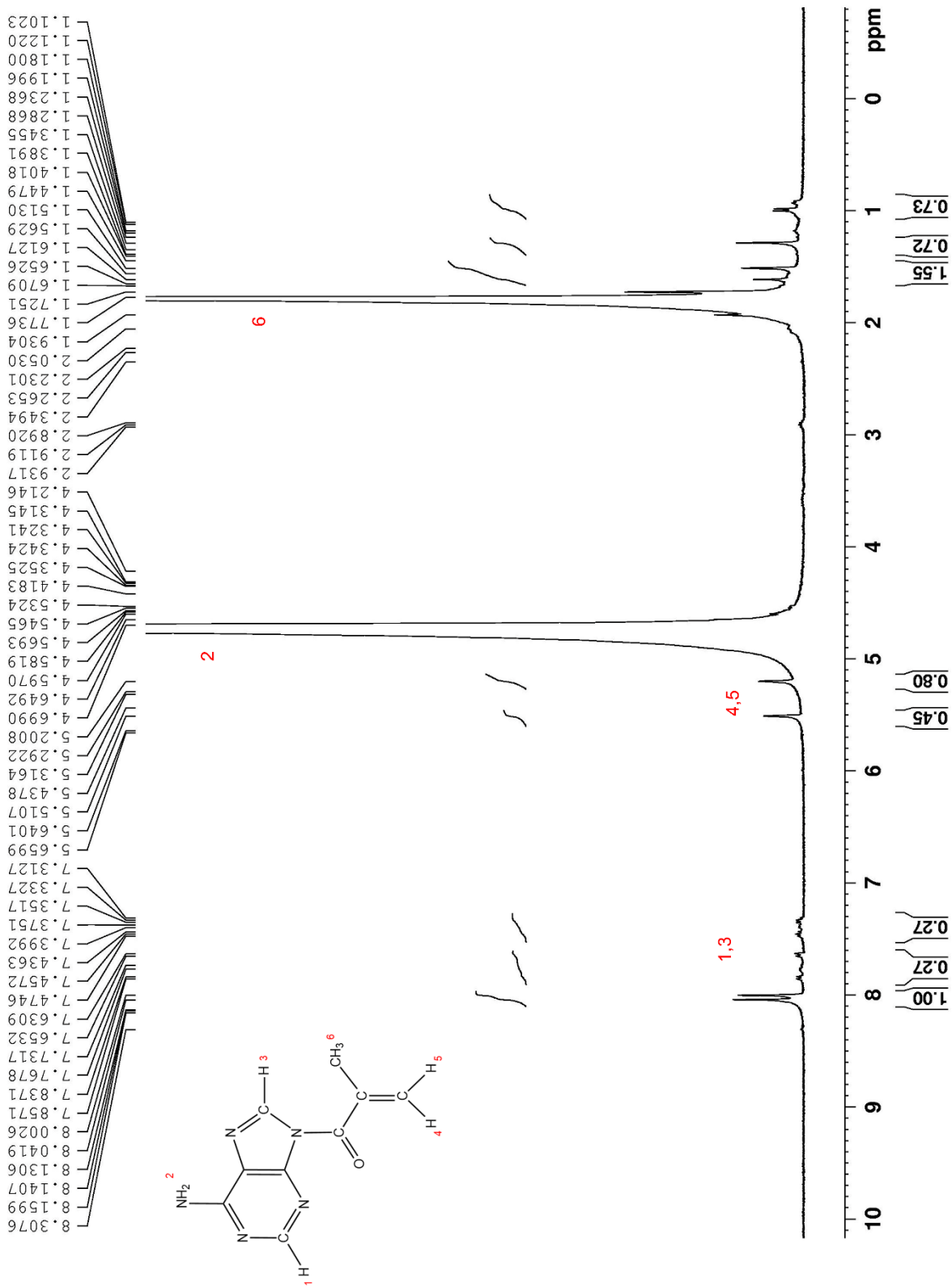
4.1.1. Monomerlerin Karakterizasyonu

MAD ve MAG monomerlerine ait ¹H-NMR verileri Şekil 4.1'de verilmiştir. ¹H-NMR analizi, adenin ve guanin yapılarındaki karakteristik pikleri göstermek ve yeni sentezlenen monomerlerin yapılarını aydınlatmak amacıyla yapılmıştır. Şekil 4.1a'da verilen MAD monomerine ait NMR spektrumundan elde edilen verilere göre; 8.16 ve 8.14'de görülen pikler aromatik halkalar üzerinde bulunan protonlara aittir. 5.20 ve

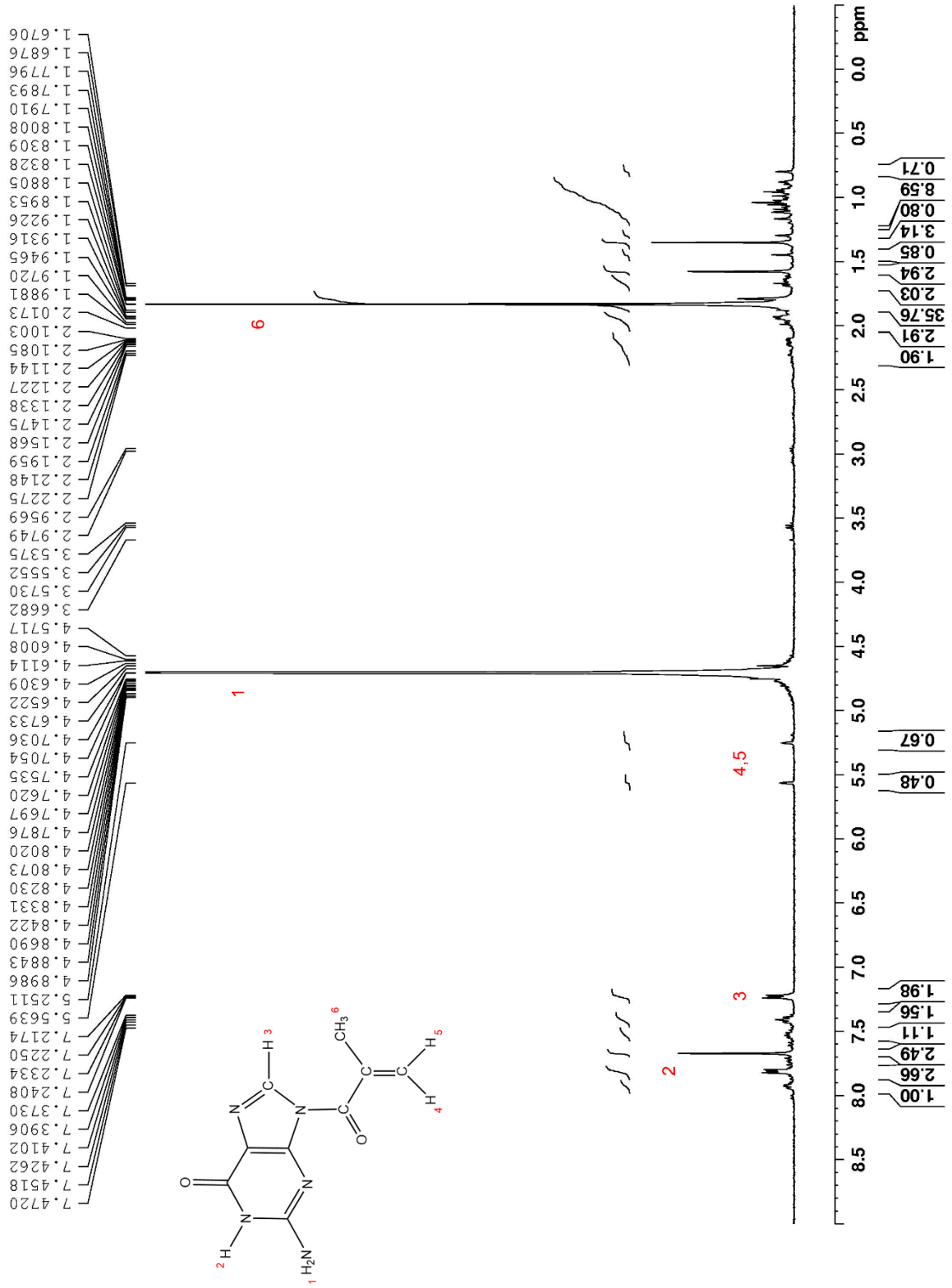
5.64'de gözlenen pikler ise yapıdaki olefinik protonlara aittir. Yapı içerisindeki CH₃ protonlarına ait pikler 2.5'de görülmektedir. Aromatik CH protonu ise düşük oranda 7.0 ve 8.0 aralığında rezonansa uğramıştır. Aromatik yapıdaki NH₂ protonları 4.5-5.0 arasında görülmektedir. Şekil 4.1b'de gösterilen ikinci grafik ise MAG monomerine ait NMR spektrumunu göstermektedir. Yine bu analizde de NH₂ protonları 4.5-5.0 arasında görülmektedir. 5.56 ve 5.29'da gözlenen pikler olefinik protonlardan kaynaklanan piklerdir. Yine bu yapının içerisindeki CH₃ protonlarına ait pikler 2.5'te görülmektedir. Bu verilerden sentezleme işleminin başarıyla gerçekleştirildiği söylenebilir.

Şekil 4.1a ve 4.1b MAD ve MAG monomerlerine ait FTIR spektrumlarını vermektedir. MAD monomerine ait spektrumdaki bandlar, primer (3421 cm⁻¹) ve sekonder amin gerilmeleri (3286 cm⁻¹), aromatik CH gerilmesi (3111 cm⁻¹), alifatik CH gerilmesi (2978 cm⁻¹), olefinik C=C gerilmesi (1994 cm⁻¹), amid (1 ve 2, 1648 cm⁻¹ve 1597 cm⁻¹), halka CH gerilmesi (1412 cm⁻¹ ve 1301 cm⁻¹), aromatik C-N=C gerilmesi (1366 cm⁻¹) ve C=O gerilmesi (1668 cm⁻¹)' dir.

MAG monomerine ait spektrumdaki bandlar ise, primer (3397 cm⁻¹) ve sekonder amin gerilmeleri (3274 cm⁻¹), aromatik CH gerilmesi (3147 cm⁻¹), alifatik CH gerilmesi (2948 cm⁻¹), olefinik C=C gerilmesi (1975 cm⁻¹), amid (1 ve 2, 1634 cm⁻¹ve 1554 cm⁻¹), halka CH gerilmesi (1403 cm⁻¹ ve 1372 cm⁻¹), aromatik C-N=C gerilmesi (1258 cm⁻¹) ve C=O gerilmesi (1671 cm⁻¹)' dir.

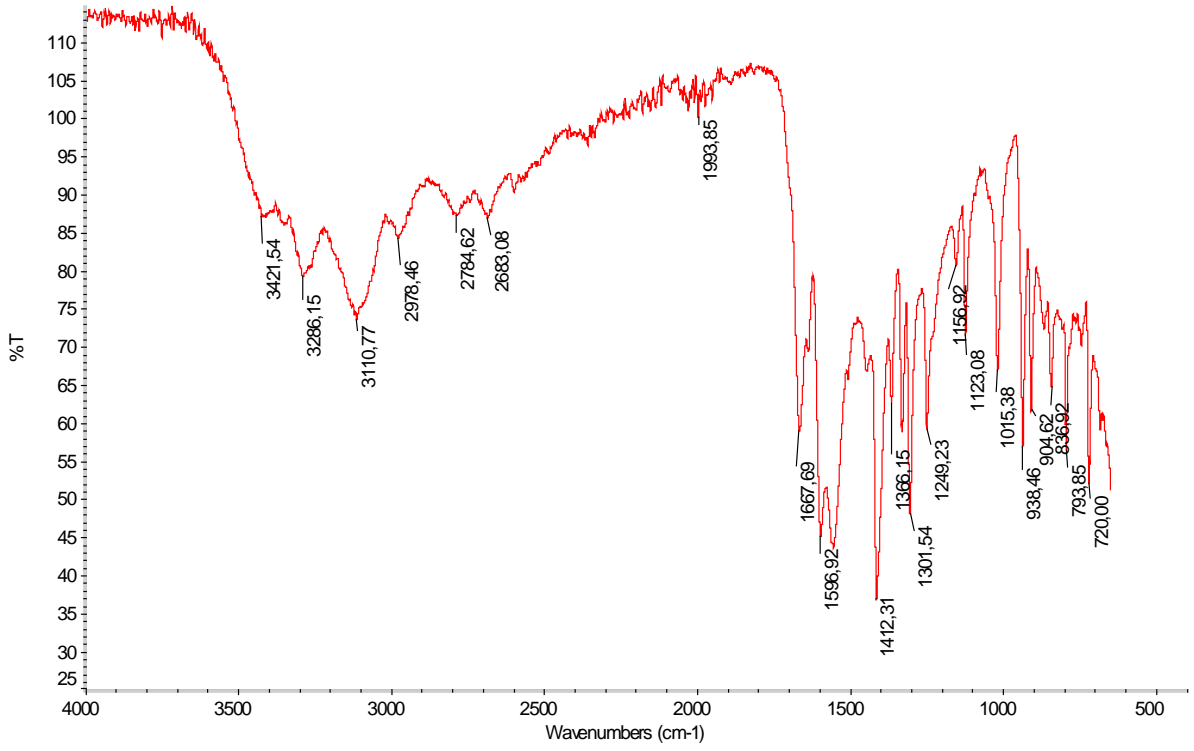


a

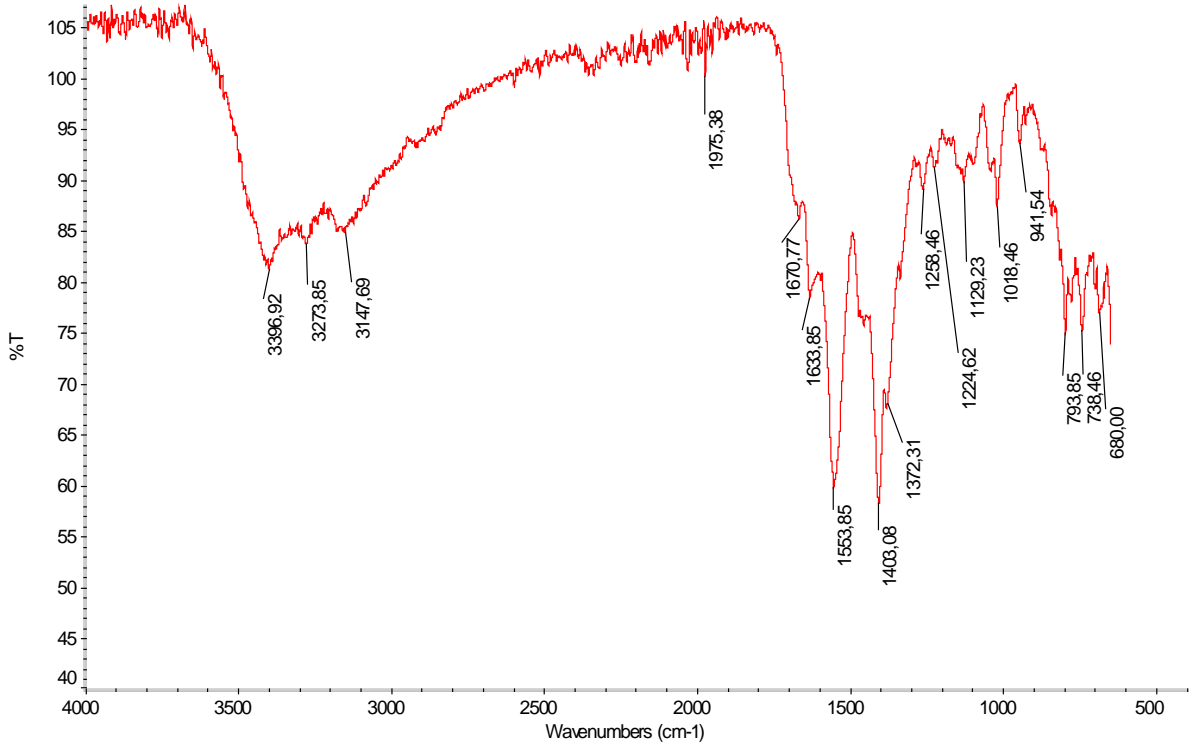


b

Şekil 4.1. a) MAD ve b) MAG monomerlerine ait NMR verileri.



a



b

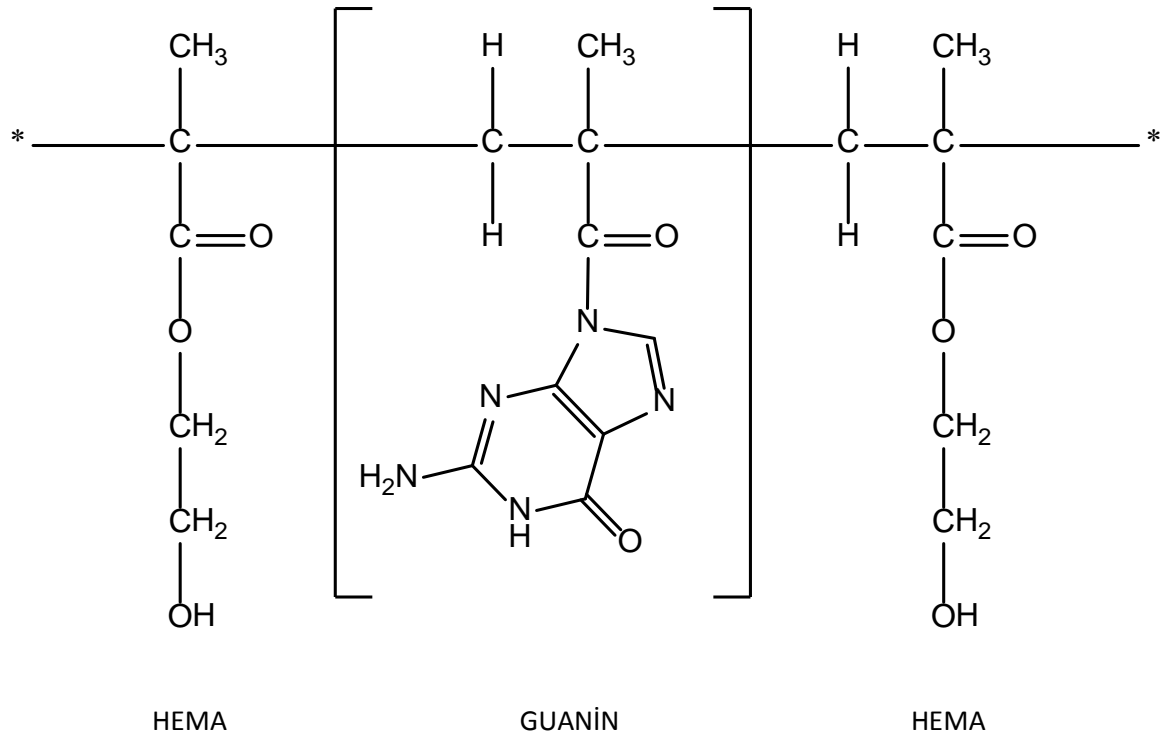
Şekil 4.2. a) MAD ve b) MAG monomerlerinin FTIR spektrumları.

