

Alkalin Fosfataz Benzeri Peptit Nanokatalizörler

Proje No: 112T602

Proje Yürütücüsü
Doç.Dr. Mustafa Özgür Güler

Araştırmacı(lar): Ayşe Begüm Tekinay, Emine Deniz Tekin

Danışman(lar):

Bursiyer(ler): Zeliha Soran, Gülcihan Gülseren, Meryem Hatip

ÖNSÖZ

Bilinen enzimlerin yarısını teşkil eden metaloenzimler biyolojik sistemlerde oksidasyon fotosentez, solunum ve azot fiksasyonu vb. gibi kritik mekanizmaları kontrol etmektedir. Bu karmaşık ve stabilizasyonu zor olan proteinler taklit edilerek basit ve kararlı yapılar geliştirmek, biyolojik uygulamalar açısından önemli bir araştırma konusudur. Günümüzde enzimlerin katalitik mekanizmaları ve aktif kısımları kristal yapı analizi gibi tekniklerle öğrenilmektedir. Bu yöntemlerle enzimlerin katalizde aktif olan amino asitlerinin çeşit ve konumları ya da metal etkileşimleri gibi karakteristik özellikleri tespit edilmektedir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda tasarlanan yapay enzim modelleri kararlılık, zaman ve maliyet gibi açılardan önemli ölçüde avantaj sağlayabilecek gelecek vadeden araştırma konularından biridir. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada katalitik yapısı önemli ölçüde bilinen ve hücrelerde kalsiyum fosfat birikimini sağlayarak kemik oluşumunda etkili olan alkalın fosfataz (ALP) enzimi model olarak alınmıştır. Bu projede, kemik oluşumunda önemli rol oynayan alkalın fosfataz enzimi sentetik pepit nanofiberler ile taklit edilmiş ve biyomineralizasyon uygulamaları için kullanılmıştır. Bu amaçla enzimatik aktivitede rol oynayan imidazol grupları, peptit amfifil (PA) nanoyapılar üzerinde değişik pozisyonlarda konumlandırılarak ALP taklidi nanosistemler oluşturulmuştur. PA molekülleri kullanarak oluşturulan nanofiberlerin yüksek yüzey alanı özelliğinden yararlanarak küçük bir alanda çoklu aktif kısım oluşturulması sağlanmıştır. Organik sisteme tamamlayıcı olarak çinko eklenmesi ile katalitik model geliştirilmiş ve organik fosfat, inorganik fosfata çevrilmiş ve kalsiyum fosfat nodüllerinin oluşumu gösterilmiştir. Böylelikle alkalın fosfatazın iki ana görevi olan kataliz ve mineralizasyon yüzeyi oluşumunu regüle etme, burada geliştirilen kompleks supramoleküler nanosistem kullanarak taklit edilmiştir. Bulgularımız sadece kimyasal uygulamalarla kalmayıp, in vitro çalışmalarla, kök hücre kullanarak kemik oluşumu üzerindeki etkisi biyolojik uygulamalar ile de gösterilmiştir. Kısaca bu çalışmada enzim taklidi peptit nanofiberler katalitik ve iskelet özelliği göstererek kemik benzeri yapı oluşumunu hızlandırmıştır. Bu proje kapsamında yapılan bütün çalışmalar TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
2.1. Peptit Amfifil Moleküllerinin Sentezi.....	9
2.2. Sentezlenen PA Moleküllerinin Saflaştırılması (LC/MS).....	10
2.3. PA Nanofiberlerin Sekonder Yapılarının Dairesel Dikroizm (CD) Saptanması.....	10
2.4. İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (ITC) ile Metal Bağlanma Analizi	10
2.5. p-nitrofenil asetat Hidroliz Deneyi.....	10
2.6. CaP Mineralizasyon	10
2.7. Raman Spektrometresi.....	10
2.8. Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-Işını Analizi (SEM/EDX):.....	11
2.9. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	11
2.10. X-Işını Saçılım Spektroskopisi (XRD).....	11
2.11. p-nitrofenil fosfat Hidroliz Deneyi.....	11
2.12. Yüzey Hidrolizi	11
2.13. Hücre Kültürü Çalışmaları	11
2.14. Hücrelerin Canlılık Testi	12
2.15. İstatistiksel Analiz	12
2.16. Alizarin Kırmızısı Boyaması.....	12
2.17. KRT-PZR Gen İfade Analizi.....	12
3. BULGULAR.....	14
3.1 Peptit Amfifil Moleküllerinin Sentez ve Karakterizasyonu	14
3.2. İzotermal Kalorimetre ile Metal Bağlanması Saptanması.....	17
3.3. Geçirimli Elektron Mikroskopu Nanofiber Görüntüleri.....	18
3.4. Enzim Kinetiği Hesaplaması (p-nitrofenil asetat süstratı ile)	18
3.5. CaP Mineralizasyonu ve Mineral Analizi (RAMAN, SEM, XRD).....	21
3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-Işını Analizi (SEM/EDX).....	28
3.7. Enzim Kinetiği Hesaplaması (p-nitrofenil fosfat süstratı ile)	29
3.8. Peptit Yüzeyler Üzerinde Hidroliz Analizi	32
3.9. Peptit Yüzeyler Üzerinde SaOS-2 Hücrelerinin Canlılık Analizi	33