4.1.2. Kriyojellerin Karakterizasyonu

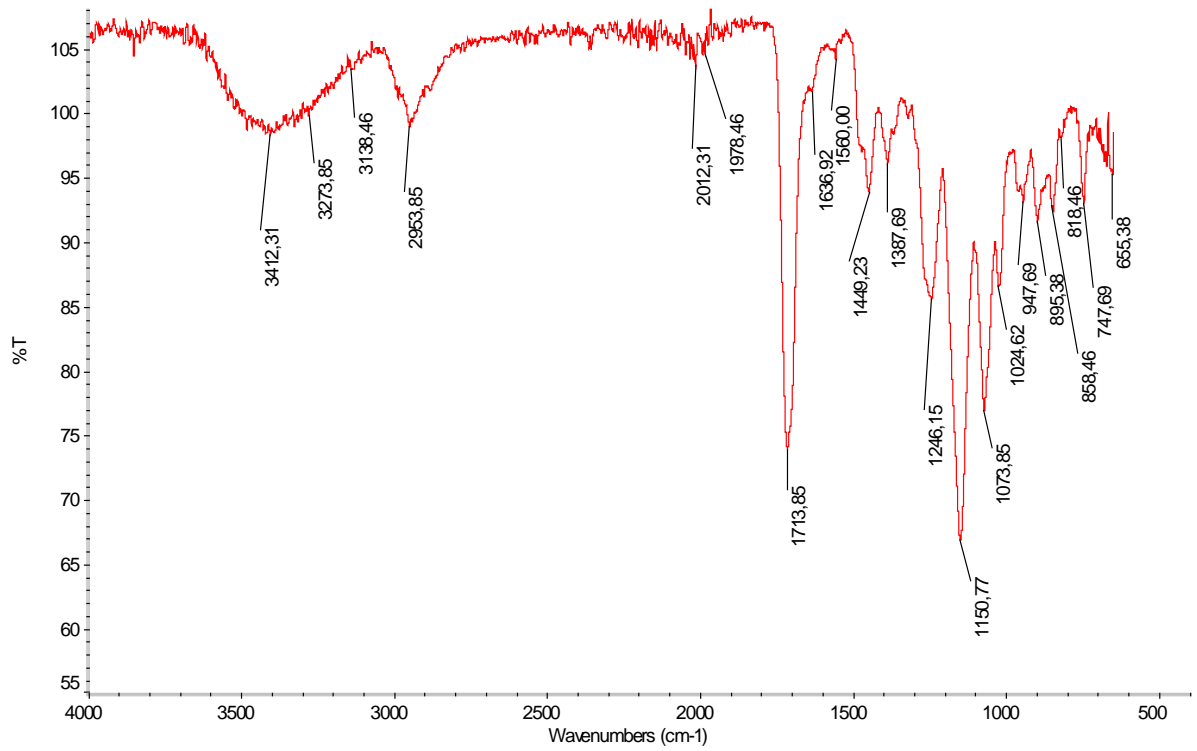
4.1.2.1. FTIR Analizi

MAD ve MAG, adenin ve guanin bazlarının metakrilik asit ile tepkimesi sonucu sentezlenmiştir. Şekil 4.3, poli(HEMA-MAD) kriyojellerin molekül formülünü ve Şekil 4.4 ise FTIR spektrumunu göstermektedir. Şekil 4.2a'da verilen MAD yapısına ait FTIR spektrumundan elde edilen bilgilere göre bandlar, NH ve OH gerilmeleri (3400 cm^{-1}), alifatik CH gerilmesi (2947 cm^{-1}) ve NH bükülmesi (1557 cm^{-1}) MAD molekülünün kriyojel yapısına dahil olduğunun bir göstergesidir. Spektrumdaki diğer pikler de karşılaştırıldığında MAD ve poli(HEMA-MAD) yapılarına ait birbirinin eşi pek çok pik rahatlıkla görülebilmektedir. Sonuçlar hedeflenen HEMA ve MAD içeren kopolimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.

Şekil 4.5'de poli(HEMA-MAG) kriyojellerin yapısı verilmiştir. Şekil 4.6'da verilen poli(HEMA-MAG) kriyojellere ve Şekil 4.2b'de verilen MAG yapısına ait FTIR spektrumlarına göre elde edilen spektrum bilgileri: NH ve OH gerilmeleri (3412 cm^{-1}), CH gerilmesi (alkil, 2947 cm^{-1}), asidin CO gerilmesi (1713 cm^{-1}), amidin CO gerilmesi (1713 cm^{-1}), C=C gerilmesi (1637 cm^{-1}), NH bükülmesi (1560 cm^{-1}), ve alifatik aminlerde C-N gerilmesi (1246 cm^{-1}). Sonuçlar kopolimerizasyon işleminin arzu edildiği gibi başarılı olduğunu teyit etmektedir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA-MAG) kriyojellerin moleküler formülü.



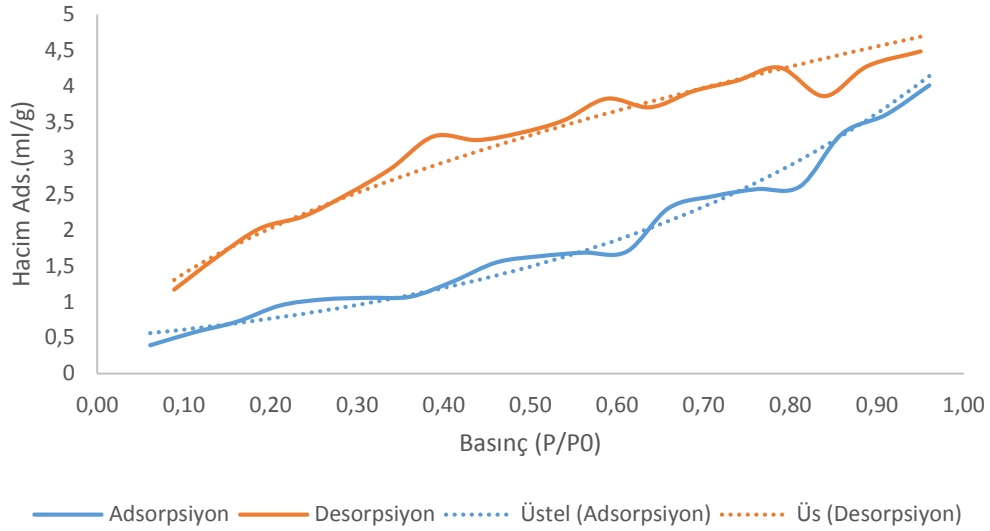
Şekil 4.6. Poli(HEMA-MAG) kriyojellere ait FTIR spektrumu.

4.1.3. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

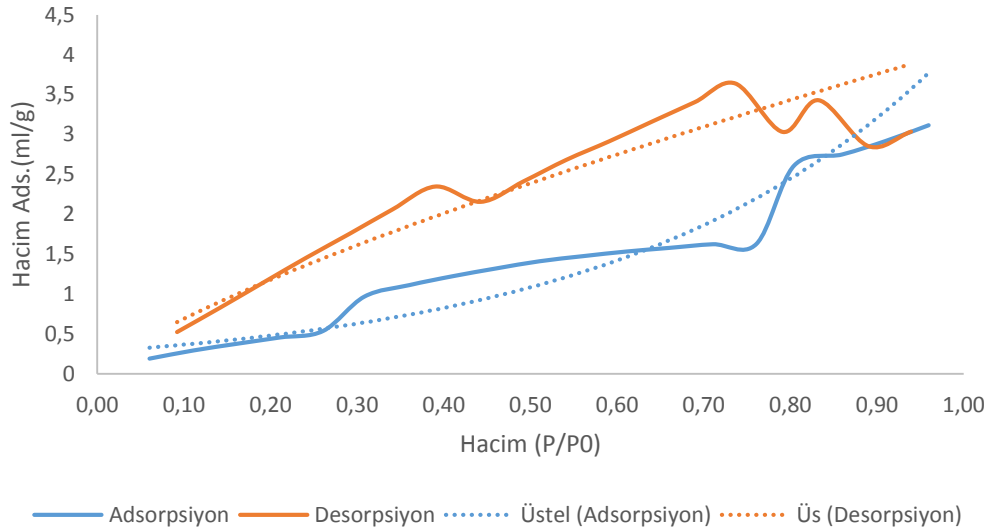
Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.7a ve Şekil 4.7b'de verilmektedir. Elde edilen bu grafiklere göre P/P_0 oranının 0.4 değerine yakın olması küçük çaplı mezo gözeneklerin olduğunu göstermektedir. Yuvarlak bir sırt elde edilmesi tek tabakanın yaklaşık olarak nerede oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca gecikme mezo ve makro gözeneklerdeki kılcal yoğunlaşmayı da açıklamaktadır. İzotermin ortalarında gözlenen düşük eğimli bölge bir kaç çoklu tabakanın (multilayer) oluştuğunun da bir göstergesidir. Ayrıca her iki grafik de daha sonra kinetik bölümünde de ifade edilecek olan adsorpsiyonun Langmuir izotermine uygun olarak gerçekleştiğini destekler niteliktedir.

Ayrıca grafikten elde edilen veriler incelendiğinde poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellerin BJH yöntemine göre birikimli (kümülatif) adsorpsiyon yüzey alanı $6.7 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak elde edilmiştir. Yine aynı yöntemle elde edilen birikimli adsorpsiyon ve desorpsiyon gözenek hacimleri ve gözenek çapları sırası ile 1.34×10^{-2} ve $1.53 \times 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{g}$ ve 19.95 ve 16.33 Å olarak elde edilmiştir. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için ise sırasıyla 8.81×10^{-3} ve $1.26 \times 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{g}$ ve 25.08 ve 21.47 Å olarak bulunmuştur. Ayrıca poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin yüzey alanı ise $5.2 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak elde edilmiştir. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellerin gözenek hacimlerinin poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere göre daha yüksek olmasının sebebi yapıları arasındaki ufak farklılıklara (guaninin halkalı yapısındaki C=O bağı) bağlıdır.

Ünlüer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 18.4 ve $16.5 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına sahip kriyojeller elde etmişlerdir [155]. Bereli ve arkadaşları $23.2 \text{ m}^2/\text{g}$ poli(HEMA-MAGA) kriyojel diskler ile UO_2^{2+} çalışmışlardır [156]. Tekin ve arkadaşları ağır metal uzaklaştırılması için $39.7 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına sahip kompozit kriyojeller sentezlemişlerdir [157]. Bu çalışmada elde edilen kriyojellerin yüzey alanı literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında düşüktür. Bununla birlikte bu düşüşün sebebi literatürde ilk defa sentezlenen poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin yapılarındaki adenin ve guanin moleküllerini içeren monomerlerin suda (çözücü ve porojen) çözünme ve polimerizasyon hızlarına bağlı olabilir. Ancak mezogözenekli bu kriyojeller oldukça iyi adsorpsiyon ve desorpsiyon değerlerine ulaşıldığı bir performans sergilemişlerdir.



a



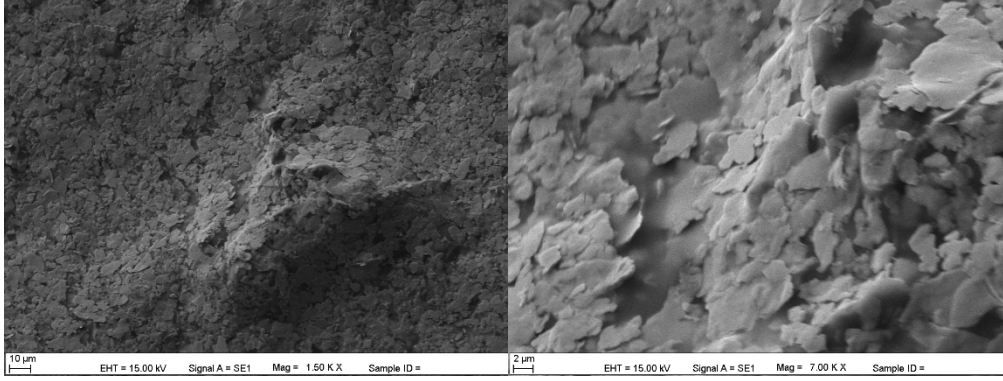
b

Şekil 4.7. a) Poli(HEMA-MAD)-100 ve b) Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait BET analizleri.

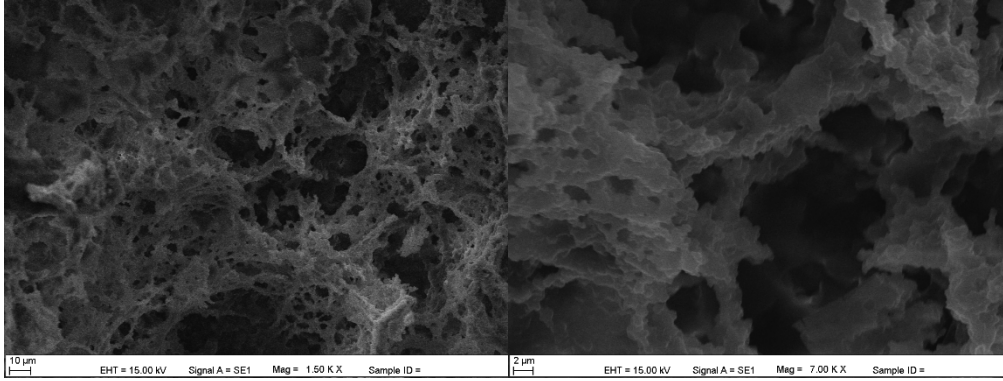
4.1.4. Yüzey Morfolojisi

Kriyojellerin bir avantajı da içerisindeki gözeneklerin büyük olması ve bu yüzden de temas yüzeyinin beklenenden daha düşük olmasıdır. Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojellerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojellerin SEM görüntüsü Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Görüldüğü gibi kriyojeller oldukça büyük gözeneklere ve oldukça pürüzlü yüzey özelliklerine sahiptirler. Kullanılan sodyum lauril sülfat (yüzey aktif madde), klasik kriyojel duvar morfolojisinde farklılıklara sebep olmuştur. Düzgün yüzeyler yerine daha pürüzlü yüzeyler elde edilebilmiştir. Bu

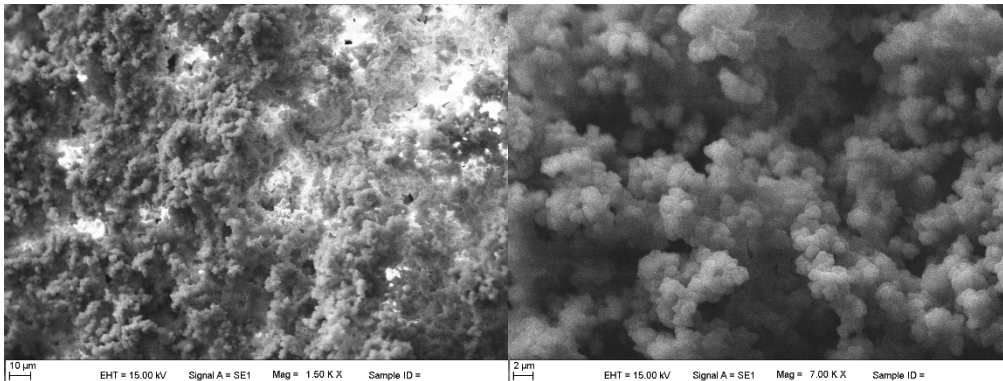
durum, spesifik yüzey alanında bir miktar iyileştirmeye olanak sağlamaktadır. Sonuç olarak polimerik yapıya MAD ve MAG ilavesi, yapının hem yüzey morfolojisinde hem de yığın özelliklerinde değişime yol açmıştır. Ayrıca görüntüler, yüzey alanı ölçümlerini de desteklemektedir. Bu çalışmada hazırlanan kriyojellerin gözenek boyutları, literatürdeki örneklere göre daha küçük ve gözenek boyut dağılımı daha dardır (mezogözenekli). Ancak, kriyojellerin en önemli yapısal özelliği kabul edilen birbirine bağlantılı akış kanalları korunmuştur.



a



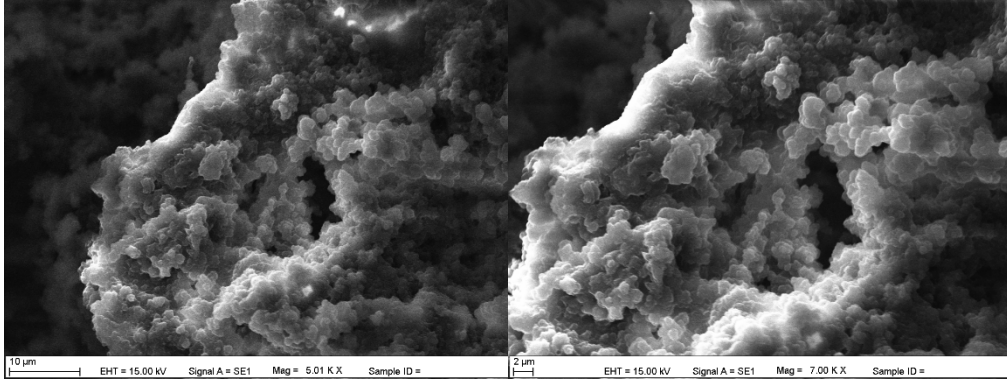
b



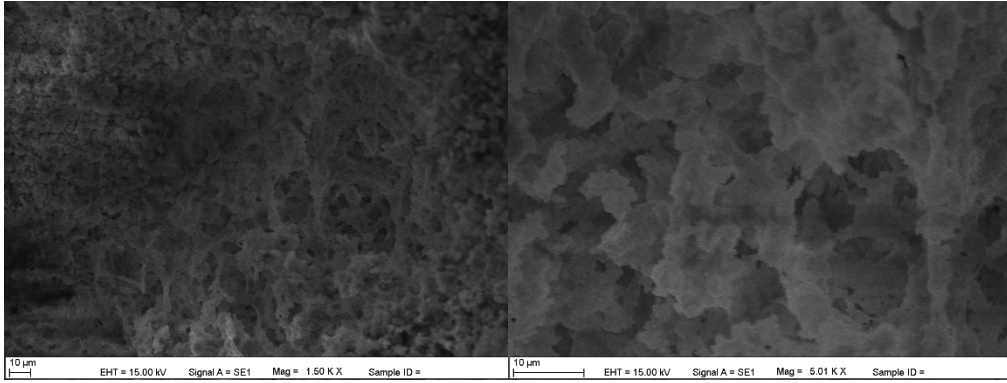
c

Şekil 4.8. SEM görüntüleri;

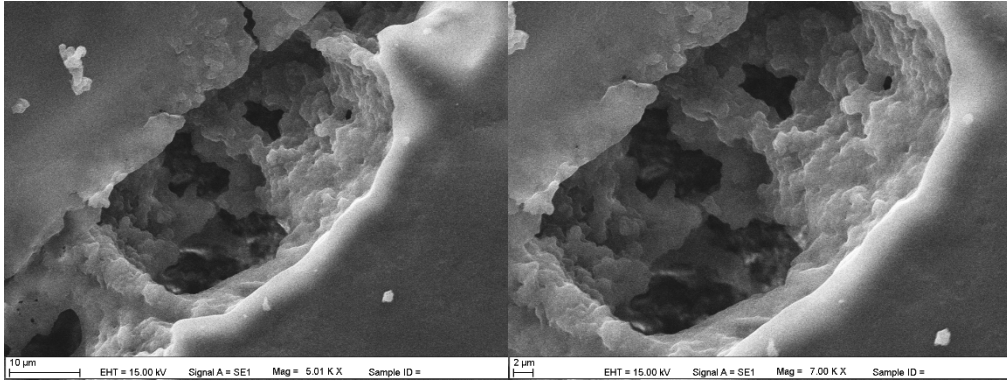
a) Poli(HEMA-MAD)-50, b) Poli(HEMA-MAD)-75, c) Poli(HEMA-MAD)-100



a



b



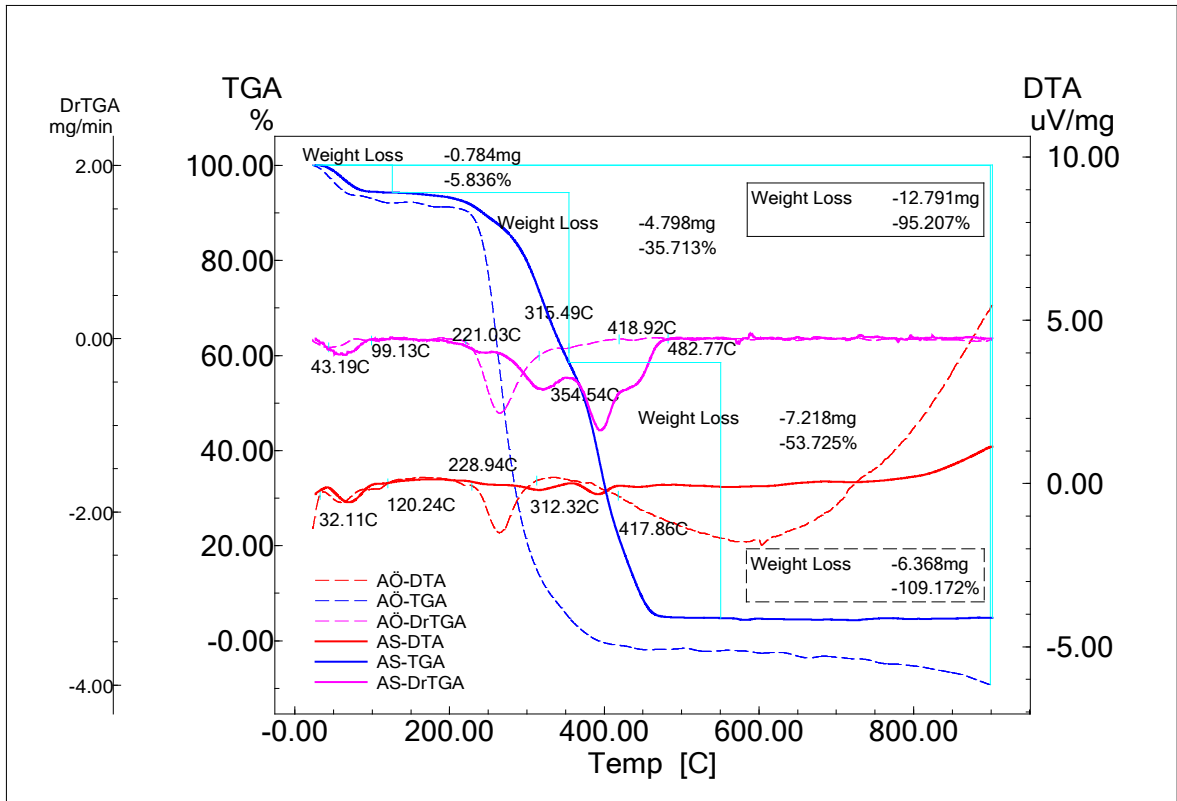
c

Şekil 4.9. SEM görüntüleri;

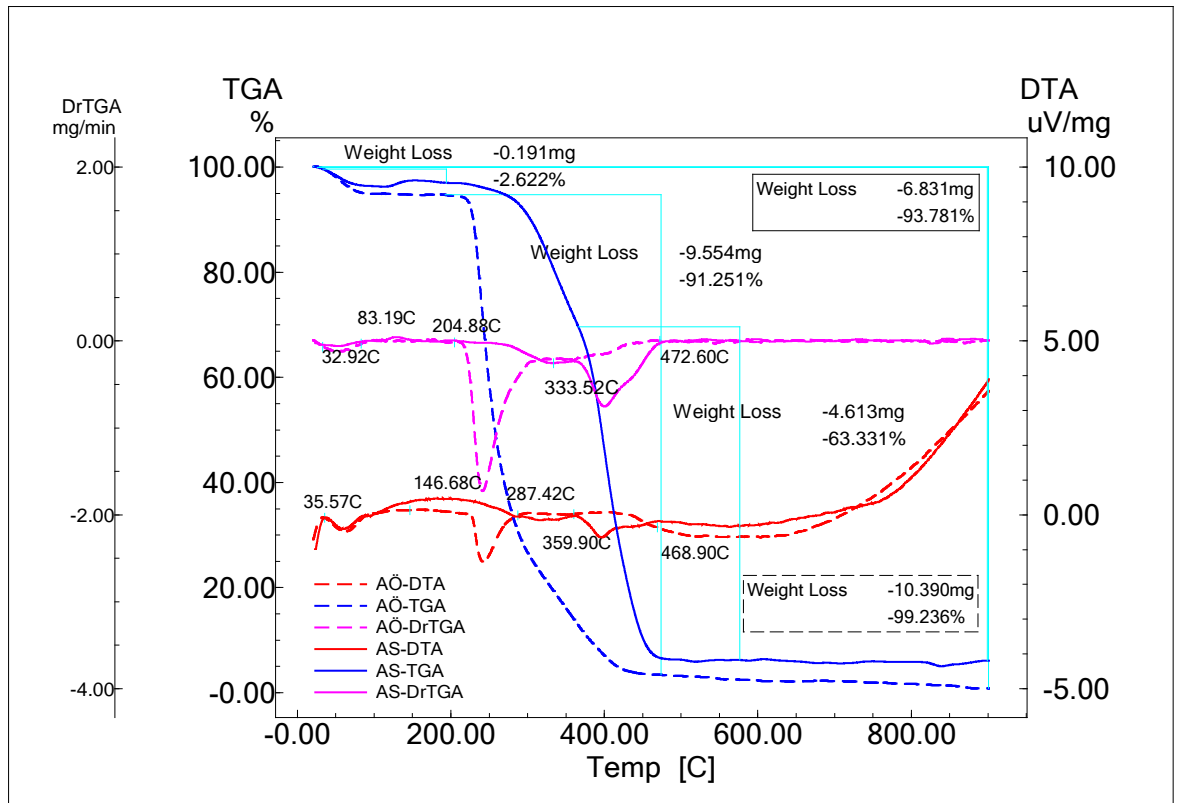
a) Poli(HEMA-MAG)-50, b) Poli(HEMA-MAG)-75, c) Poli(HEMA-MAG)-100.

4.1.5. TGA Analizi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin termal analizleri sonucu elde edilen veriler Şekil 4.10a ve 4.10b'de gösterilmektedir. Bu grafiklerde mavi eğri termogravimetrik analiz (TGA) grafiği olup sıcaklık değişimine bağlı olarak ağırlık kaybını göstermektedir; pembe eğri TGA verilerinin birinci türevini (drTGA) gösteren grafiğe aittir ve maksimum ağırlık kayıplarının gerçekleştiği sıcaklıkları gösterir. Kırmızı eğri ise diferansiyel termal analiz (DTA) grafiğini göstermektedir ve endotermik veya ekzotermik reaksiyonların izlenmesinde veri sağlamaktadır. Kriyojellere ait DTA grafiği farklı sıcaklıklarda poli(HEMA-MAD)-100 için 43.19, 221.03, 354.54 ve 418.92°C, poli(HEMA-MAG)-100 için 32.92, 204.88, 333.52 ve 359.90°C'de endotermik reaksiyonların gerçekleşmeye başladığını göstermektedir. Yapıdaki nemin ortamdaki uzaklaşması poli(HEMA-MAD)-100 için 43.19-99.13°C ve poli(HEMA-MAG) için 32.92-83.19°C arasında gerçekleşmiştir. Daha sonra gerçekleşen ağırlık kayıpları poli(HEMA-MAD)-100 için 221.03 ve 354.54°C ve poli(HEMA-MAG)-100 için 204.88 ve 359.90°C'lerde gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon öncesi (AÖ) gerçekleşen kopmalara bakılırsa yapıdan öncelikle polar gruplara sahip ve heteroatom içeren ligandlar (MAD veya MAG) kopmaktadır. Daha sonra poli(HEMA-MAD)-100 için 315.49°C ve poli(HEMA-MAG)-100 için 333.52°C 'de polimerik yapı erimeye başlamış ve sırasıyla 417.86°C ve 472.60°C'den sonra termal olarak %95.20 ve %93.78 oranında kütle kayıplarıyla neredeyse tamamen bozulmaktadır ve kalan kütle miktarı grafikten de görüleceği gibi sıfıra ulaşmaktadır. Adsorpsiyon sonrası (AS) eğrilerine bakılırsa ilk kopmanın yapıya adsorbe olan RNA olduğu ve bu olayın gerçekleştiği sıcaklığın poli(HEMA-MAD)-100 için 120.24°C ve poli(HEMA-MAG)-100 için 146.68°C olduğu görülmektedir. Poli(HEMA-MAG)-100'e adsorbe olan RNA'nın yapıdan uzaklaşma sıcaklığının daha yüksek olması beklenen bir durumdur; çünkü guanin grupları sitozin ile 3 hidrojen bağı vasıtasıyla daha sıkı bağlanmaktadır. Daha sonra gerçekleşen kopmalar aynı şekilde devam etmiştir. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası TGA grafiklerine bakıldığında aradaki kütle farkının adsorbe olan RNA moleküllerinden kaynaklandığı ve dolayısıyla adsorpsiyon işleminin beklendiği gibi fonksiyonel monomerler üzerinden başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Kriyojellerin adsorpsiyon sonrası çekilen TGA grafiğinden de görüleceği gibi yapıdan geriye yüksek sıcaklıklara dayanabilen fosfat bileşikler veya sentezleme aşamasında meydana gelmiş olabilecek inorganik kirlenme nedeniyle ortama girmiş olabilen maddeler kalmıştır.



a

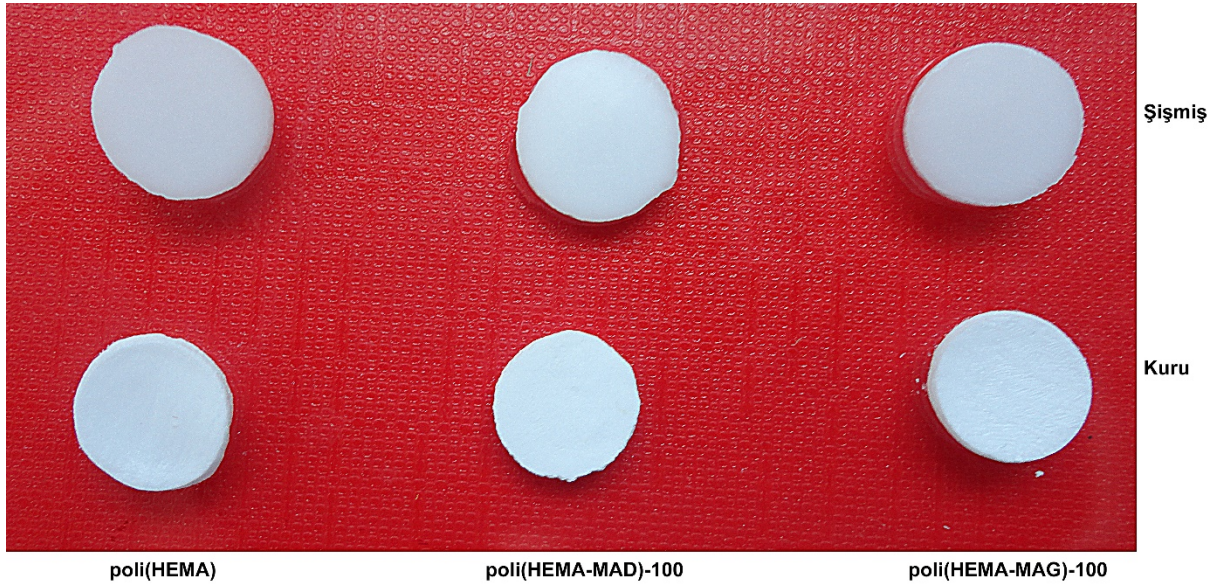


b

Şekil 4.10. a) Poli(HEMA-MAD)-100 ve b) Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait TGA-DTA grafikleri.

4.1.6. Şişme Testi

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin yapısında çapraz bağlar bulunmaktadır. Buna bağlı olarak kriyojeller sulu ortam içinde çözünmez, ancak çapraz bağlanma derecesi ve matrisin hidrofil özelliğine bağlı olarak su tutarak şişer. Bu çalışmada kullanılan kriyojellerin ağırlıklar temelli denge şişme oranları poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 için sırasıyla 4.96 g H₂O/g kriyojel ve 5.1 g H₂O/g kriyojel başka bir deyişle %496 ve %510'dur. Aradaki yaklaşık olarak 0.14 g'lık fark guaninin yapısındaki halkadaki polar gruplardan (karbona bağlı olan çift bağlı karbonil oksijeninden) kaynaklanabilir. HEMA ile MAD ve HEMA ile MAG arasındaki kopolimerleşme elde edilen polimerin moleküler ağırlığını etkili bir şekilde azaltmaktadır ve bu da yapının kristalliğini azaltmaktadır. Bu nedenle, su molekülleri, sulu çözeltiler içinde polimerin su çekme davranışında olumlu bir gelişme elde edilmesini sağlayacak şekilde hareket eder. Çünkü su birbirine dolanmış polimer zincirleri içine daha kolay nüfuz eder. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin makrogözenekliliği sıkıştırma testleri ile belirlenmiş, kütle oranlarından hesaplanmış ve sırasıyla % 81 ve % 69 olarak bulunmuştur.



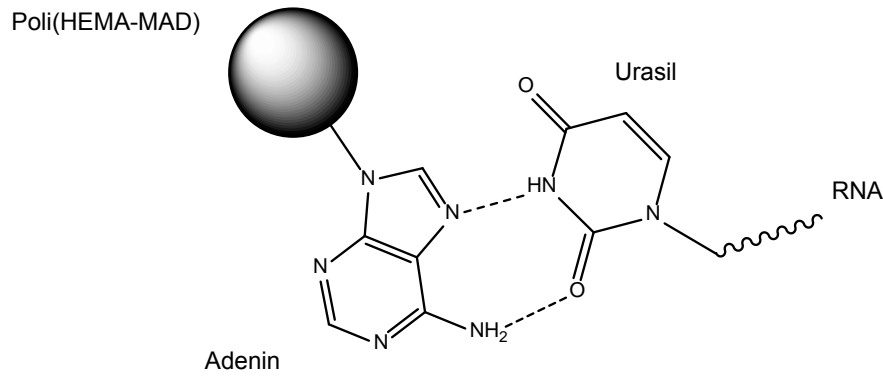
Şekil 4.11. Sentezlenen kriyojellerin optik görüntüleri.

4.2. Sulu Çözeltilerden RNA Adsorpsiyonu

Tez kapsamındaki tüm deneylerde poli(HEMA), poli(HEMA-MAD)-50-75-100 ve poli(HEMA-MAG)-50-75-100 kriyojeller kullanılmıştır.

4.2.1. Poli(HEMA-MAD)-100 Kriyojeller ile RNA Adsorpsiyonu

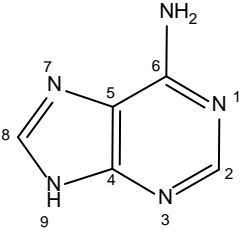
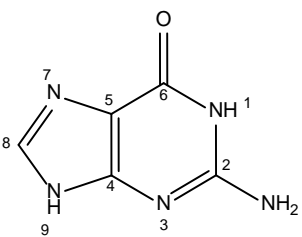
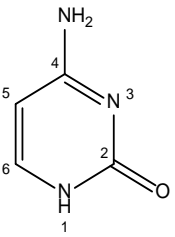
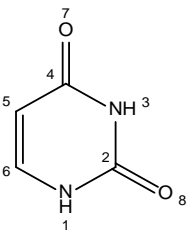
Poli(HEMA-MAD) kriyojellerdeki fonksiyonel monomer ve eşlenik nükleotidler aracılığıyla RNA adsorpsiyonu Şekil 4.12'de temsili olarak gösterilmektedir. Deney koşulları optimizasyonu (pH, süre, derişim vb) amacıyla maksimum adsorpsiyon kapasitesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar rapor edilmiştir.



Şekil 4.12. Adenin içeren kriyojeller [poli(HEMA-MAD)-100] ile RNA'nın etkileşimi.

Ayrıca Çizelge 4.1'de RNA'daki nükleotidlere ait yapılar ve bu nükleotidlere bazlık özelliği kazandıran atomların pK_a değerleri verilmektedir. Çizelgeden de görüleceği gibi bu nükleotidlerin pK_a değerleri, hidrojen florür (HF, pK_a: 3.17) ve nitroz asit (HNO₂, pK_a: 3.29) gibi asitlerle karşılaştırıldığında ilgili değerlere yakın ve dolayısıyla bu nükleotidlerin oldukça kuvvetli asitler olduğu görülmektedir. Sonuçta, bu grupların yaptığı hidrojen bağlarının ve dolayısıyla RNA ve DNA yapısının ne kadar kararlı olduklarını açıkça kanıtlamaktadır.

Çizelge 4.1. Nükleotid bazlardaki iyonlaşabilen atomlara ait pK_a değerleri [158].

Nükleotid	Atom	pK _a
 Adenin	N1	3.88
 Guanin	N7 N1	3.60 10.0
 Sitozin	N3	4.56
 Urasil	N3	10.1

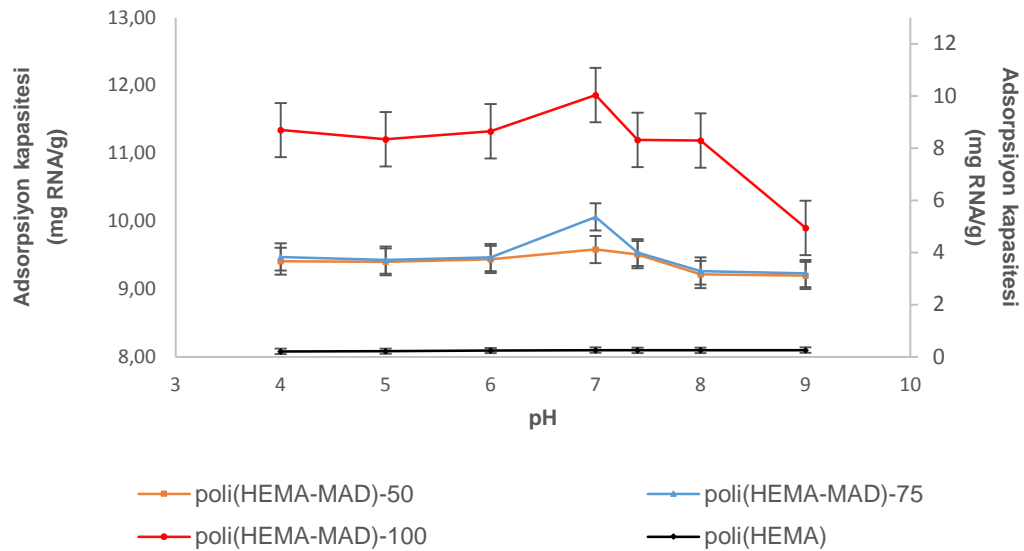
4.2.1.1. pH etkisi

RNA molekül kütlesi 26 kDa (*E. coli*) ile 64 kDa (insan) arasında değişen temel bir yapıdır. Farklı miktarda fonksiyonel monomer içeren poli(HEMA-MAD) kriyojellere RNA adsorpsiyonu pH: 4.0-9.0 (asetat, fosfat ve karbonat tamponları) aralığında incelenmiş ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH: 7.0 (fosfat tamponu)'de gözlenmiştir. Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi daha yüksek ve daha düşük pH'larda önemli derecede düşmektedir. Adenin yapısında bulunan azotlar nötral pH değerinde

RNA'daki karşılığı urasil ile etkili hidrojen bağları yapmaktadır. Çünkü adeninin yapısındaki N1 atomunun pK_{a1} değeri yaklaşık pH: 4.0 (3.88) ve urasilin yapısındaki N3 atomunun pK_{a1} değeri yaklaşık pH: 10.0 (10.01)'dur. Bu iki grubun ortalama pH değeri pH: 7.0'dir. Yani nötral koşullarda en uygun yük değerlerine sahiptirler. (Yüksek ve düşük pH'larda bu hidrojen bağları H^+ ve OH^- iyonları ile kırılacağından asidik ve bazik pH'larda adsorpsiyon oranının düşmesi teorik olarak beklenen bir sonuçtur.)

Şekil 4.13, farklı miktarlarda (50/75/100 mg) adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojellerin sabit RNA derişimine (100 mg/mL) sahip çözeltilerde oda koşullarında (25°C) 60 dakikalık adsorpsiyon süresinde değişen pH'larda (4.0-9.0) elde edilen adsorpsiyon kapasitelerini göstermektedir.