3.10. SaOS-2 Alizarin Kırmızı Boyaması Görüntüleme ve Biriken Kalsiyum Miktarının Saptanması	33
3.11. SaOS-2 Kemiğe Özgü Gen Expresyon Analizleri.....	36
3.12. Peptit Yüzeyler Üzerinde rMKH ların Canlılık Analizi	37
3.13. rMKH Alizarin Kırmızı Boyaması Görüntüleme ve Biriken Kalsiyum Miktarının Saptanması	39
3.14. rMKH Kemiğe Özgü Gen İfade Miktarı Analizleri	42
3.15. Kemik Spesifik DMP1 Protein Sentezinin Takibi	46
3.16. Moleküler Hesaplamalar	47
4. SONUÇ	53
5. KAYNAKÇA.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Çinko içeren metaloenzimlerin katalitik gruplarındaki amino asitlere göre sınıflandırılması.....	6
Tablo 2 SAOS 2 primer sekansları Kol I: Kollajen I, Runx2: Runx2.....	13
Tablo 3 rMKHZ primer sekansları Kol I: Kollajen I, OP: Osteopontin.....	14
Tablo 4 Çinkonun peptit amfifillere bağlanma sabiti ve bağlanma oranları.....	17
Tablo 5 p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.....	21
Tablo 6 p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.....	32
Tablo 7 Moleküler Enerji Değerleri.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Peptit yapısı.....	4
Şekil 2 Çinko içeren metaloenzimlerin peptidazik aktivitesi.....	5
Şekil 3 Çinko içeren metaloenzimlerin nükleazik aktivitesi.....	5
Şekil 4 Çinko içeren metaloenzimlerdeki çinko iyonunun oluşturduğu kompleks.....	6
Şekil 5 Metaloenzimin katalitik bölgesinde bulunan su ile koordine olmuş çinko iyonunun gerçekleştirdiği olası mekanizmalar	7
Şekil 6 Alkalın fosfataz enziminin temel mekanistik basamakları.....	8
Şekil 7 Metal ve ligand arasındaki etkileşimi gösteren şema. Siyah olan birincil bağlanma katmanını, gri olan ise ikincil bağlanma katmanını göstermektedir.....	8