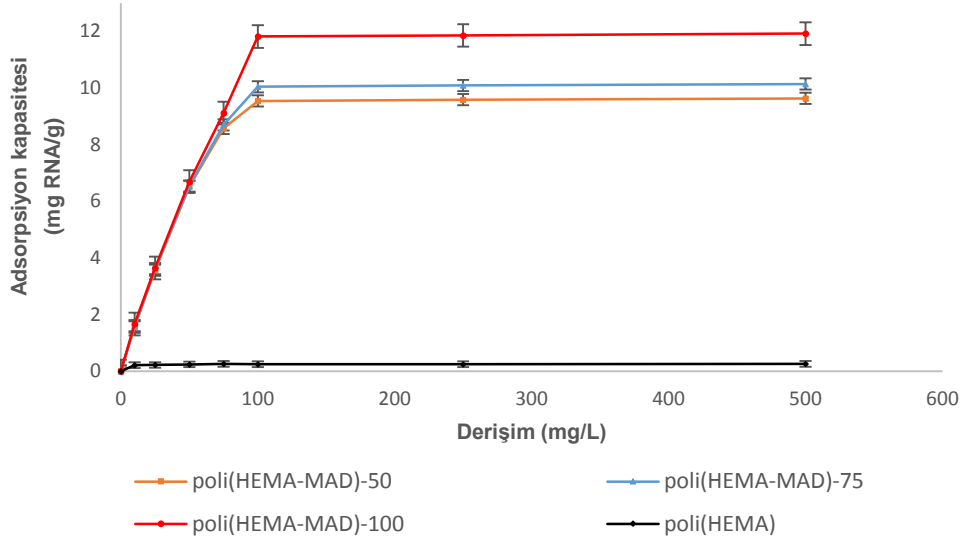
Grafiklerden elde edilen verilere göre en yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH:7.0'de elde edilmiş ve poli(HEMA-MAD)-50/75/100 kriyojelleri için sırasıyla 9.58, 10.06 ve 11.86 mg/g olarak bulunmuştur. Sonuçlardan görüldüğü gibi artan MAD miktarı ile adsorpsiyon kapasitesi de artmaktadır. Ayrıca fonksiyonel grup içermeyen poli(HEMA) kriyojellere RNA adsorpsiyonu oldukça düşüktür. Bu sonuç, RNA moleküllerinin kriyojeldeki gözeneklere difüzyonu ve non-spesifik etkileşimlerle ilgilidir. Buna ek olarak, elde edilen sonuç seçilen fonksiyonel monomerin kriyojele önemli düzeyde afinite kazandırdığını da göstermektedir.



Şekil 4.13. Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.

4.2.1.2. Başlangıç RNA Derişiminin Etkisi

10, 25, 50, 75, 100, 250 ve 500 mg/L RNA başlangıç derişimlerdeki çözeltiler için, poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile olan ilişkisini anlamak amacıyla optimum pH'da (pH:7.0, fosfat tamponu), oda koşullarında bir saat süre ile adsorpsiyon işlemi yapılmıştır. Aynı miktardaki kriyojel miktarına tutunan RNA miktarı artan başlangıç RNA derişimiyle artmaktadır. Şekil 4.14'e göre belli bir derişim oranından sonra (100 mg/L) tutunan RNA miktarı poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeli için değışmemektedir. Bu da yapılabilecek tüm hidrojen bağlarının yapıldığını, aktif bölgelerinin tamamen etkileştiğini ve dolayısıyla da kriyojellere RNA adsorpsiyon işleminin dengeye ulaştığını göstermektedir. Poli(HEMA-MAD)-50/75/100 kodlu kriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla 9.54, 10.04 ve 11.82 mg/g olarak bulunmuştur.

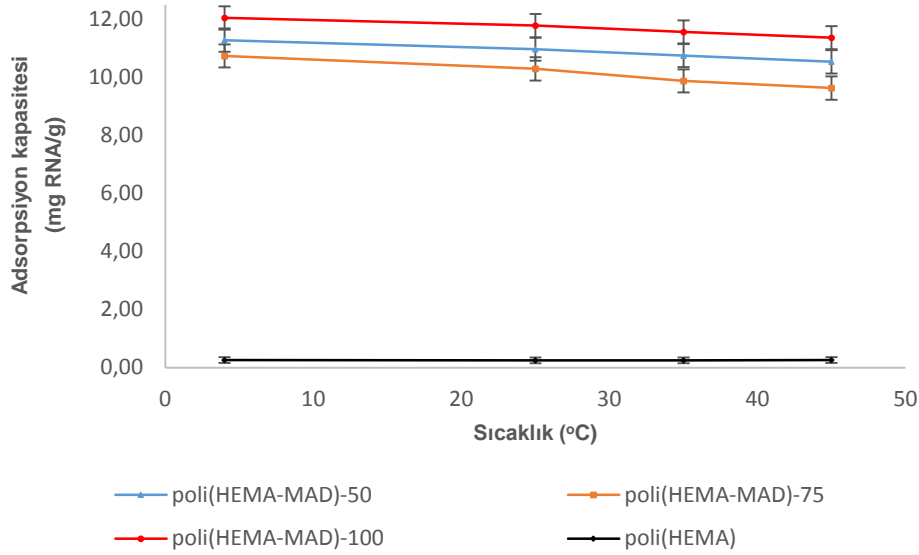


Şekil 4.14. Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojelleri ile RNA adsorpsiyonuna RNA başlangıç derişiminin etkisi: pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.

4.2.1.3. Sıcaklığın Etkisi

Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellere RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi dört farklı (4, 25, 35 ve 45°C) sıcaklıkta incelenmiştir. Şekil 4.15'de poli(HEMA-MAD) kriyojeller üzerine RNA adsorpsiyonunun artan sıcaklıkla azaldığı görülmektedir. Poli(HEMA-MAD)-50/75/100 kodlu kriyojellere 4°C'de adsorplanan RNA miktarları sırasıyla 10.13, 10.73 ve 12.04 mg/g iken bu değerler 45°C'de yine sırasıyla %1.0, %1.0 ve %0.05 azalarak 9.02, 9.62 ve 11.36 mg/g değerlerine düşmektedir. Bu azalmanın sebebi

adenin ve RNA'nın yapısındaki guanin arasında gerçekleşen hidrojen bağının artan sıcaklıkla zayıflaması ve hatta bir kısmının kırılmasıdır. Biyolojik moleküllerin etkileşim için tercih ettiği optimum sıcaklıklar genelde vücut sıcaklığı olan 35-36°C'dir. Dolayısıyla artan sıcaklık ile RNA'da ve polimerin yapısında meydana gelebilecek küçük çaplı deformasyonlar da bir miktar bu azalmaya katkıda bulunmuş olabilir.

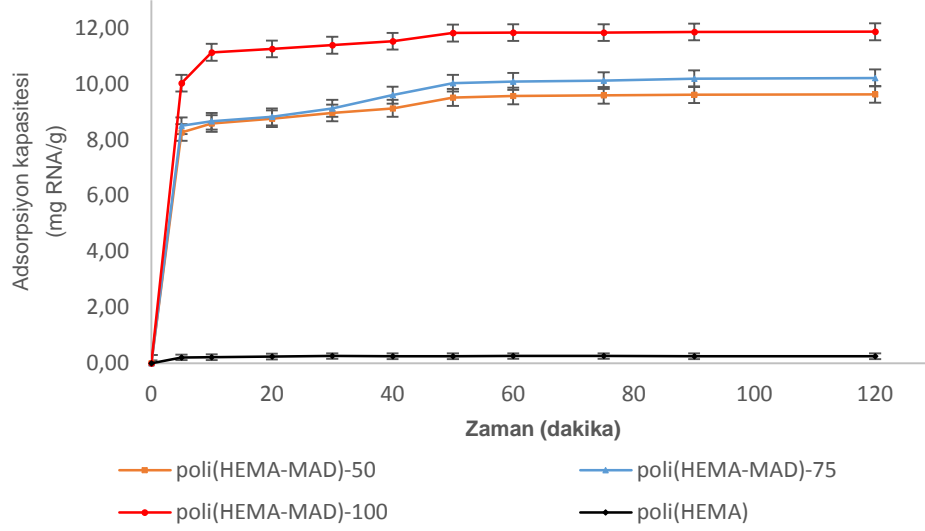


Şekil 4.15. Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat.

4.2.1.4. Etkileşim Süresinin Etkisi

Poli(HEMA-MAD) kriyojeller üzerine RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisini incelemek için 100 mg/L RNA derişimine sahip 10 adet eş çözelti içerisine atılan kriyojel membranlara RNA adsorpsiyonu 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90 ve 120 dakikalık aralıklarla ölçülmüştür. Şekil 4.16'da gösterildiği gibi etkileşimin ilk 15 dakikasında adsorpsiyon büyük ölçüde tamamlanmış ve bir süre sonra (30 dak) adsorpsiyon dengeye ulaşmış [poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeli için 11.84 mg/g] ve kriyojeller üzerine tutunan RNA miktarı değişmemiştir. Beklendiği gibi, adsorpsiyon hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve aktif bağlanma bölgelerinin dolmasına bağlı olarak dengeye ulaşmaktadır. Kriyojellerin sahip olduğu birbirine bağlantılı geniş gözenekleri, analit çözeltilerinin hızlıca polimerik yapı içerisine girmesine olanak sağlamaktadır. Böylelikle, analit (RNA) molekülleri, polimerik yapıdaki ligandlar ile kolay bir şekilde etkileşmekte ve kısa denge adsorpsiyon süreleri gözlenmektedir. RNA adsorpsiyonunda etkileşim süresinin kısa olması, RNA kromatografisi için oldukça arzu edilen bir özelliktir. Çünkü daha önce de belirtildiği gibi RNA molekülleri hidrolize yatkındır ve

kararlı ürün elde edilmesi için kısa saflaştırma basamaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, tez kapsamında geliştirilen poli(HEMA-MAD) kriyojeller RNA kromatografisi için oldukça uygundur.

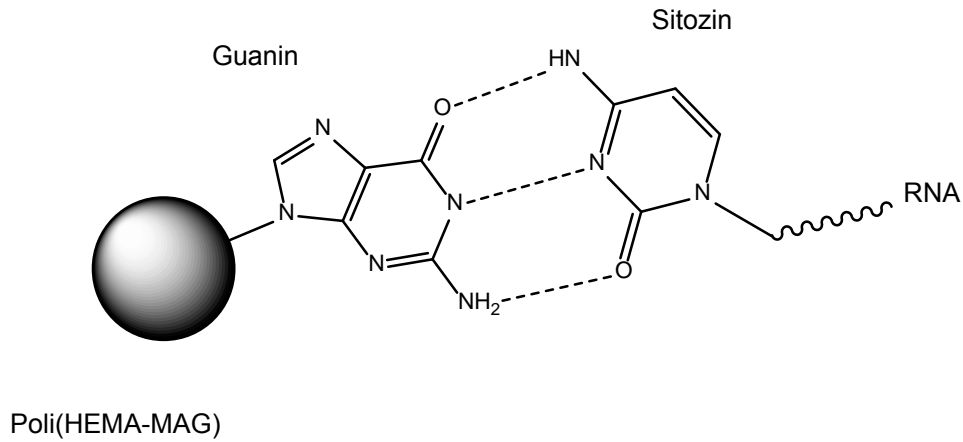


Şekil 4.16. Farklı miktarlarda adenin içeren poli(HEMA-MAD) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi:

RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), T: 25°C.

4.2.2. Poli(HEMA-MAG) Kriyojeller ile RNA Adsorpsiyonu

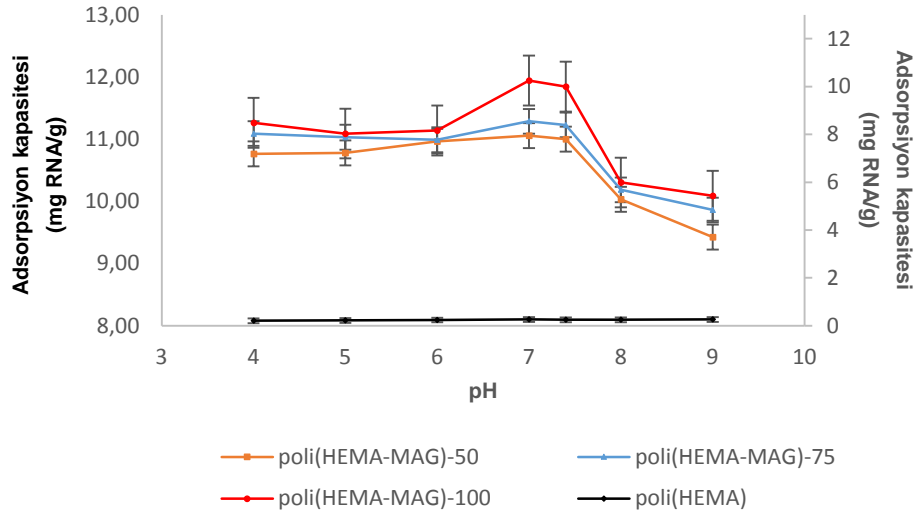
Poli(HEMA-MAG) kriyojellere guanin temelli fonksiyonel monomer ile eşlenik sitozin nükleotidler aracılığıyla RNA adsorpsiyonu Şekil 4.17'de temsili olarak gösterilmektedir. Deney koşulları optimizasyonu (pH, süre, derişim vb.) ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar adım adım rapor edilmiştir.



Şekil 4.17. Guanin içeren kriyojeller [poli(HEMA-MAG)] ile RNA'nın etkileşimi.

4.2.2.1. pH Etkisi

Farklı miktarlarda fonksiyonel monomer yoğunluğuna sahip poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile yapılan adsorpsiyon çalışmaları pH: 4.0-9.0 aralığında yapılmış ve maksimum adsorpsiyonun pH: 7.0 (fosfat tamponu)'de gerçekleştiği gözlenmiştir. Nötral pH'dan daha yüksek ve daha düşük pH'larda adsorpsiyonun ciddi oranda düşmesi, bu pH'larda guanin ile RNA'nın yapısında bulunan sitozin arasında gerçekleşen hidrojen bağlarının, teorik olarak da beklendiği gibi, ciddi oranda kırılması ile açıklanabilir. Ayrıca, Çizelge 4.1'de verildiği gibi eşlenik NH/N ve NH₂/C=O gruplarının asit/baz karakterleri bu etkileşimleri kontrol etmekte ve en uygun etkileşimler nötrale yakın pH değerlerinde gerçekleşmektedir. Ayrıca A-U eşleniklerinden [poli(HEMA-MAD)/RNA] farklı olarak poli(HEMA-MAG) ve RNA etkileşimlerinin pH bağımlılığı, biraz daha yayvan değişim göstermektedir. Bu durum guanin ve sitozin arasındaki üçlü hidrojen bağlarıyla ve dolayısıyla etkin role sahip grup miktarlarıyla açıklanabilir.



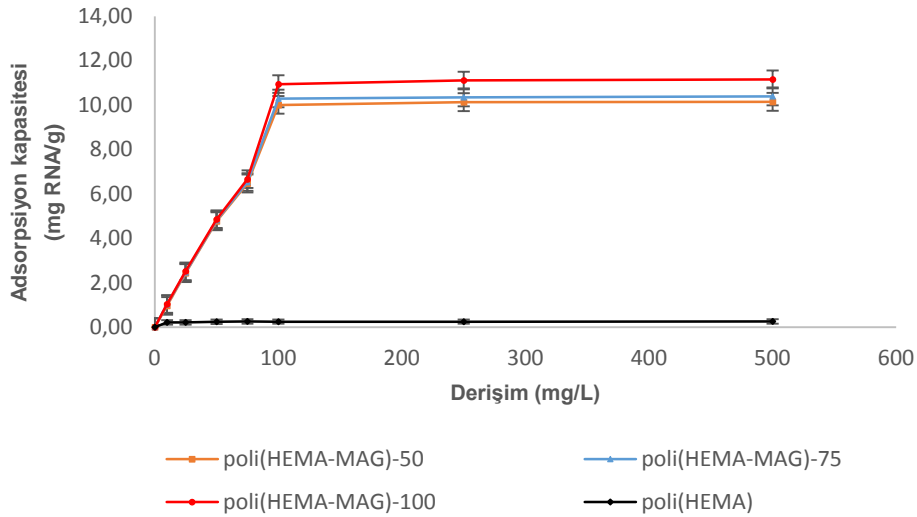
Şekil 4.18. Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.

Şekil 4.18, farklı ligand yoğunluğuna (50/75/100) sahip poli(HEMA-MAG) kriyojellerin RNA çözeltilerinde (100 mg/L) oda koşullarında (25°C) 60 dakikada gerçekleşen adsorpsiyon deneylerinde, değişen pH'larda (4.0-9.0) elde edilen adsorpsiyon miktarlarını göstermektedir.

Elde edilen verilere göre maksimum adsorpsiyon poli(HEMA-MAG)-50/75/100 kriyojelleri için pH: 7.0'de sırasıyla 11.05, 11.28 ve 11.94 mg/g olarak elde edilmiştir. Daha önce tartışıldığı gibi artan fonksiyonel grup miktarı adsorpsiyon kapasitesini artırmaktadır.

4.2.2.2. Başlangıç RNA Derişiminin Etkisi

Farklı başlangıç derişim değerlerine sahip (10, 25, 50, 75, 100, 250 ve 500 mg/L) RNA çözeltileri için pH: 7.0 (fosfat tamponu)'de, oda koşullarında 1 saat süre ile yapılan adsorpsiyon deneyleri sonucunda, poli(HEMA-MAG)-100 kriyojelleri için belirli bir derişim (100 mg/mL) değerinden sonra adsorplanan RNA miktarı (10.94 mg/g)'nın değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.19). Artan MAD monomer miktarı ile birlikte kriyojellerin dengeye ulaştığı RNA derişimi artmaktadır. Bu durum, fonksiyonel grupların doygunluğa ulaşması için gerekli olan RNA miktarlarıyla ilişkilidir. Daha fazla fonksiyonel grup (etkileşim noktası) daha yüksek analit (RNA) derişimi gerektirmektedir. Dengeye ulaşıldıktan sonra, adsorpsiyon süresince hidrojen bağı yapabilecek tüm aktif bölgeler etkileşmiş ve yapılacak tüm hidrojen bağları yapılmıştır. Dolayısıyla kriyojeller maksimum adsorpsiyon dengesine ulaşmaktadır.

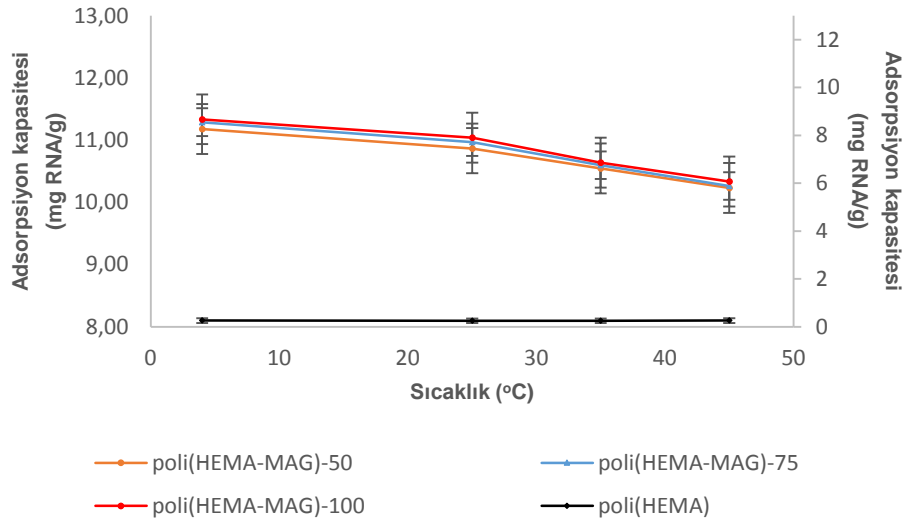


Şekil 4.19. Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojelleri ile RNA adsorpsiyonuna RNA başlangıç derişiminin etkisi:

pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi 1 saat, T: 25°C.

4.2.2.3. Sıcaklığın Etkisi

Poli(HEMA-MAG) kriyojellere RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi dört farklı sıcaklık değerinde (4°C, 25°C, 35°C ve 45°C) incelenmiştir. Şekil 4.20'de tüm poli(HEMA-MAG) kriyojeller üzerine RNA adsorpsiyonunun artan sıcaklıkla azaldığı görülmektedir. Poli(HEMA-MAG)-50 kriyojeli için adsorpsiyon kapasitesi 4°C'de 11.17 mg/g değerinden %0.08 kadar azalarak 45°C'de 10.23 mg/g değerine düşmüştür. Benzer şekilde; poli(HEMA-MAG)-75 için %0.09 azalarak 11.29 mg/g'dan (4°C) 10.26 mg/g'a (45°C); poli(HEMA-MAG)-100 için yine %0.09 azalarak 11.33 mg/g'dan (4°C) 10.33 mg/g'a (45°C) düşmüştür. Sonuçlardan da görüldüğü gibi artan MAG miktarı oluşacak hidrojen bağı miktarını belirlemekte ve adsorpsiyon kapasitesi-sıcaklık ilişkisini doğrudan yönlendirmektedir. Adsorpsiyon kapasitesindeki azalmanın sebebi adenin ve RNA'nın yapısındaki guanin arasında gerçekleşen hidrojen bağının artan sıcaklıkla zayıflaması ve hatta bir kısmının kırılmasıdır. Dolayısıyla, ne kadar çok hidrojen bağı yaparak RNA adsorplanıyorsa bu bağın kırılmasıyla adsorpsiyon kapasitesi o derece etkilenmektedir.