Şekil 8 Programlanabilir peptit moleküllerinden oluşan nanoyapılar.....	9
Şekil 9 Kullanılan peptit amfifil moleküllerinin kimyasal yapısı. Üst: Lauryl-VVAGK(H-Ac)H-Am (1) ve Alt: Lauryl-VVA.....	14
Şekil 10 1 nolu peptit amfifilin 220 nm'deki sıvı kromatogramı.GHH-Am (2)	15
Şekil 11 1 nolu peptit amfifilin kütle spektrumu	15
Şekil 12 2 nolu peptit amfifile ait sıvı kromatogramı	15
Şekil 13 2 nolu peptit amfifile ait kütle spektrumu.....	16
Şekil 14 1 nolu peptit amfifil molekülünün Zn ^{II} titrasyonu ile ikincil yapısındaki değişiklikler.	16
Şekil 15 2 nolu peptit amfifil molekülünün Zn ^{II} titrasyonu ile ikincil yapısındaki değişiklikler.	16
Şekil 16 1 nolu peptit amfifilin ZnCl ₂ ile izotermal titrasyon eğrisi.....	17
Şekil 17 2 nolu peptit amfifilerin geçirimli electron mikroskobu ile çekilen mikrografları	18
Şekil 18 1 nolu peptit amfifil varlığında p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.	19
Şekil 19 1 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği	19
Şekil 20 2 nolu peptit amfifil varlığında p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.	19
Şekil 21 2 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği... ..	20
Şekil 22 p-nitrofenil asetatın, Zn ^{II} iyonu varlığında hidroliz kinetiği.	20
Şekil 23 p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.	21
Şekil 24 1 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin Optik (20X) ve Konfokal Raman görüntüleri.....	22
Şekil 25 1 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin Raman spektrumları.....	22
Şekil 26 2 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin Optik (20X) ve Konfokal Raman görüntüleri.....	23
Şekil 27 2 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin Raman spektrumları.....	23
Şekil 28 Cam yüzeylerde 1. gün sonucu oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntüleri.	24
Şekil 29 1 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin elektron kırınımı spektrumu.....	24
Şekil 30 1 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristalinin elemental haritalaması.	25
Şekil 31 Kaplanmış cam yüzeylerde 3. gün sonucu oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntüleri	25
Şekil 32 2 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin elektron kırınımı spektrumu.....	26
Şekil 33 Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeyin 3. gün sonucundaki taramalı elektron mikroskobu görüntüsü ve elektron kırınımı spektrumu	26

Şekil 34 1 nolu peptit ve 1 nolu ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 1. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.....	27
Şekil 35 2 nolu peptit ve 2 nolu ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 1. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.....	27
Şekil 36 1 nolu peptit ve 1 nolu ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 3. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.....	27
Şekil 37 2 nolu peptit ve 2 nolu ve Zn ^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 3. gün sonundaki X-ışını kırınım motif i.....	28
Şekil 38 1 ve 2 nolu peptit amfifiler üzerindeki CaP birikiminin geçirimli electron mikroskobu ile çekilen mikrografları ve CaP nodüllerinin EDX ile elemental analizi.	29
Şekil 39 1 nolu peptit amfifil varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.	30
Şekil 40 1 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.....	30
Şekil 41 2 nolu peptit amfifil varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.	31
Şekil 42 2 nolu peptit amfifil ve Zn ^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil asetatin hidroliz kinetiği.	31
Şekil 43 p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği	32
Şekil 44 p-nitrofenil fosfatın peptit kaplı yüzeyler üzerinde zamana bağlı hidrolizi.	33
Şekil 45 Peptit amfifiller üzerindeki hücrelerin canlılık analizi.	33
Şekil 46 3. Gün Alkalın Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde Alizarin kırmızı boyaması ve Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak kalitatif analizi	34
Şekil 47 3. Gün Kontrol Grubu E-PA ve K-PA peptitler üzerinde a. Osteojenik besi yeri varlığında ve sadece β-gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyaması..	35
Şekil 48 6.Gün Alkalın Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde Alizarin kırmızı boyaması ve Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak kalitatif analizi	35
Şekil 49 6.Gün Kontrol Grubu E-PA ve K-PA peptitler üzerinde da Alizarin kırmızı boyaması.....	36
Şekil 50 3.ve 6. günlerde osteojenik destek olmadan peptit üzerinde kemiğe özgü genlerin ifade analizleri.	37
Şekil 51 Çinko varlığında ve yokluğunda PA nanofiberleri üzerinde 24 saat (alt) ve 48 saat (üst) Alamar mavisi hücre canlılık deneyi.....	38
Şekil 52 Çinko varlığında ve yokluğunda PA molekülleri üzerinde 24 saat (üstte) ve 48 saat (altta) Calcein Ethidium Bromür boyaması ile ölü ve canlı hücrelerin görsel analizi.	39
Şekil 53 Alkalın Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde sadece β-gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak üçüncü gün kalitatif analizi.....	40
Şekil 54 25 µM Zn ile desteklenmiş Alkalın Fosfataz benzeri peptitler üzerinde sadece β-gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak yedinci ve on ikinci gün kalitatif analizi.....	41

Şekil 55 Alkalın Fosfataz benzeri peptitler üzerinde sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamasının kalitatif mikroskop analizleri.	42
Şekil 56 Alkalın Fosfataz benzeri yapılar üzerinde osteojenik destek varlığında ve yokluğunda 7. ve 12. günler kemiğe özel gen ifadesinin kalitatif analizi.	44
Şekil 57 25 μ M Zn ile desteklenmiş Alkalın Fosfataz benzeri yapılar üzerinde osteojenik destek varlığında ve yokluğunda 7. ve 12. günler kemiğe özel gen ifadesinin kalitatif analizi	45
Şekil 58 7. günde alkalın fosfataz taklidi peptitler üzerinde immunositokimya yöntemi ile hücreler üzerinde DMP-1 ekspresyonunun gösterilmesi.....	46
Şekil 59 PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi	47
Şekil 60 Zn bağlanmış PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi	47
Şekil 61 Zn bağlanmış iki PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi.....	48
Şekil 62 3-boyutlu HOMO ve LUMO çizimleri	49
Şekil 63 HOMO-LUMO ve Moleküler Elektrostatik Potansiyel Haritaları	51
Şekil 64 HOMO-LUMO ve Moleküler Elektrostatik Potansiyel Haritaları	52

ÖZET

Enzimler, reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini düşürmeleri sebebiyle yaşam bilimlerinde önemli bir yere sahiptir. Bu özellikleri sayesinde reaksiyonların hızı milyonlarca ya da milyarlarca kat artabilmektedir. Reaksiyon hızını arttırmalarının yanı sıra, seçici reaksiyon gerçekleştirme özelliğine de sahiptirlerdir. Böylece sentez sonrası ürünlerin ayrılması gibi fazladan işlemlere gerek kalmadan daha az maliyetli reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir.

Günümüzde bilinen enzimlerin yaklaşık üçte birini metallerle koordine olan enzimler oluşturmaktadır. Bu tip enzimler, solunum, fotosentez, azot fikslenmesi, hidroliz kimyası gibi biyolojik sistemlerde hayati önem taşıyan mekanizmaların gerçekleşmesinde görev almaktadır. Metal iyonları, bir ya da daha fazla parçayla koordine olarak yapısal, katalitik ve elektron transferi gibi görevleri üstlenmektedir.

Alkalin fosfataz (ALP) enzimi, nükleotitler ve alkaloidler gibi moleküllerdeki fosfat grubunun hidrolizinde görev alan bir enzimdir. Bu enzimin çinko varlığında aktivitesinin arttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bu enzim, aynı zamanda biyomineralizasyon için gerekli olan fosfat üretimine yardımcı olduğundan kemik dokuda yer alan hidroksiapatit üretimini hızlandırır.

Bu projede, ALP aktivitesini taklit edebilen peptit nanofiber sistemleri geliştirilmiştir. Kendiliğinden düzenlenerek nonkovalent etkileşimler sayesinde multivalent aktif yüzey oluşturan peptit molekülleri, ALP'nin aktif bölgesindeki benzer şekilde çinkoya bağlanan amino asitler ile aktifleştirilerek hidroksiapatit üretilmesini sağlamıştır.

Peptit nanosistemlerinin kararlılığı, hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlardan oluşmasından ileri gelmektedir. Hidrofobik kısma eklenen, beta yaprak oluşturma özelliğine sahip amino asitler sayesinde üç boyutlu bir yapı oluşturulabilmektedir. Bu özelliğe sahip amino asit dizininden sonra da, istenilen fonksiyona sahip amino asitler eklenebilmektedir. Bu projede, aynı stratejiyi kullanarak farklı yapısal özellikteki peptit moleküllerinin sentezlenmesi ve bu yapısal özelliklerin katalitik aktiviteye etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle, yapay enzim yapımına, nanosistemlerle çözüm adımları ileri vadede sağlanacaktır. Sentezlenen yeni peptit nano yapıların katalitik aktivitelerinin, canlı organizmalar üzerindeki etkisi de hücre üzerinde yapılacak *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir. Ayrıca, sentezlenen yeni peptitler ve bu peptitlerin metal iyonlarıyla koordinasyonu sonucu oluşan üç boyutlu yapıların modellenmeleri de desteklenmiştir. Bu tür teorik çalışmalar, sonraki supramoleküler yapıların tasarımında örnek teşkil edecektir.