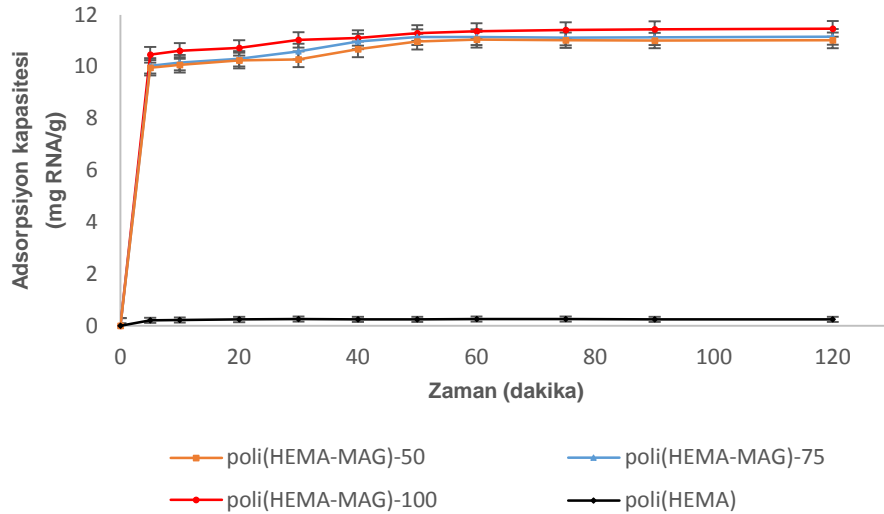


Şekil 4.20. Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi 1 saat.

4.2.2.4. Etkileşim Süresinin Etkisi

Farklı ligand yoğunluğuna sahip poli(HEMA-MAG) kriyojeller üzerine RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi, aynı RNA derişimi değerine (100 mg/L) sahip 10 adet paralel çözelti kullanılarak farklı zaman aralıklarında (5-120 dak) örnek

alınması yoluyla incelenmiştir. Şekil 4.21’de gösterildiği gibi adsorpsiyon ilk dakikalarda (ilk 15 dakika) hemen hemen tamamlanmış ve bir süre sonra (60 dak) adsorpsiyon dengeye ulaşmıştır [poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeli için 11.41 mg/g]. Bu süreden sonra kriyojeller üzerine tutunan RNA miktarı önemli bir oranda değişmemiştir. Kriyojellerin sahip olduğu gözenek yapısının bir sonucu olarak, RNA moleküllerinin hızlı bir şekilde geniş gözeneklerde etkileşime girmesiyle denge etkileşim süresi kısa olmaktadır. Bu sonuç, ayırma tekniklerinde ve RNA gibi hassas ve hidrolize yatkın moleküllerin herhangi bir bozunma olayına maruz kalmadan saf olarak elde edilmesi açısından özellikle de RNA kromatografisinde arzu edilen bir durumdur. Şekilden de görüldüğü gibi MAG miktarının artması dengeye ulaşma süresini de artırmaktadır. Bu durum, aktif etkileşim bölgelerine ulaşma, etkileşme ve bölgeleri tamamıyla doldurma için gerekli olan hem madde miktarı ve hem de sürenin artmasına bağlıdır. Sonuç olarak tez kapsamında geliştirilen poli(HEMA-MAG) kriyojellerin de RNA kromatografisi için oldukça uygun olduğu söylenebilir.



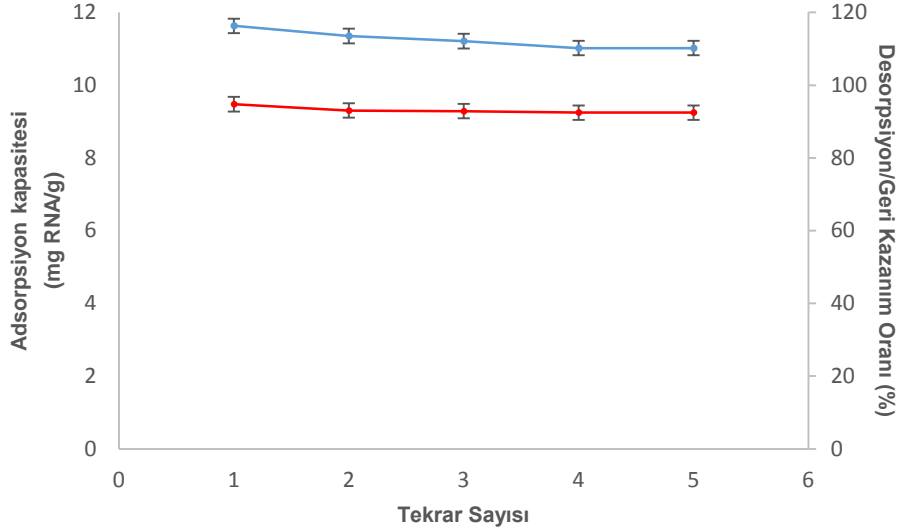
Şekil 4.21. Farklı miktarlarda guanin içeren poli(HEMA-MAG) kriyojeller ile RNA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi:

RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), T: 25°C.

4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

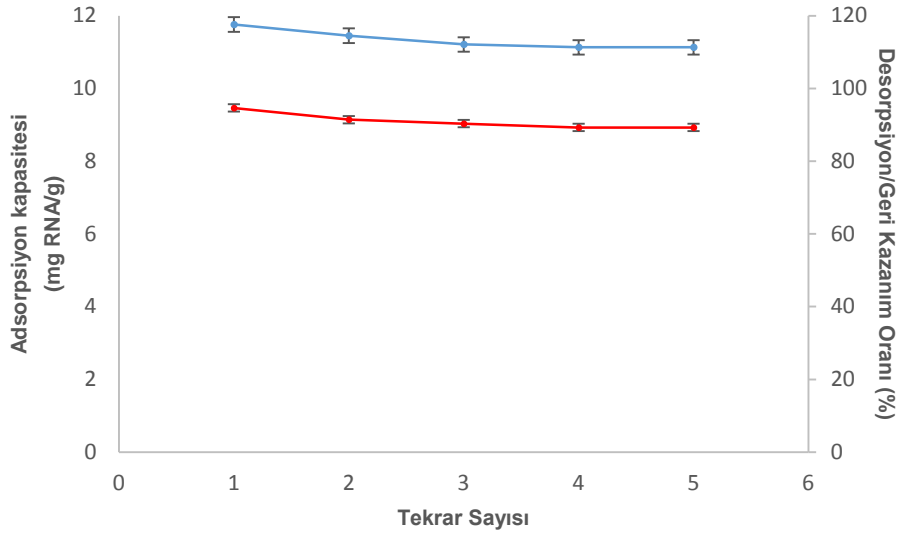
RNA desorpsiyonu 0.1 M HCl çözeltisi ile kesikli sistemde çalışılmıştır. Kriyojellerde adsorplanan RNA, HCl içerisinde 30 dakika kesikli sistemde 250 rpm’de oda sıcaklığında desorbe edilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki RNA son derişimi, 260 nm’de yapılan ölçümler ile elde edilmiştir. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100

kriyojellerden RNA desorpsiyon yüzde oranları sırasıyla %94.8 ve %94.6 olarak hesaplanmıştır. HCl kuvvetli bir asittir, dolayısıyla ligand-çözünen kompleksinin art arda çözülmesi için oluşan hidrojen bağlarını zayıflatmaktadır [159].



Şekil 4.22. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği:

RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.



Şekil 4.23. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği:

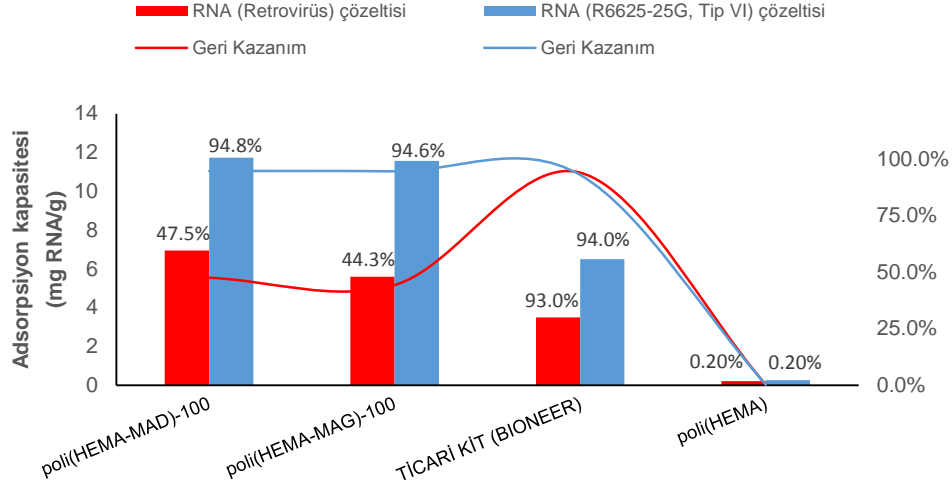
RNA derişimi: 100 mg/L, pH: 7.0 (fosfat tamponu), adsorpsiyon süresi: 1 saat, T: 25°C.

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek için ise RNA adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojelleri kullanarak 5 kez tekrarlanmıştır. Bir adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra sterilizasyon için, kriyojeller 2 mM NaOH çözeltisinde 30 dak. yıkanmıştır. Bu işlemden sonra, kriyojeller distile su ile yine 30 dak. yıkanmış, sonra fosfat tamponuyla (pH: 7.0) bir sonraki döngü için dengeye getirilmiştir. Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te görüldüğü üzere, kriyojeller oldukça kararlıdır ve adsorpsiyon kapasitesi neredeyse sabit kalmıştır. Tekrarlanan 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün sonunda, adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma olmamıştır. 5'inci döngü sonrasında poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin adsorpsiyon kapasiteleri sadece %7.5 ve %10.8 oranında azalarak sırasıyla 11.02 ve 11.13 mg/g olarak belirlenmiştir.

4.4. Doğal Kaynaktan RNA Adsorpsiyonu

Sentezlenen poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve poli(HEMA) kriyojellerin doğal kaynaktan RNA adsorpsiyon performanslarını değerlendirmek ve bu performansı ticari kitle karşılaştırmak için Rotavirüs seçildi. Rotavirüs ülkemizde ve tüm dünyada küçük çocuklardaki akut gastroenteritin en önemli etkenidir [160]. Gaita örneğinin fosfat tamponu (pH: 7.0) içerisinde %10 olacak şekilde sulu çözeltisi hazırlandı. Vorteks kullanılarak homojenizasyonu sonrasında 12.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın 50 µL'si adsorpsiyon işleminde kullanıldı. Adsorpsiyon işlemi 60 dakika boyunca oda koşullarında gerçekleştirildi. Ayrıca doğal ortamdan elde edilen Rotavirüs kaynaklı RNA derişim miktarları Nanodrop (Denovix, DS-11, ABD) kullanılarak 156.86 mg/L olarak ölçüldü. Yapılan hesaplamalar sonucunda poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100, poli(HEMA) ve ticari kit ile adsorbe edilen RNA miktarları sırasıyla 6.94 mg/g, 5.59 mg/g, 0.20 mg/g ve 3.5 mg/g olarak belirlendi (Şekil 4.24). Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100, poli(HEMA)'ya göre oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu da poli(HEMA)'nın yapısına katılan MAD ve MAG monomerlerinin kompleks doğal kaynak ortamında bile RNA'ya karşı yüksek seçicilik gösterdiğinin bir kanıtıdır. Bununla birlikte adsorbe edilen RNA poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerden sırası ile %47.5 ve %44.3 desorpsiyon oranıyla denatüre olmadan tekrar elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem RNA saflaştırmada etkin bir şekilde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca bu sonuçlar ticari kit ile karşılaştırıldığında yine geliştirilen kriyojellik membranların piyasada etkili olduğu bilinen kitlelere (BIONEER, ExiPrep™ Plus, Viral, DNA/RNA) göre oldukça yüksek

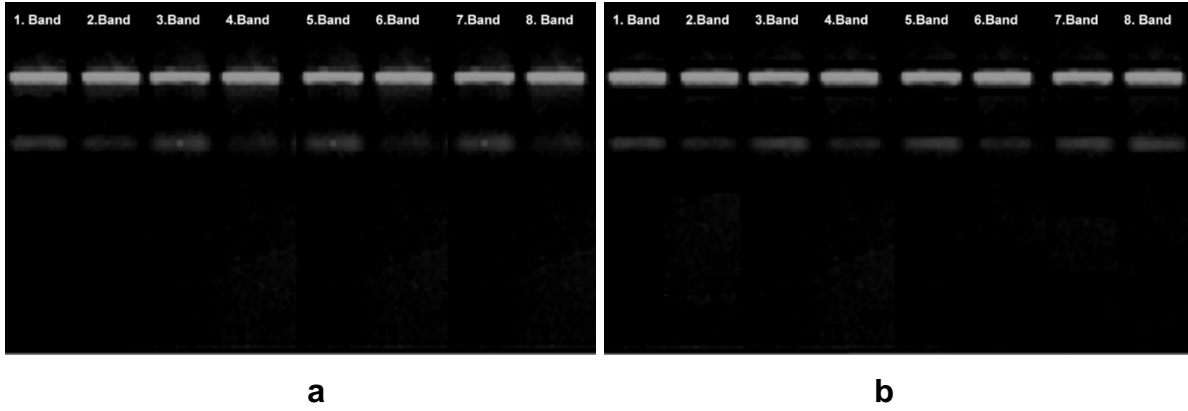
adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu ve yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü deneylerinden elde edilen sonuçlara göre de tek kullanımlık ticari kitlere göre tekrar kullanılabilirlik açısından oldukça avantajlı olduğu açıktır.



Şekil 4.24. Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100, poli(HEMA) ve ticari kite ait, sulu RNA (başlangıç RNA derişimi 100 mg/L) çözeltisi ve Rotavirüs bulunduğu bilinen çözeltiden (başlangıç RNA derişimi: 157 mg/L) elde edilen RNA adsorpsiyon-desorpsiyon sonuçları.

4.5. Elektroforetik Ayırma

Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve ticari kit (BIONEER, ExiPrep™ Plus, Viral DNA/RNA) ile adsorpsiyonu gerçekleştirilen RNA desorpsiyon işleminden sonra saf olarak elde edildi ve saflığının araştırılması için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Daha önce de belirtildiği gibi RNA molekülleri yüksek molekül kütlesine sahiptir. Şekil 4.25a sulu çözeltiden RNA adsorpsiyonu sonucu elde edilen RNA'ya ait jel görüntülerini ve Şekil 4.25b de doğal kaynaktan adsorbe edilen RNA'nın agaroz jel elektroforez görüntülerini vermektedir. Şekillerden de görüldüğü üzere poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve ticari kit için desorpsiyon sonucu elde edilen RNA bandı marker ile aynı seviyededir. Bu sonuç, geliştirilen kriyojel ve nükleik asit bazları temelli adsorbentlerin, kütlelerle karşılaştırıldığında hem saflık ve hem de denatürasyona uğramadan RNA eldesi gibi önemli bir kromatografik performansa sahip oldukları görülmektedir.



Şekil 4.25. Poli(HEMA-MAD)-100 (2., 3. ve 4. bandlar) ve Poli(HEMA-MAG)-100 (6., 7. ve 8. bandlar) kriyojellerden a) sulu çözültide ve b) doğal ortamda RNA'nın elektroforetik ayrımı;

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| a) 1. Band: Marker, | b) 5. Band: Marker, |
| 2. Band: RNA Başlangıç Derişimi, | 6. Band: RNA Başlangıç Derişimi, |
| 3. Band: Adsorpsiyon Sonrası Derişim, | 7. Band: Adsorpsiyon Sonrası Derişim, |
| 4. Band: Desorpsiyon Sonrası Derişim. | 8. Band: Desorpsiyon Sonrası Derişim. |

Agaroz jel elektroforez görüntülerden de anlaşılacağı gibi RNA marker ve desorbe edilen RNA'lar aynı bölgede bulunmaktadır. Bu da elde edilen RNA'ların istenen analitik saflıkta olduğunun bir kanıtıdır. Yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarında RNA'nın saflığından bir kayıp olmamış, geliştirilen kriyojelik membranlar RNA'nın 3 boyutlu yapısını koruyacak şekilde etkisini göstermiştir.

4.6. Literatür İle Karşılaştırma

Bu tezin ikinci bölümünde verilen özellikle Çizelge 2.3 ve 2.4'de de görüleceği gibi afinite etiketleme (affinity tag) [123, 124], özellikle histidin veya arjinin gibi amino asitlerin olduğu amino-asit RNA afinitesi [127, 128], ters faz kromatografisi [111], iyon çifti ters faz kromatografisi [112-114] ve anyon değişim kromatografisi [102, 118-121] gibi pek çok afinite kromatografisi yöntemi, RNA saflaştırma tekniği olarak geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bunlardan başka preparatif denatürasyon PAGE [97,98] ve lityum klorür çöktürmesi gibi [99-102] izolasyon teknikleri de etkili sonuçlar vermiştir. Bu yöntemlerin pek çoğu zaman alıcı işlemlerdir ve elde edilen RNA miktarı oldukça düşük ve bazılarında ise ölçeklendirme ve saflaştırma zor olmaktadır [95, 97-102,125,126]. Cury ve arkadaşları *Streptococcus mutans* biyofilmlerinden gerçek zamanlı (real-time) kantitatif ters transkriptaz PCR (RT-PCR) ile RNA saflaştırmışlar ve adsorpsiyon kapasitesini $92.0 \pm 0.6 \mu\text{g RNA/ 100 mg}$ biyofilm olarak elde etmişlerdir [161]. Yine aynı grup 4 farklı protokol kullanarak 170.6 ± 7.4 , 547.2 ± 23.4 , 480.1 ± 84.9 ve $278.5 \pm 49.1 \mu\text{g RNA/ 100 mg}$ biyofilm elde etmişlerdir. Pereira ve arkadaşları Alzheimer

hastalığında kilit rol oynadığı düşünölen farklı mikroRNA ifadelerinden biri olan miR-29'u izole etmek için arjinin afinite kromatografisi kullanmışlar ve farklı yıkama stratejilerinde %90 saflıkta $12.40 \pm 0.40 \mu\text{g}$ (30 μg sRNA örneği içerisinde) miR-29 elde etmişlerdir [162]. Yu ve arkadaşları kil mineralleri ile yaptıkları çalışmada K10 montmorilonit ile 2.1 mmol adenin/g montmorilonit elde etmeyi başarmışlardır [163]. Buradaki temel etkileşimin iyon değişimi ve elektrostatik kuvvetler şeklinde olduğu rapor edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde genel olarak niteleyici araştırmalar yapıldığı görölmektedir. Nunes ve arkadaşları ultrafiltrasyon yöntemi ile plazmid RNA ayırıştırması yapmışlar ve adsorpsiyona ait modellemeleri rapor etmişlerdir. Bu grup ekstrakte ettikleri plazmid RNA'nın saflığını agaroz jel elektroforezi ile göstermişlerdir [164]. Lin ve arkadaşları kimyasal olarak modifiye edilmiş RNA aptamerlerin HPLC yöntemiyle saflaştırılmasını çalışmışlar ve çalışmaya ait nükleotid dizisini yayınlamışlardır [165]. Stark ve arkadaşları farklı bakteri kültürlerinden farklı yöntemler kullanarak elde ettikleri toplam RNA'yı komşu bağlama (neighbour-joining) yöntemi ile analiz ederek karakterizasyonlarını yapmışlardır [166]. Edelman ve arkadaşları *in-vitro* RNA transkripsiyonu ve t-RNA iskele teknolojisi ile elde ettikleri RNA'nın kalite kontrolünü PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanarak göstermişlerdir [167]. Görüldüğü üzere bu tez kapsamında geliştirilen yöntem ve nükleik asit bazı içeren benzer çalışmalar daha önceden hiç araştırılmamış olup oldukça özgün bir yaklaşımdır. Literatürdeki özellikle kantitatif analizlere bakıldığında, çalışmada saflaştırılan miktar poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için sulu çözeltiden ve doğal ortamdaki 11.86 ve 6.94 mg/g; poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için mg/g 11.94 ve 5.59 mg/g oldukça yüksek değerlerdir. Yapılan agaroz jel elektroforez görüntüleri de saflaştırılan RNA'nın oldukça yüksek saflıkta olduğunu da kanıtlamaktadır. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller RNA adsorpsiyonu için oldukça etkin, düşük maliyetli ve kısa sürede gerçekleşebilen bir yöntem olarak gelecekte önemli RNA saflaştırma işlemlerinde kullanılabilecek bir yaklaşımdır.

4.7. Matematik Modellemeler

4.7.1. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi her bir analitin absorban ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Bu, çözeltideki analit derişimi ve iki faz (katı-sıvı veya katı-gaz) dengedeyken katı faza adsorplanan analit miktarı arasındaki ilişkiyi anlamamızı sağlamaktadır.

Langmuir adsorpsiyon modeli, moleküllerin sabit sayıda iyi tanımlanmış bölgelere adsorplandığını ve her birinin sadece bir molekül tutacağını öngörmektedir. Ayrıca bu bölgelerin de enerji bakımından eşit olduğunu ve birbirinden yeterince uzak olduğunu ve bundan dolayı da komşu bölgelere adsorplanan moleküller arasında herhangi yanal bir etkileşim olmadığını varsaymaktadır.

Adsorpsiyon izotermi, analitin adsorpsiyon sürecinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1' de verilmiştir. RNA için denge verilerine karşılık gelen dönüşümleri sonucunda lineer (çizgisel) bir grafik elde edilmektedir ki bu Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini gösteren aşağıdaki denklemlerle ifade edilmektedir:

$$Q_{eq} = \frac{Q_{max} \times b \times C_{eq}}{1 + bC_{eq}} \quad (4.1)$$

Q_{eq} adsorplanmış deneysel RNA miktarı (mg/g), C_{eq} denge RNA derişimi (mg/L), b Langmuir sabiti (L/mg) ve Q_{max} maksimum teorik adsorpsiyon kapasitesini göstermektedir (mg/g).

Bu denklem lineerize edildiğinde;

$$\frac{1}{Q_{eq}} = \left[\frac{1}{Q_{max} \cdot b} \right] \left[\frac{1}{C_{eq}} \right] + \left[\frac{1}{Q_{max}} \right] \quad (4.2)$$

elde edilmektedir. $1/C_{eq}$ 'ye karşı $1/Q_{eq}$ grafiğinin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{max}$ değerini ve eğimi $1/Q_{max} \cdot b$ değerini vermektedir (Şekil 4.26a).

Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellere ait maksimum teorik adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) deneysel verilerden elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Langmuir korelasyon katsayısı (R^2) poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için oldukça yüksektir. Bu sonuç, Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite sistemine uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Bir başka tanımla, poli(HEMA-MAD)-100 kriyojellere RNA adsorpsiyonu tek basamaklı olarak gerçekleşmekte, MAD grupları polimer zincirine homojen olarak dağılmış ve RNA molekülleri MAD grupları arasında herhangi bir tercih yapmadan eş-enerjili olarak etkileşmekte ve yanlı bir etkileşim sınırlaması oluşmaktadır.

Diğer izoterm ise, sık sık adsorpsiyon davranışlarını göstermekte kullanılan Freundlich izotermidir. Bu izoterm, heterojen yüzeye adsorpsiyonda Langmuir izotermine diğer bir formudur. Adsorplanan analit tüm bağlanma bölgelerine olan adsorpsiyonun

toplama eşittir. Freundlich izotermi tersinir adsorpsiyonu tanımlar ve tek katman oluşumuyla kısıtlı değildir.

Freundlich izoterminin en basit hali şu şekildedir;

$$Q_{eq} = K_F C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad (4.3)$$

K_F ve $1/n$ Freundlich sabitleridir. Eşitliğin lineer hali ise;

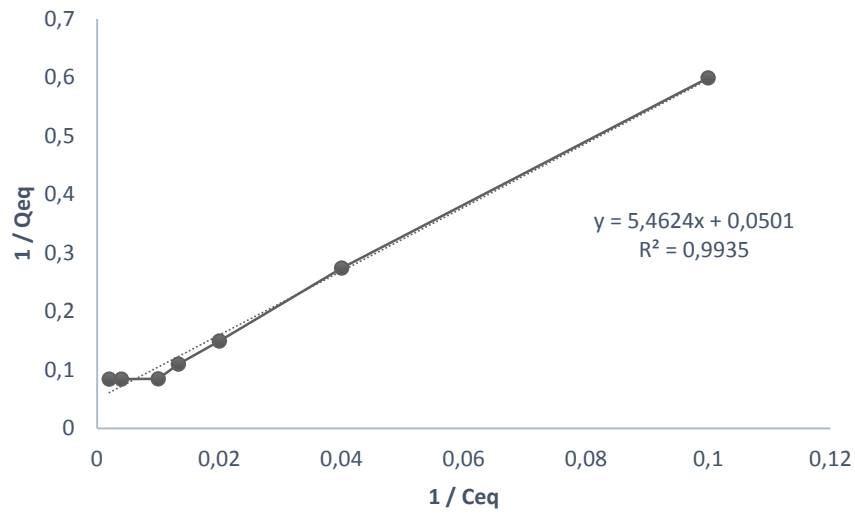
$$\ln Q_{eq} = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_{eq} \quad (4.4)$$

$\ln Q_{eq}$ 'a karşı $\ln C_{eq}$ grafiğinde, eksen kesen nokta $\ln K_F$ ve eğim $1/n$ değerini bulmak için kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği üzere Freundlich izotermi, yüzey heterojenitesini gösteren iki parametre içermektedir, K_F ve $1/n$. $1/n$, 0 ve 1 arasında değişen yüzey heterojenite indeksidir. 1.0'e yaklaşırsa, polimerin heterojen yüzeye sahip olduğu kabul edilmektedir. Poli(HEMA-MAD) kriyojellerin $1/n$ değerinin 0.513 olması, yüzeyin homojen olduğunu göstermekte ve poli(HEMA-MAD) kriyojeller üzerine adsorpsiyon işleminin çok katmanlı adsorpsiyon şeklinde olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır. RNA adsorpsiyon izotermi tüm derişim aralığı çalışmalarında doğrusal çıkmıştır ve korelasyon katsayısı yüksektir. İzotermilerin korelasyon katsayıları göz önüne alındığında, Langmuir adsorpsiyon modeli oldukça uygundur. Ayrıca teorik Q_{max} değeri deneysel Q_{eq} değerine yakındır. Bu durum kriyojellerin sterik engellemeler içermediğini belirtmektedir.

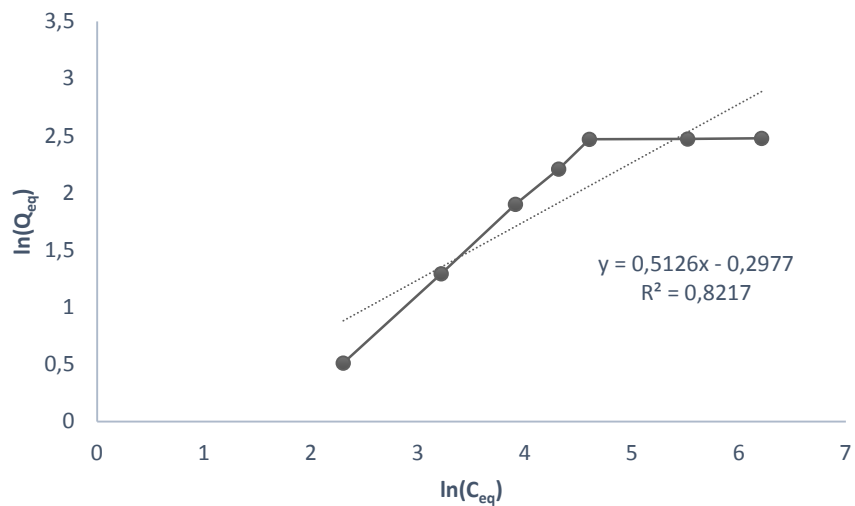
Langmuir ve Freundlich izotermi poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için elde edilen verilere uygulanmış ve izoterm parametreleri hesaplanmıştır. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere ait maksimum teorik adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) deneysel verilerden 28.5 mg/g olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Langmuir korelasyon katsayısı (R^2) poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için de oldukça yüksektir. Bu sonuç Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite sistemine de uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin $1/n$ değeri 0.636 olarak hesaplanmış ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller üzerine adsorpsiyon işleminin çok katmanlı adsorpsiyon şeklinde olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak, poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeline göre heterojenliğin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun oluşturulan hidrojen bağ sayısı ile ilgili olduğunu düşünülmektedir. MAG monomeri 3 hidrojen bağı yapabilen gruplara sahip olduğu için heterojen etkileşim olasılığı daha yüksektir. Buna bağlı olarak $1/n$ değeri 1'e daha yakındır. RNA adsorpsiyon izotermi tüm derişim aralığı

çalışmalarında doğrusal çıkmıştır ve korelasyon katsayısı yüksektir. İzotermelerin korelasyon katsayıları göz önüne alındığında, Langmuir adsorpsiyon modelinin daha uygun olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca teorik Q_{max} değeri, deneysel Q_{max} değerine yakındır. Bu sonuç, poli(HEMA-MAG) kriyojellerde herhangi bir difüzyon problemi, sterik engel ve afinite etkileşiminde sınırlama olmadığını göstermektedir.

Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojelleri için uygulanan izotermelerin denklemi ve hesaplanan parametreler Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

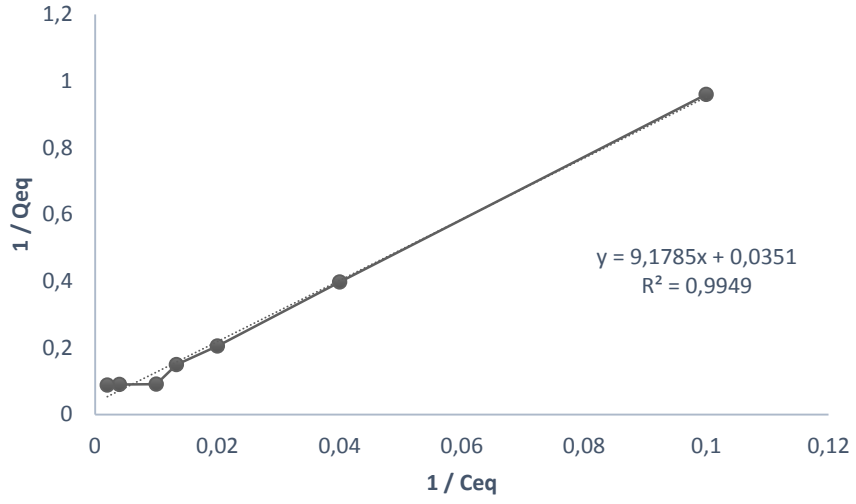


a

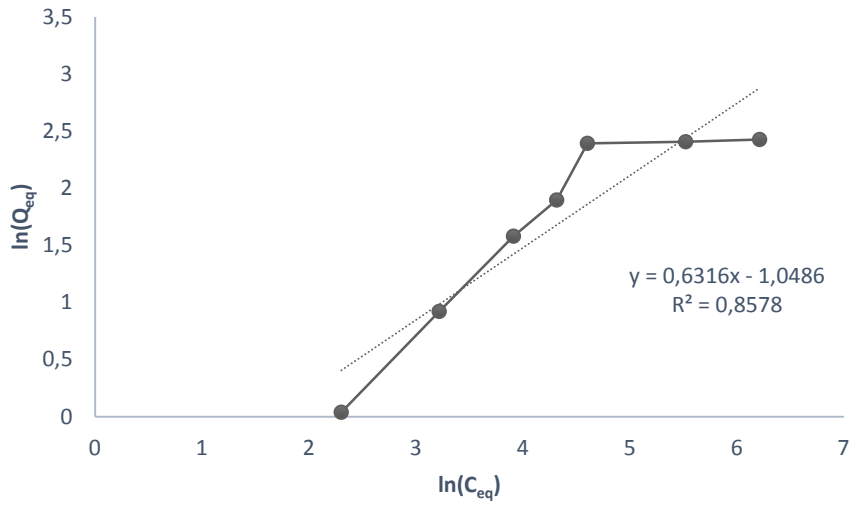


b

Şekil 4.26. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için
a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermi



a



b

Şekil 4.27. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için
a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermi

Çizelge 4.2. RNA adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Adsorpsiyon İzotermi		Langmuir Ads. İzotermi			Freundlich Ads. İzotermi		
		$\frac{1}{Q_{eq}} = \left[\frac{1}{Q_{max} \cdot b} \right] \left[\frac{1}{C_{eq}} \right] + \left[\frac{1}{Q_{max}} \right]$			$\ln Q_{eq} = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_{eq}$		
Parametreler	$Q_{deneyisel}$	Q_{max} (mg/g)	b (L/mg)	R^2	K_F	$1/n$	R^2
Poli(HEMA-MAD)-100	11.92	19.96	0.00917	0.9935	0.743	0.5126	0.8217
Doğru denklemi		$y = 5,4624x + 0,0501$			$y = 0,5126x - 0,2977$		
Poli(HEMA-MAG)-100	11.11	28.49	0.00382	0.9949	0.350	0.6316	0.8578
Doğru denklemi		$y = 9,1785x + 0,0351$			$y = 0,6316x - 1,0486$		

4.7.2. Adsorpsiyon Kinetik Modelleme

Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemlerinin kontrol mekanizmalarının açıklanması amacıyla deneysel verileri kinetik modeller ile test etmek gerekmektedir. Kinetik modeller (yalancı - birinci ve ikinci derece denklemler) ölçülen derişimlerin adsorban yüzey derişimlerine eşit olduğu durumlarda kullanılabilir. Lagergren birinci-derece hız denklemi sıvı çözeltiden katı yüzeye adsorpsiyonda en çok kullanılan denklemlerden biridir. Aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (4.4)$$

k_1 , yalancı- birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (1/dak) ve q_{eq} ve q_t sırasıyla dengedeki ve t anındaki adsorplanan RNA miktarlarını (mg/g) göstermektedir.

Sınır değerler, $t=0$ için $q_t=0$ ve $t=t$ için $q_t=q_t$, belirlendikten sonra integrasyon uygulandığında;

$$\log \left[\frac{q_{eq}}{q_{eq}-q_t} \right] = \frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.5)$$

Denklem 4.5 doğrusal formu elde etmek için tekrar organize edilirse;

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.6)$$

elde edilir. t'ye karşı $\log(q_{eq}-q_t)$ grafiği bu kinetik modelin adsorpsiyon sistemine uygulanabilmesi için doğrusal bir grafik vermelidir. Asıl birinci- derece işlemde $\log(q_{eq})$, $\log(q_{eq}- q_t)$ ile t'nin grafiğinin kesimine (intercept) eşit olmalıdır. Bunlara ek olarak, denge adsorpsiyon kapasitesine dayalı yalancı-ikinci derece denklem aşağıdaki şekilde ifade edilebilmektedir:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (4.7)$$

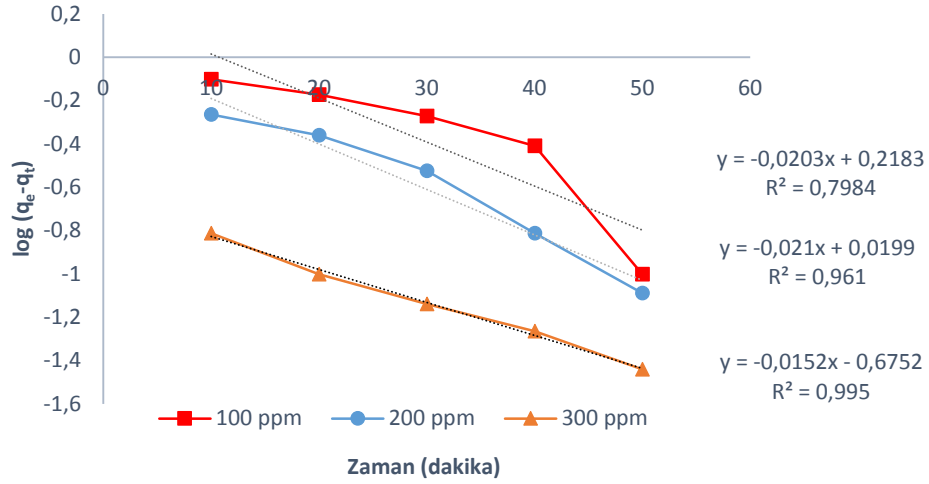
k_2 (g/mg.dak) yalancı-ikinci derece adsorpsiyon işleminin hız sabitidir. Denklem 4.7' ye, $t=0$ için $q_t=0$ ve $t=t$ için $q_t=q_t$ sınırlarında, integrasyon uygulanırsa, sonuç;

$$\left[\frac{1}{q_{eq}-q_t} \right] = \frac{1}{q_{eq}} + k_2 t \quad (4.8)$$

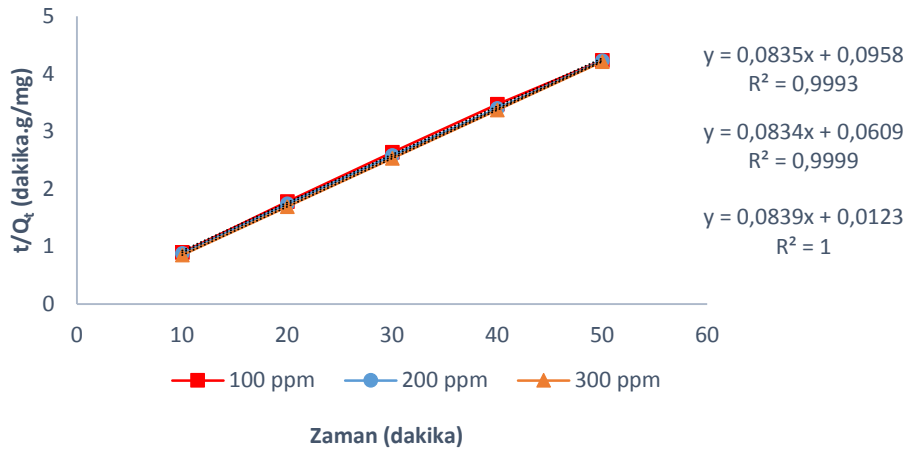
Veya doğrusal forma eşit olarak;

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{eq}^2} + \frac{1}{q_{eq}} t \quad (4.9)$$

elde edilir. t'ye karşı t/q_t grafiği, ikinci-derece kinetik modelinin adsorpsiyon sistemine uygulanabilir olması için doğrusal bir bağıntı vermelidir. Hız sabiti (k_2) ve dengedeki adsorpsiyon (q_{eq}), sırasıyla, kesim (intercept) noktasından ve eğimden elde edilebilmektedir. Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'dan alınan deneysel adsorpsiyon kapasitesinin ve teorik değerlerin karşılaştırılması Çizelge 4.3'de verilmiştir. Yalancı-ikinci derece kinetik modelinden elde edilen teorik q_e değeri deneysel değerlere yakındır ve korelasyon katsayısı yüksektir. Sonuçlar değişik derişimler için R^2 değerlerinin genelde 1.00' a yakın olduğunu göstermektedir. Poli(HEMA-MAD)-100 krijojeller ikinci derece kinetik modele uymaktadır.



Şekil 4.28. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-birinci derece kinetik modeli.