Anahtar Kelimeler: Nanoteknoloji, Supramoleküler Kimya, Peptit, Biyomalzemeler, Hücre-Malzeme Etkileşimleri

ABSTRACT

Enzymes are the proteins that catalyze and decrease the required activation energy for the chemical reactions. For this reason, they are highly significant in life sciences. This unique property of enzymes make the reactions millions times faster than the ones which don't include enzymes. Beside increasing reaction rate, enzymes can also perform specific reactions. In this way, low cost reactions can be performed without the need for separation of side products after synthesis.

Metalloenzymes constitute approximately one third of the common enzymes known in literature. This type of enzymes take important roles in the biological mechanisms such as respiration, photosynthesis, nitrogen fixation and hydrolysis. Metal ions provide structural, catalytic and electron transfer like properties through coordination with one or more structural groups.

Alkaline phosphatase is an enzyme which takes role in hydrolysis of phosphate groups from nucleotides and alkaloid-like molecules. It has previously reported that existence of zinc ion increase the activation of alkaline phosphatase enzyme. At the same time, this enzyme accelerates the production of hydroxyapatite crystals which are found in bone tissues by providing the inorganic phosphate source required for biomineralization.

In this project, alkaline phosphatase enzyme mimicking peptide nanofibers were developed. These peptide nanofibers present multivalent active surfaces through self-assembly process which is triggered by non-covalent interactions. Using amino acids which can coordinate with zinc ions as in natural alkaline phosphatase enzyme is thought to accelerate production of hydroxyapatite and lead differentiation of osteogenic cells through mineralization.

The stability of peptide nanosystems depends on their both hydrophilic and hydrophobic characters. They can form 3-D structures due to the β -sheet forming amino acids near the hydrophobic tail. After these amino acids, different amino acids can be added according to the desired functions. In this project, peptide amphiphile molecules with catalytic activity will be designed and synthesized. In this way, peptide amphiphile nanostructures can be used as artificial enzymes. In addition, the catalytic activity of these novel peptide amphiphiles will be studied on biological organisms by performing *in vitro* cell culture experiments. Theoretical simulations will be utilized for synthesized peptide nanostructures and nanosystems with zinc ions. These types of theoretical studies will guide the design of future supramolecular catalytic nanostructures.

Keywords: Nanotechnology, Supramolecular Chemistry, Peptides, Biomaterials, Cell-Materials Interactions

1. GİRİŞ

Doğada yüzyıllardır var olan sistemleri taklit ederek ya da onlardan ilham alarak yeni sistemler geliştirmek mümkündür. Ancak bunun için doğal olarak var olan sistemlerdeki karmaşık mekanizmaların daha yakından incelenmesi, mekanistik basamakların çözümlenmesi ve bu sistemlerde bulunan her bir parçanın görevinin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu nedenle, doğayı taklit ederek geliştirilen yeni sistemler, var olan karmaşık yapıyı daha yakından anlamamızı sağlayacak, dolayısıyla doğanın yüzyıllar boyunca geliştirdiği sistemleri kendi avantajımız doğrultusunda kullanmamıza yardım edecektir.

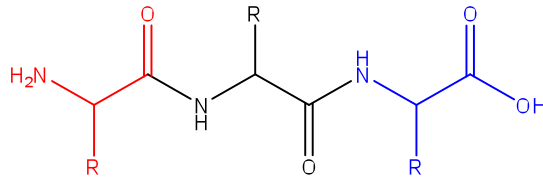
Enzimler de doğadaki en zor reaksiyonları en verimli reaksiyon hızına çıkarmaları ve özel tanımlama mekanizmalarıyla önemli katalitik sistemlerdir. Günümüzde bilinen enzimlerin yaklaşık üçte birini metallerle koordine olan enzimler oluşturmaktadır. Bu tip enzimler, solunum, fotosentez, azot fikslenmesi, hidroliz kimyası gibi biyolojik sistemlerde hayati önem taşıyan mekanizmaların gerçekleşmesinde görev almaktadır. Metal iyonları, bir ya da daha fazla parçayla koordine olarak yapısal, katalitik ve elektron transferi gibi görevleri üstlenmektedir. Yeni enzimatik sistemlerin dizaynında, var olan bir proteine metal iyonları eklenerek katalitik aktivitesinin artırılması yöntemi kullanılabilir. Bunun dışında en çok kullanılan yöntem, *de novo* protein dizaynidir. *De novo* protein dizaynı, metal iyonları ile koordine olabilen, alfa sarmalı ya da beta düzlemi gibi üç boyutlu şekillerde katlanarak özgenil ile uygun koordinatlarda bağlanabilen yeni bir peptit dizininin tasarımı anlamına gelmektedir. Bu noktada önemli olan iki unsur: sistemin konformasyonel kararlılığı ve katalitik aktivitedir. Bu oldukça zor bir yöntem gibi görünse de, doğada kullanılan sistemlerin esin kaynağı olarak kullanılması bu dizaynı daha kolay hale getirmektedir.