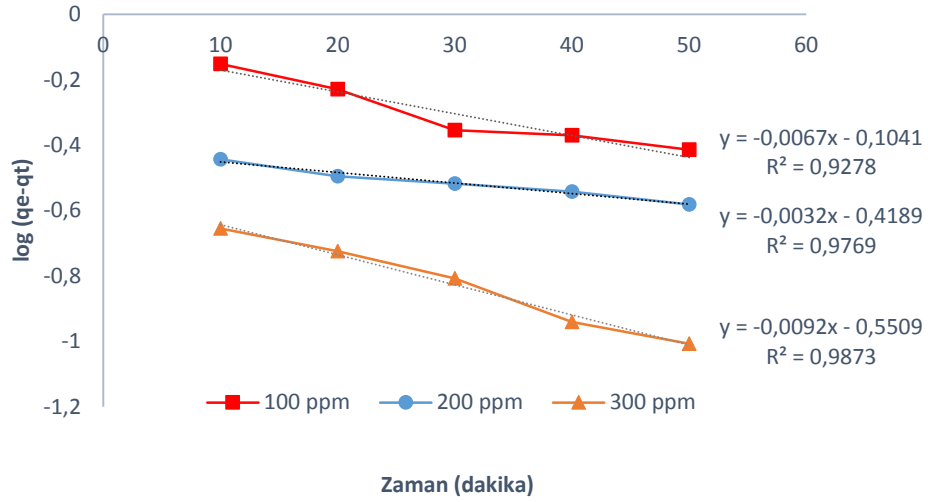


Şekil 4.29. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-ikinci derece kinetik modeli.

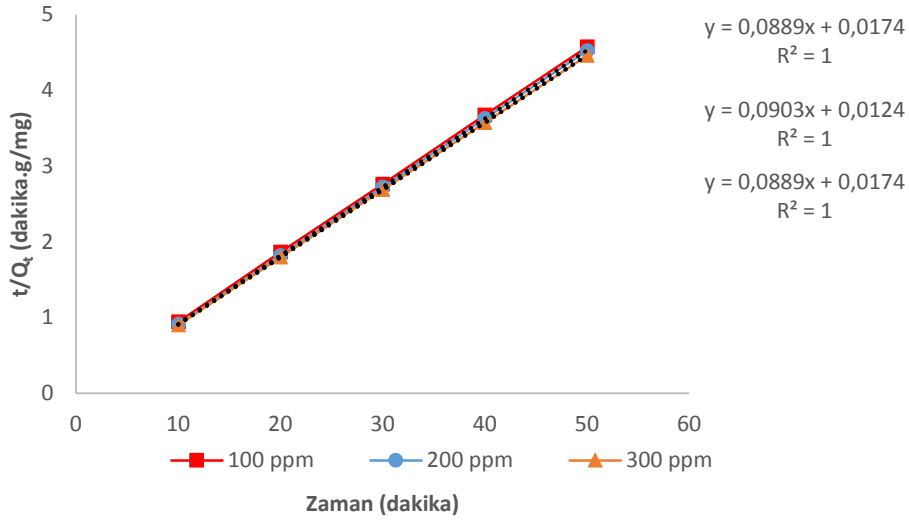
Çizelge 4.3. Poli(HEMA-MAD)-100 kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri.

Başlangıç RNA Derişimi (mg/mL)	$q_{deneyisel}$ (mg/g)	Yalancı-Birinci Derece			Yalancı-İkinci Derece		
		q_e (mg/g)	k_1 (1/dak.)	R^2	q_e (mg/g)	k_2 (1/dak.)	R^2
100	11.82	1.653	0.0468	0.799	11.919	0.573	0.999
200	11.84	1.047	0.0484	0.961	11.919	0.573	0.999
300	11.89	0.211	0.035	0.995	11.919	0.573	1.000

Aynı şekilde Şekil 4.30 ve Şekil 4.31' den alınan deneysel adsorpsiyon kapasitesinin ve teorik değerlerin karşılaştırılması Çizelge 4.4' de verilmiştir. Yalancı-ikinci derece kinetik modelinden elde edilen teorik q_e değeri poli(HEMA-MAG)-100 kriyojelleri ile elde edilen deneysel değerlere yakındır ve korelasyon katsayısı göreceli olarak oldukça yüksektir. Sonuçlar değişik derişimler için R^2 değerlerinin genelde 1.00' a yakın olduğunu göstermektedir. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller de ikinci derece kinetik modele uymaktadır. Her iki kriyojelde de ikinci derece kinetik modele uygunluk beklenen bir sonuçtur. Çünkü geniş ve birbirine bağılı gözenekli yapı, kriyojellere analit çözeltilisinin kolaylıkla difüzyonuna olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla difüzyon işlemleri, adsorpsiyon sürecinde hız belirleyici basamak olamamaktadır. Buna bağılı olarak, adsorpsiyon işlemleri, analit ile polimerik yüzey arasındaki etkileşim süresi ve hızı ile kontrol edilmektedir. Bu durum, iki etken derişimine (analit ve ligand derişimi) bağılı olmakta ve adsorpsiyon işlemleri yalancı-ikinci derece kinetik ile açıklanabilmektedir. Bir başka ifade ile kriyojellere RNA adsorpsiyonu kimyasal kontrollü olarak yürümekte ve adsorpsiyon süreci hem RNA derişimine, hem polimerik yüzeydeki ligand miktarı ve türüne ve hem de bu iki bileşen arasındaki kimyasal etkileşim kuvvetine bağılıdır.



Şekil 4.30. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-birinci derece kinetik modeli.



Şekil 4.31. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için deneysel verilerin yalancı-ikinci derece kinetik modeli.

Çizelge 4.4. Poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri.

Başlangıç RNA Derişimi (mg/mL)	Q _{deneysel} (mg/g)	Yalancı-Birinci Derece			Yalancı-İkinci Derece		
		q _e (mg/g)	k ₁ (1/dak.)	R ²	q _e (mg/g)	k ₂ (1/dak.)	R ²
100	10.93	0.787	0.0154	0.928	11.249	0.454	1.000
200	11.05	0.381	0.0074	0.977	11.249	0.454	1.000
300	11.21	0.281	0.0212	0.988	11.249	0.454	1.000

5. YORUM

- RNA adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları kesikli sistemde yapılmıştır.
- Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojeller kopolerimerizasyon metodu ile elde sentezlenmiştir. Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin spesifik yüzey alanı sırasıyla 6.7 ve 5.2 m²/g bulunmuştur.
- Taramalı elektron mikro grafiklerinden anlaşıldığı üzere poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojellerin gözenekleri, büyük RNA moleküllerinin girmesi ve tutunabilmesi için oldukça büyüktür.
- MAD ve MAG monomerlerinin katılım derecesini hesaplamak için, sentezlenen poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin FTIR analizleri yapılmıştır. Elde edilen grafikler incelendiğinde yapının içerisine MAD ve MAG katılımının başarıyla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin termal kararlılığını incelemek için termogravimetrik analizler yapılmıştır. MAD ve MAG komonomerlerinin HEMA monomerine eklenmiş olması poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin termal kararlılığını artırmıştır. Polimer yapının bozunması poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 için sırasıyla 417.86°C ve 472.60°C sıcaklıklarında gerçekleşmiştir.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellere RNA adsorpsiyonu çözeltinin pH'ına bağlıdır. Bunun açıklanabilmesi için, asetat (4-5), fosfat (6-8) ve karbonat (9) tamponları kullanılarak değişik pH'larda ölçümler alınmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH:7.0 fosfat tamponunda poli(HEMA-MAD)-100 için 11.86 mg/g ve poli(HEMA-MAG)-100 için ise yine aynı pH için 11.94 mg/g olarak bulunmuştur. Başlangıç RNA derişimi 100 mg/L ve poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 yapısındaki adenin ve guanin miktarları 100 mg'dır.
- Sentezlenen kriyojellerin adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılmaları amacıyla poli(HEMA) kriyojeller sentezlenmiş ve optimum deney koşullarında RNA adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir.
- Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve poli(HEMA) kriyojellerin RNA maksimum adsorpsiyon kapasitesi sulu çözeltide oda sıcaklığında sırasıyla 11.86, 11.94 ve 0.20 mg/g olarak hesaplanmıştır.

- Poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojellere RNA denge adsorpsiyonu sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Bunun sebebi sıcaklık arttıkça ilgili nükleotidler (A-U ve G-S) arasında meydana gelen hidrojen bağlarının zayıflamasıdır.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin sulu çözeltilerden RNA desorpsiyonu kesikli sistemde yürütülmüştür. Kriyojellere, desorpsiyon ajanı olarak HCl uygulanmış ve sırasıyla %94.8 ve %94.6 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojelleri kullanarak 5 kez tekrarlanmıştır. 5 döngü sonunda adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir. 5 döngü sonunda geri kazanım değerleri poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojeller için sırasıyla %92.5 ve %89.3'dür.
- Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve poli(HEMA) kriyojellerin doğal ortamdaki adsorpsiyon performanslarını incelemek amacıyla insan gaitasından hazırlanan, içerisinde Rotavirüs olduğu bilinen (Gaita numunesinin, fosfat tamponu (pH: 7.0) içerisinde %10 olacak şekilde, sulu çözeltisi hazırlanmıştır.) çözelti kullanılmıştır. Poli(HEMA-MAD)-100, poli(HEMA-MAG)-100 ve poli(HEMA) kriyojellerin RNA adsorpsiyon kapasiteleri sırası ile 6.94, 5.59 ve 0.20 mg/g RNA olarak hesaplanmıştır.
- Bu kriyojellerin performansı ticari kit (BIONEER, ExiPrep™, Plus, Viral DNA/RNA) ile karşılaştırılmıştır. Kit kullanımı sonucu sulu çözeltilerden 6.5 mg/g ve doğal ortamdan 3.5 mg/g RNA adsorplanmış ve bu da tez kapsamında kullanılan kriyojellerin performansı ile karşılaştırıldığında kriyojellerin oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ticari kitin desorpsiyon oranı ise sulu çözeltilerde %93.0 ve doğal ortamda %94.6 olarak hesaplanmıştır.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerden, doğal ortamda adsorbe edilen RNA'nın desorpsiyon oranları sırası ile %47.5 ve %44.3 olarak elde edilmiştir.

- Safılaştırılan RNA'nın saflığını incelemek için, sulu çözeltide ve doğal ortamda adsorbe edilen RNA'nın desorpsiyonu sonucu elde edilen RNA çözeltileri için elektroforetik analiz yapılmıştır. Desorbe edilen RNA, elde edilen jel görüntülerinden de anlaşılacağı gibi saf RNA marker ile aynı seviyededir. Bu da RNA'nın istenilen saflıkta elde edildiğinin bir göstergesidir.
- Poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerin maksimum RNA adsorpsiyonu için deneysel maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) ve Langmuir (Q_{max}) değeri birbirine çok yakındır. Langmuir izotermine göre hesaplanan korelasyon katsayısı (R^2) her iki kriyojel için de 0.99 iken, Freundlich izotermi için sırasıyla 0.82 ve 0.86'dır. Langmuir adsorpsiyon modeli bu adsorpsiyon sistemleri için uygun olan modeldir.
- RNA adsorpsiyon kinetiklerini analiz etmek için, yalancı-birinci derece ve yalancı-ikinci derece kinetik modelleri poli(HEMA-MAD)-100 ve poli(HEMA-MAG)-100 kriyojellerine ait RNA adsorpsiyonu deneysel verilerine uygulanmıştır. Kriyojellere ait teorik ve deneysel q_{eq} değerlerinin ikinci-derece kinetik hesaplamaları için oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca her iki kriyojelle ait yalancı ikinci derece kinetikler için korelasyon sabitleri (R^2) 1 olarak elde edilmiştir. Bu iki sisteme ikinci derece kinetik modeli oldukça uygundur. Elde edilen verilere göre adsorpsiyon sürecinde difüzyon sorunu yoktur ve adsorpsiyon kimyasal kontrollü gerçekleşmiştir.
- Tez kapsamında sentezlenen poli(HEMA-MAD) ve poli(HEMA-MAG) kriyojeller literatürde ilk defa sentezlenmiş ve şu ana kadar kullanılan RNA saflaştırma tekniklerine göre oldukça etkili sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Deneysel sonuçlara ve bu sonuçlara uygulanan matematiksel modellemelere bakıldığında, sentezlenen kriyojellerin RNA adsorpsiyon performansları, bu yöntemin gelecekte RNA saflaştırma ve benzeri deneysel çalışmalar için oldukça umut verici olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kennedy, R.M., Hydrophobic Chromatography, *Methods in Enzymology*, 182, 339-343, **1991**.
- [2] Garcia, F.A.P., Pires, E.M.V., Recovery Processes for Biological Materials, *Chromatography*, 415-451, **1993**.
- [3] Scouten, W.H., *Affinity Chromatography*, New York: John Wiley and Sons, **1981**
- [4] Scopes, R.K., Stoter, A., Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract, *Methods in Enzymology*, 90, 479-490, **1982**.
- [5] Turkova, J., *Bioaffinity. and Chromatography*, Second. Completely Revised Edition, *Journal of Chromatography Library*, Elsevier Science Ltd; 2 Rev Sub edition, **1993**.
- [6] Köse, K., *Lizozim Saflaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Manyetik Nanopartiküller*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2011**.
- [7] Lozinsky, V.I., Galaev, I. Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H. Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.*, 21, 445-451, **2003**.
- [8] Dainiak, M.B., Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels, *J Chromatogr A*, 1045 (1-2), 93-98, **2004**.
- [9] Uzunoğlu, G., *Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Takili Phema Kriyojel İle Kandan Kolesterol Uzaklaştırılması*, Gizem Uzunoğlu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2013**.
- [10] Daròs, J.A., Elena, S.F., Flores, R., Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth, *EMBO Rep.*, 7 (6), 593-598, **2006**.
- [11] Kalendar, R., Vicient, C.M., Peleg, O., Anamthawat-Jonsson K, Bolshoy A, Schulman AH, Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes, *Genetics*, 166 (3), 1437-1450, **2004**.

- [12] Podlevsky, J.D., Bley, C.J., Omana, R.V., Qi, X., Chen, J.J., The telomerase database, *Nucleic Acids Res.*, 36 (Database issue), D339-343, **2008**.
- [13] Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H. S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F. Jr., Hohn, T., Pooggin, M. M., Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing, *Nucleic Acids Res.*, 34 (21): 6233-6246, **2006**.
- [14] Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S., Deb, J.K., RNA interference: potential therapeutic targets, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65 (6), 649-657, **2004**.
- [15] Schultz, U., Kaspers, B., Staeheli, P., The interferon system of non-mammalian vertebrates, *Dev. Comp. Immunol.*, 28 (5): 499-508, **2004**.
- [16] Whitehead, K. A., Dahlman, J. E., Langer, R. S., Anderson, D. G., Silencing or Stimulation? SiRNA Delivery and the Immune System, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2; 77-96, **2011**.
- [17] Bueno, S.M.A., Legallais, C., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A., *J. Membr. Sci.*, 117, 45-56, **1996**.
- [18] Hage, D. S. (Editor), *Handbook of affinity chromatography*, 2nd ed., CRC Press, **2006**.
- [19] Hage, D. S., Affinity chromatography: a review of clinical applications, *Clinical chemistry*, 45(5), 593-615, **1999**.
- [20] Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X, Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 93-105, **2012**.
- [21] Gustavsson, P. E., Larsson, P. O., Support materials for affinity chromatography, *Handbook of affinity chromatography*, 15-33, **2006**.
- [22] Yoo, M. J., Hage, D. S., Affinity monolith chromatography: Principles and recent developments, *Monolithic Chromatography and Its Modern Applications*, Wang P, editor. St Albans: ILM, Chapter 1, **2010**.
- [23] Mallik, R., Xuan, H., Hage, D. S., Development of an affinity silica monolith containing α -1-acid glycoprotein for chiral separations. *Journal of Chromatography A*, 1149(2), 294-304, **2007**.

- [24] Spyropoulos, P., *Recent developments in affinity chromatography*, Literature (Msc Chemistry) thesis, Supervisor Dr.Wim.T.Kok, University of Amsterdam, The Netherlands, **2014**.
- [25] Magdeldin, S., Moser, A., *Affinity Chromatography: Principles and Applications*. In: Magdeldin S. (ed.), *Affinity Chromatography*, InTech Press, Rijeka, **2012**. (<http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography> (Temmuz, 2014)).
- [26] Wu, M., Wang, X., Zhang, Z., Wang, R., Isolation and purification of bioactive proteins from bovine colostrum, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Prof. Angelo Carpi (Ed.), ISBN: 978-953-307-268-5, 347-366, **2011**.
- [27] Hage, D. S., Survey of recent advances in analytical applications of immuno affinity chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 715(1), 3-28, **1998**.
- [28] Hage, D. S., Xuan, H., Nelson, M. A., Application and elution in affinity chromatography, *Handbook of Affinity Chromatography*, 2, 944, **2005**.
- [29] Kool, J., Giera, M., Irth, H., Niessen, W. M., Advances in mass spectrometry-based post-column bioaffinity profiling of mixtures, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399 (8), 2655- 2668, **2011**.
- [30] Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (Eds.), Guide to protein purification, *Methods in Enzimology*, 463, 1-820), San Diego, CA: Academic Press, **2009**.
- [31] Affinity Chromatography, <http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/liquid-chromatography-principles/affinity-chromatography>, (Temmuz, **2014**)
- [32] AP/IB Biology, <http://kirkpatrick.troyhigh.com/page2.html>, (Temmuz, **2014**).
- [33] Nature Archives Double Helix of DNA: 50 Years, <http://www.nature.com/nature/dna50/archive.html>, (Temmuz, **2014**).
- [34] Franklin, R., Gosling, R., Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate, *Nature*, 171 (4356): 740-1, **1953**.
- [35] DNA, <http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA> (Temmuz, **2014**) (Original X-ray diffraction image". Osulibrary.Oregonvstate.edu., 2011-02-06)

- [36] Wilkins, M.H.F., A.R. Stokes A.R., Wilson, H.R., Molecular Structure of Deoxyntose Nucleic Acids, *Nature*, 171 (4356): 738-740, **1953**.
- [37] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962, Nobelprize .org. (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/, Temmuz, **2014**).
- [38] Maddox, B., The double helix and the 'wronged heroine, *Nature*, 421 (6921), 407-408, **2003**.
- [39] Crick, F.H.C., On degenerate templates and the adaptor hypothesis, <http://genome.wellcome.ac.uk/assets/wtx030893.pdf>, Lecture, 1955, (Temmuz, **2014**).
- [40] Meselson, M., Stahl, F., The replication of DNA in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 44 (7), 671-82, **1958**.
- [41] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968, Nobelprize.org, (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1968/ ,Temmuz, **2014**).
- [42] Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles Of Biochemistry*, 4th Edition, Freeman, W. H. & Company, **2004**.
- [43] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemistry*, 5th Edition, WH Freeman and Company, 118-19, 781-808, **2002**.
- [44] Tinoco, I., Bustamante, C., How RNA folds, *J. Mol. Biol.* 293 (2): 271-281, **1999**.
- [45] Higgs, P.G., RNA secondary structure: physical and computational aspects, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 33 (3), 199-253, **2000**.
- [46] Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A., The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science* 289 (5481): 920-930, **2000**.
- [47] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., Ribonucleic acid purification, *Journal of Chromatography A*, doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.075, **2014**.
- [48] Kreiter, S., Diken, M., Selmi, A., Tureci, O., Sahin, U., Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy, *Curr. Opin. Immunol.*, 23 399-406, **2011**.
- [49] Tenson, T., Mankin, A., Antibiotics and the ribosome, *Mol. Microbiol.*, 59, 1664-1677, **2006**.