Daha önceki çalışmalarımızda konformasyonel kararlılığı bilinen, katalitik olarak da aktif hale getirilmiş bir peptit nanosistemi sayesinde enzim benzeri katalitik aktivite gösterilmiştir (Guler, 2007) Buradaki peptit molekülleri, serin proteazların katalitik olarak aktif kısmında bulunduğu bilinen serin, aspartik asit ve histidinden oluşan “katalitik triat” sisteminden esinlenilerek histidin amino asiti eklenerek asetil kolin esteraz enzimi gibi asetil esterlerini hidroliz etmiştir.

Alkalin fosfataz enzimi, nükleotitler ve alkaloidler gibi moleküllerdeki fosfat grubunun hidrolizinde görev alan bir enzimdir. Bu enzimin çinko varlığında aktivitesinin arttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bu enzim, aynı zamanda biyomineralizasyon için gerekli olan fosfat üretimine yardımcı olduğundan kemik dokuda yer alan hidroksiapatit üretimini hızlandırır.

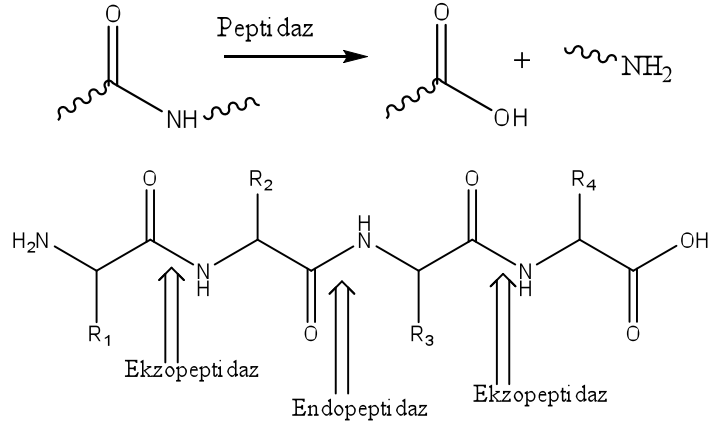
Çinko, pek çok yaşam formunda bulunan önemli bir metaldir (Vallee, 1984; Lipscomb, 1996; Coleman, 1992). Özellikle gelişim ve büyümede, sıtma, zatürre gibi salgın hastalıklara karşı korunma ve bu hastalıkların tedavisinde (Hambidge, 1999) soğuk algınlığı tedavisinin hızlanmasında (Eby, 1997) önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Çinko metalinin sahip olduğu bu önemli etki, onun enzim aktivitesinde sahip olduğu önemli görevden ileri gelmektedir. Günümüzde bilinen yaklaşık 300 adet çinko içeren metaloenzim vardır (Vallee, 1992). Çinkonun, diğer metallerle karşılaştırıldığında, enzimlerde yaygın olarak kullanılmasının pek çok nedeni vardır. Öncelikle çinko iyonu azot, oksijen, kükürt gibi metabolizmamızda yaygın olarak bulunan atomlarla güçlü bir şekilde etkileşime girebilmektedir. Bu da onu proteinlere bağlanabilir hale getirmektedir. Ayrıca, Zn (II) iyonu yükseltgenme ve indirgenmelere karşı dirençlidir. Bu nedenle reaksiyonlarda değişmeden kalabilmektedir. Dahası çinko iyonu tetrahedral koordinasyonu seçtiği için kendi Lewis asidite özelliğinin yanında suyun da Brønsted asit aktivitesini güçlendirmektedir.