- [50] Van Raam, B.J., Salvesen, G.S., Transferring death: a role for tRNA in apoptosis regulation, *Mol. Cell*, 37, 591-592, **2010**.
- [51] Belostotsky, R., Frishberg, Y., Entelis, N., Human mitochondrial tRNA quality control in health and disease: a channelling mechanism? *RNA, Biol*, 9, 33-39, **2012**.
- [52] Matera, A.G., Terns, R.M., Terns, M.P., Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 209-220, **2007**.
- [53] Kiss, T., Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs, *EMBO J.*, 20, 3617-3622, **2001**.
- [54] Dias, N., Stein, C.A., Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms, *Mol. Cancer Ther.*, 1, 347-355, **2002**.
- [55] Brantl, S., Antisense-RNA regulation and RNA interference, *Biochim. Biophys. Acta*, 1575, 15-25, **2002**.
- [56] Kusenda, B., Mraz, M., Mayer, J., Pospisilova, S., MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 150, 205-215, **2006**.
- [57] Lin, S.L., Miller, J.D., Ying, S.Y., Intronic microRNA (miRNA), *J. Biomed. Bio-technol.*, 2006, 26818, **2006**.
- [58] Doench, J.G., Petersen, C.P., Sharp, P.A., siRNAs can function as miRNAs, *Genes Dev.*, 17, 438-442, **2003**.
- [59] Ghildiyal, M., Zamore, P.D., Small silencing RNAs: an expanding universe, *Nat. Rev. Genet.*, 10, 94-108, **2009**.
- [60] Phylactou, L.A., Kilpatrick, M.W., Wood, M.J., Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease, *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1649-1653, **1998**.
- [61] Tucker, B.J., Breaker, R.R., Riboswitches as versatile gene control elements, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 342-348, **2005**.
- [62] Wittmann, A., Suess, B., Engineered riboswitches: expanding researchers' tool-box with synthetic RNA regulators, *FEBS Lett.*, 586, 2076-2083, **2012**.
- [63] Blount, K.F., Breaker, R.R., Riboswitches as antibacterial drug targets, *Nat. Bio-technol.*, 24, 1558-1564, **2006**.
- [64] Mayer, G., The chemical biology of aptamers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48, 2672-2689, **2009**.

- [65] Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., Lupold, S.E., Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons, *Curr. Med. Chem.*, 18, 4206-4214, **2011**.
- [66] Lee, J.C., Gutell, R.R., Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs, *J. Mol. Biol.*, 344(5), 1225-1249, **2004**.
- [67] Barciszewski, J., Frederic, B., Clark, C. *RNA biochemistry and biotechnology*. Springer, 73-87, **1999**.
- [68] Sipahioğlu, H. M., Erkan, S., Gümüþ, M., Viroidlerde Çoğalma (Replikasyon), *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, (Eski adı: *OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*), 09 (2),13-24, **2011**.
- [69] Salazar, M., Fedoroff, O.Y., Miller, J.M., Ribeiro, N.S., Reid, B.R., The DNA strand in DNAoRNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution, *Biochemistry*, 32(16), 4207-4215, **1992**.
- [70] Hermann, T., Patel, D.J., RNA bulges as architectural and recognition motifs, *Structure*, 8 (3), R47-R54, **2000**.
- [71] Mikkola, S., Nurmi, K., Yousefi-Salakdeh, E., Strömberg, R., Lönnberg, H., The mechanism of the metal ion promoted cleavage of RNA phosphodiester bonds involves a general acid catalysis by the metal aquo ion on the departure of the leaving group, *Perkin Transactions*, 2 (8): 1619-26, **1999**.
- [72] Jankowski, J.A.Z., Polak, J.M., *Clinical gene analysis and manipulation: Tools, techniques and troubleshooting*, Cambridge University Press, 14, **1996**.
- [73] King, T.H., Liu, B., McCully, R.R., Fournier, M.J., Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center, *Molecular Cell*, 11 (2), 425-35, **2002**.
- [74] Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., Turner, D.H., Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(19), 7287-7292, **2004**.
- [75] Tan, Z.J., Chen, S.J., Salt dependence of nucleic acid hairpin stability, *Biophys. J.*, 95 (2), 738-752, **2008**.

- [76] Cooper, G.C., Hausman, R.E., *The Cell: A Molecular Approach* (3rd ed.), Sinauer, 261-76, 297, 339-44, **2004**.
- [77] Mattick, J.S., Gagen, M.J., The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms, *Mol. Biol. Evol.*, 18 (9), 1611-1630, **2001**.
- [78] Mattick, J.S., Noncoding RNAs: the architects of eukaryotic complexity, *EMBO Reports*, 2 (11), 986-991, **2001**.
- [79] Mattick, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms, *BioEssays, News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25 (10), 930-939, **2003**.
- [80] Mattick, J.S., The hidden genetic program of complex organisms, *Scientific American*, 291(4), 60-67, **2004**.
- [81] Wirta, W., *Mining the transcriptome-methods and applications*, School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, **2006**.
- [82] Rossi, J.J., Ribozyme diagnostics comes of age, *Chemistry & Biology*, 11(7), 894-895, **2004**.
- [83] Caspersson, T., Schultz, J., Pentose nucleotides in the cytoplasm of growing tissues, *Nature*, 143 (3623), 602-603, **1939**.
- [84] Ochoa, S., Enzymatic synthesis of ribonucleic acid, *Nobel Lecture*, **1959**.
- [85] Rich, A., Davies, D., A new two-stranded helical structure: Polyadenylic acid and polyuridylic acid, *Journal of the American Chemical Society*, 78, 3548-3549, **1956**.
- [86] Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., Zamir, A., Structure of a ribonucleic acid, *Science*, 147 (3664), 1462-1465, **1965**.
- [87] Siebert, S., Common sequence structure properties and stable regions in RNA secondary structures, *Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau*, 1, **2006**.
- [88] Szathmáry, E., The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world, *Trends Genet.*, 15 (6), 223-229, **1999**.

- [89] Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min, J. W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., Ysebaert, M., Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene, *Nature*, 260 (5551), 500-507, **1976**.
- [90] Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans, *Plant Cell*, 2(4), 279-289, **1990**.
- [91] Dafny-Yelin, M., Chung, S.M., Frankman, E.L., Tzfira, T., pSAT RNA interference vectors: a modular series for multiple gene down-regulation in plants, *Plant Physiol.*, 145 (4), 1272-1281, **2007**.
- [92] Ruvkun, G., Glimpses of a tiny RNA world, *Science*, 294 (5543), 797-799, **2001**.
- [93] Fichou, Y., Férec, C., The potential of oligonucleotides for therapeutic applications, *Trends in Biotechnology*, 24 (12), 563-570, **2006**.
- [94] Gjerde, D.T., Hoang, L., Hornby, D., *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [95] Chomczynski, P., Sacchi, N., The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nat. Protoc.*, 1, 581-585, **2006**.
- [96] Wen, J., Legendre, L.A., Bienvenue, J.M., Landers, J.P., Purification of nucleic acids in microfluidic devices, *Anal. Chem.*, 80, 6472-6479, **2008**.
- [97] Doudna, J.A., Preparation of homogeneous ribozyme RNA for crystallization, *Methods Mol. Biol.*, 74, 365-370, **1997**.
- [98] Hagen, F.S., Young, E.T., Preparative polyacrylamide gel electrophoresis of ribonucleic acid. Identification of multiple molecular species of bacteriophage T7 lysozyme messenger ribonucleic acid, *Biochemistry*, 13, 3394-3400, **1974**.
- [99] Pascolo, S., in: S. Bauer, G. Hartmann (Eds.), Toll-like receptors (TLRs) and innate immunity, *Springer*, Berlin, Heidelberg, 221-235, **2008**.

- [100] Baker, B.F., Lot, S.S., Condon, T.P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E.A., Sasmor, H.M., Bennett, C.F., 2'-O-(2-Methoxy) ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 272, 11994-12000, **1997**.
- [101] Nilsen, T.W., Selective precipitation of large RNAs, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2012, pdb.prot072322, **2012**.
- [102] Romanovskaya, A., Sarin, L.P., Bamford, D.H., Poranen, M.M., High-throughput purification of double-stranded RNA molecules using convective interaction media monolithic anion exchange columns, *J. Chromatogr. A*, 1278, 54-60, **2013**.
- [103] Poole, C.F., Poole, S.K., *Chromatography Today*, Elsevier, New York, **1991**.
- [104] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1979**.
- [105] Heftmann, H. (ed.), *Chromatography Part A: Fundamentals and Techniques*, 5th ed., Elsevier, Amsterdam, **1992**.
- [106] Ettre, L.S., Meyer, V.R., *Two symposia, when HPLC was young, LC-GC Magazine*, **2000**.
- [107] Horvath, C., *75 Years of Chromatography-A Historical Dialogue* (eds L.S. Ettre and A. Zlatkis), Elsevier, New York, Amsterdam, 704-714, **1979**.
- [108] Huber, C.G., Oefner, P.J., Bonn, G. K., Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly(styrene - divinylbenzene) particles, *Anal. Chem.*, 67, 578-585, **1995**.
- [109] Oefner, P.J., Bonn, G.K., High - resolution liquid chromatography of nucleic acids, *Am. Lab.*, 26, C 28, **1994**.
- [110] Oefner, P.J. Bonn, G.K., High - resolution liquid chromatography of nucleic acids. *Am. Lab.*, 26, C 28, **1994**.
- [111] McGinnis, A.C., Chen, B., Bartlett, M.G., Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 883-884, 76-94, **2012**.
- [112] Dickman, M.J., *Chromatography Today*, 22-26, **2011**.
<http://www.chromatographytoday.com> (Temmuz, 2014)

- [113] Chionh, Y.H., Ho, C.H., Pruksakorn, D., Babu, I. R., Ng, C.S., Hia, F., McBee, M.E., Su, D., Pang, Y.L., Gu, C., Dong, H., Prestwich, E.G., Shi, P.Y., Preiser, P.R., Alonso, S., Dedon, P.C., A multidimensional platform for the purification of non-coding RNA species, *Nucleic Acids Res.*, 41, e168, **2013**.
- [114] Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., Weissman, D., Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA, *Nucleic Acids Res.*, 39, e142, **2011**.
- [115] Lukavsky, P.J., Puglisi, J.D., Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides, *RNA*, 10, 889-893, **2004**.
- [116] Kim, I., McKenna, S.A., Puglisi, E.V., Puglisi, J.D., Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC), *RNA*, 13, 289-294, **2007**.
- [117] McKenna, S.A., Kim, I., Puglisi, E.V., Lindhout, D.A., Aitken, C.E., Marshall, R.A., Puglisi, J.D., Purification and characterization of transcribed RNAs using gel filtration chromatography, *Nat. Protoc.*, 2, 3270-3277, **2007**.
- [118] Noll, B., Seiffert, S., Hertel, F., Debelak, H., Hadwiger, P., Vornlocher, H.-P., Roehl, I., Purification of small interfering RNA using non denaturing anion-exchange chromatography, *Nucleic Acid Therapeutics*, 21, 383-393, **2011**.
- [119] Koubek, J., Lin, K.F., Chen, Y.R., Cheng, R.P., Huang, J.J., Strong anion-exchange fast performance liquid chromatography as a versatile tool for preparation and purification of RNA produced by in vitro transcription, *RNA*, 19, 1449-1459, **2013**.
- [120] Easton, L.E., Shibata, Y., Lukavsky, P.J., Rapid, non-denaturing RNA purification using weak anion-exchange fast performance liquid chromatography, *RNA*, 16, 647-653, **2010**.
- [121] Thayer, J.R., Flook, K.J., Woodruff, A., Rao, S., Pohl, C.A., New monolith technology for automated anion-exchange purification of nucleic acids, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 878, 933-941, **2010**.

- [122] Ruby, S.W., Goelz, S.E., Hostomsky, Z., Abelson, J.N., Affinity chromatography with biotinylated RNAs, *Methods Enzymol.*, 181, 97-121, **1990**.
- [123] Srisawat, C., Engelke, D.R., RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleo protein complexes, *Methods*, 26, 156-161, **2002**.
- [124] Srisawat, C., Goldstein, I.J., Engelke, D.R., Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures, *Nucleic Acids Res.*, 29, E4, **2001**.
- [125] Kieft, J.S., Batey, R.T., A general method for rapid and non denaturing purification of RNAs, *RNA*, 10, 988-995, **2004**.
- [126] Batey, R.T., Kieft, J.S., Improved native affinity purification of RNA, *RNA*, 13, 1384-1389, **2007**.
- [127] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., A new affinity approach to isolate *Escherichia coli* 6S RNA with histidine-chromatography, *J. Mol. Recognit.*, 23, 519-524, **2010**.
- [128] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., Histidine affinity chromatography-based methodology for the simultaneous isolation of *Escherichia coli* small and ribosomal RNA, *Biomed. Chromatogr.*, 26, 781-788, **2012**.
- [129] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications, *J. Sep. Sci.*, 30, 1657-1671, **2007**.
- [130] Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 807, 129-137, **2004**.
- [131] Dainiak, M.B., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Cell chromatography. Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns, *Biotechnol. Prog.*, 21, 644-649, **2005**.
- [132] Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel, *J. Immunol. Methods*, 283, 185-194, **2003**.

- [133] Plieva, F.M., Oknianska, A., Degerman, E., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Novel supermacroporous dextran gels, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17, 1075-1092, **2006**.
- [134] Plieva, F.M., Ekstrom, P., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Elastic monolithic gels with open porous structure and unique double-continuous macroporous networks, *Soft Matter*, 4, 2418-2428, **2008**.
- [135] Savina, I.N., Cnudde, V., D'Hollander, S., Hoorebeke, L.V., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., Prez, F.D., Cryogels from poly(2-hydroxyethyl methacrylate): macroporous, interconnected materials with potential as cell scaffolds, *Soft Matter*, 3, 1176-1184, **2007**.
- [136] Le Noir, M., Plieva, F.M., Hey, T., Guieysse, B., Mattiasson, B., Macroporous molecularly imprinted polymer/ cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants, *J. Chromatogr. A*, 1154, 158-164, **2007**.
- [137] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 227-242, **1998**.
- [138] Galaev, I. Y., Dainiak, M.B., Plieva, F.M., Mattiasson, B., Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel, *Langmuir*, 23, 35-40, **2007**.
- [139] Plieva, F.M., Seta, E.D., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: processing under compression and scale-up, *Separ. Purif. Tech*, 65, 110-116, **2009**.
- [140] Plieva, F.M., Galaev, I. Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Cryogel applications in microbiology, *Trends in Microbiology*, 16, 543-551, **2008**.
- [141] Mattiasson, B., Kumar, A., Galaev, I.Y. (ed)., *Macroporous Polymers. Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, CRC Press, **2009**.
- [142] Cui, Zh. (editor), *Medical Biotechnology and Health Care*, 2nd ed, Elsevier, 5, **2011**.
- [143] Lozinsky V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application, *Russ. Chem. Rev.*, 71,489-511, **2002**.

- [144] Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol*, 21, 445-451, **2003**.
- [145] Dainiak, M., Savina, I.N., Musolino, I., Kumar, A., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., Biomimetic macroporous hydrogel scaffolds in a high-throughput screening format for cell-based assays, *Biotechnol Prog*, 24,1373-1383, **2008**.
- [146] Seal, B.L., Ortero, T.C., Panitch, A., Polymeric Biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater Sci Eng R*, 34,147-230, **2001**.
- [147] Svec, F., Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *J Chromatogr A*, 1217, 902-924, **2010**.
- [148] Autissier, A., Visage, C.L., Pouzet, C., Chaubet, F., Letourneur, D., Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process, *Acta Biomater*, 6, 3640-3648, **2010**.
- [149] Savina, I.N., Gun'ko, V.M., Turov, V.V., Dainiak, M., Galaev, I.Y., Phillips, G.J., Mikhalovsky, S.V., Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels, *Soft Matter*, 7, 4276-4283, **2011**.
- [150] Gun'ko, V.M., Mikhalovska, L.I., Savina, I.N., Shevchenko, R.V., James, S.L., Tomlins, P.E., Mikhalovsky, S.V., Characterisation and performance of hydrogel tissue scaffolds, *Soft Matter*, 6, 5351-5358, **2010**.
- [151] Sandeman, S.R., Gun'ko, V.M., Bakalinska, O.M., Howell, C.A., Zheng, Y., Kartel, M.T., Phillips, G.J., Mikhalovsky, S.V., Adsorption of anionic and cationic dyes by activated carbons, PVA hydrogels and PVA/AC composite, *J Colloid Interface Sci*, 358, 582-592, **2011**.
- [152] Zheng, Y., Gun'ko, V.M., Howell, C.A., Sandeman, S.R., Phillips, G.J., Kozynchenko, O.P., Tennison, S.R., Ivanov, A.E., Mikhalovsky, S.V., Composites with macroporous poly(vinyl alcohol) cryogels with attached activated carbon microparticles with controlled accessibility of a surface, *ACS Appl Mater Interfaces*, 4(11), 5936-5944, **2012**.
- [153] Hür, D., Ekti, S.F., Say, R., N-acylbenzotriazole mediated synthesis of some methacrylamido amino acids, *Letters in Organic Chemistry*, 4, 585-587., **2007**.

- [154] Denizli, A., Pişkin, E., DNA immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for affinity sorption of human IgG and anti-DNA antibodies, *J. Chromatography B*, 666, 215-222, **1995**.
- [155] Ünlüer, Ö. B., Ersöz, A., Denizli, A., Demirel, R., Say, R., Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel, *Journal of Chromatography B*, 934, 46-52, **2013**.
- [156] Bereli, N., Türkmen, D., Köse, K., Denizli, A., Glutamic acid containing supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel disks for UO_2^{2+} removal, *Materials Science and Engineering C*, 32, 2052-2059, **2012**.
- [157] Tekin, K., Uzun, L., Sahin, Ç. A., Bektas, S., Denizli, A., Preparation and characterization of composite cryogels containing imidazole group and use in heavy metal removal, *Reactive & Functional Polymers*, 71, 985-993, **2011**.
- [158] Craig, N.L., Cohen-Fix, O., Green, R., Greider, C. W., Storz, G., Wolberger, C., *Molecular Biology, Principles of Genome Function*, Chapter 2, Oxford University Press, First Edition, **2010**.
- [159] Sasaki, K., Adachi, S., Yamamoto, T., Murakami, T., Tanaka, K., Takahashi, M., Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA, *Cytometry*, 9, 93-96, **1988**.
- [160] Meral, M., Bozdayı, G., Özkan, S., Dalgıç, B., Alp, G., Ahmed, K., Akut Gastroenteritli çocuklarda Rotavirus, prevalansı, serotip ve elektroferotip dağılımı, *Mikrobiyol Bul*, 45, 104-112, **2011**.
- [161] Cury, J. A., Koo, H., Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* Biofilms, *Analytical Biochemistry*, 365, 208-214, 2007.
- [162] Pereira, P., Sousa, Â., Queiroz, J., Correia, I., Figueiras, A., Sousa, F., Purification of pre-miR-29 by arginine-affinity chromatography, *Journal of Chromatography B*, 951-952, 16-23, **2014**.
- [163] Sciascia et al. (2011)
- [164] Nunes, J.C., Pessoa de Amorim, M.T., Escobar, I.C., Queiroz, J.A., Morão, A.M., Plasmid DNA/RNA separation by ultrafiltration: Modeling and application study, *Journal of Membrane Science*, 463, 1-10, **2014**.

- [165] Lin, C.Y., Huang, Z., Jaremko, W., Niu, L., High-performance liquid chromatography purification of chemically modified RNA aptamers, *Analytical Biochemistry*, 449, 106-108, **2014**.
- [166] Stark, L., Giersch, T., Wünschiers, R., Efficiency of RNA extraction from selected bacteria in the context of biogas production and metatranscriptomics, *Anaerobe*, 29, 85-90, **2014**.
- [167] Edelmann, F.T., Niedner, A., Niessing, D., Production of pure and functional RNA for in vitro reconstitution experiments, *Methods*, 65, 333-341, **2014**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Kazım KÖSE
Doğum Yeri : Afyonkarahisar
Medeni Hali : Bekâr
Doğum Tarihi : 01.12.1980
E-Posta : kazimkose@hitit.edu.tr
Adresi : Hitit Üniversitesi, Rektörlük, HUBTUAM, Çorum-Türkiye

Eğitim

Lise : 1994-1997 Sultandağı Lisesi, Afyonkarahisar
Lisans : 1997-2008 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya
Öğretmenliği Bölümü, Ankara
Yüksek Lisans : 2009-2011 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Beytepe-
Ankara.
Doktora : 2011-2014 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Beytepe-
Ankara

Yabancı Dil Düzeyi : İngilizce, İleri Düzey

İş Deneyimi :-

Deneyim Alanları :-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi :-

Tezden Üretilmiş Yayınlar :-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:-