Çinko içeren metaloenzimlerin, metabolizmamızdaki en önemli görevini peptidazik ve amidazik aktiviteler oluşturur. Peptidaz enzimleri ikiye ayrılır; endopeptidazlar, peptit zincirinin ortasındaki peptitler arasındaki bağı kıran enzimler, ve ekzopeptidazlar, peptit zinciri sonundaki amino aside ait peptit bağına kıran enzimlerdir. Ekzopeptidazlar, peptitin N- uçlu amino asidini ya da C- uçlu amino asidini kırabilir. Şekil 1'de amino asitler gösterilmiştir. Amid bağına kıran enzimler, β -laktamlardaki amid bağına hidrolizinde ve matriks proteinazları olarak hücreler arası ortama ait bileşenlerin yıkımında görev alırlar.

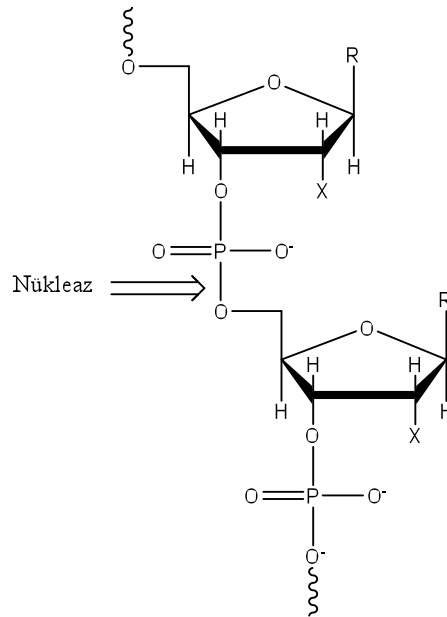


Şekil 1. Kırmızı ile gösterilen N uçlu amino asiti, mavi ile gösterilen C uçlu amino asidi oluşturmaktadır.

Çinko içeren metaloenzimlerin bir diğer önemli rolü ise fosfoester bağına kırılmasıdır. Fosfoester bağları, genetik bilgiyi aktaran deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) moleküllerinde bulunduğu için ayrı bir önem taşımaktadır. Çinko, amidaz, peptidaz ve fosfatazlar da görev almasının yanında, karbondioksitin hidrasyonunda görev alan karbonik anhidrazın, alkollerin oksidasyonunda görev alan alkol dehidrogenazların da katalitik bölgelerinde bulunmaktadır. (Şekil 2 ve 3)



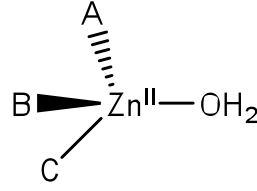
Şekil 2. Çinko içeren metaloenzimlerin peptidazik aktivitesi (Simonson, 2002).



Şekil 3. Çinko içeren metaloenzimlerin nükleazik aktivitesi (Simonson, 2002).

Çinko içeren metaloenzimlerde en sık rastlanan katalitik yapı, üç amino asit ve bir su ya da hidroksil grubunun çinkoya bağlanmasıyla oluşmaktadır (Şekil 4). Çinko içeren metaloenzimlerde, çinko iyonuna bağlandığı sıkça görülen amino asitler histidin, glutamik asit, aspartik asit ve sistindir. Bu amino asitler arasında histidin, katalitik bölgede en çok kullanılan amino asit olması dolayısıyla ayrı bir öneme sahiptir. Histidin, imidazol grubundaki azotun eşlenmemiş elektron çifti ile nötral yükte ligand olarak kullanılmaktadır. Aspartik asit ve glutamik asit ise fonksiyonel gruplarındaki protonlarını kaybetmiş karboksilat grupları ile anyonik ligandları oluşturmaktadır. Sistin amino asitindeki fonksiyonel grubun protonlanmış ya da protonunu kaybetmiş halde çinko iyonuyla kompleks oluşturduğu bilinmese de yapılan teorik hesaplamalar, sistin içeren enzimlerin çinko ile bağlanan kısımlarındaki sistinlerin protonlarını kaybetmiş durumda olduğu yönündedir (Simonson, 2002). Aşağıdaki tabloda

çinko içeren metaloenzimler, çinko içeren amino asitlere göre özetlenmiş şekilde bulunmaktadır. (Tablo 1)



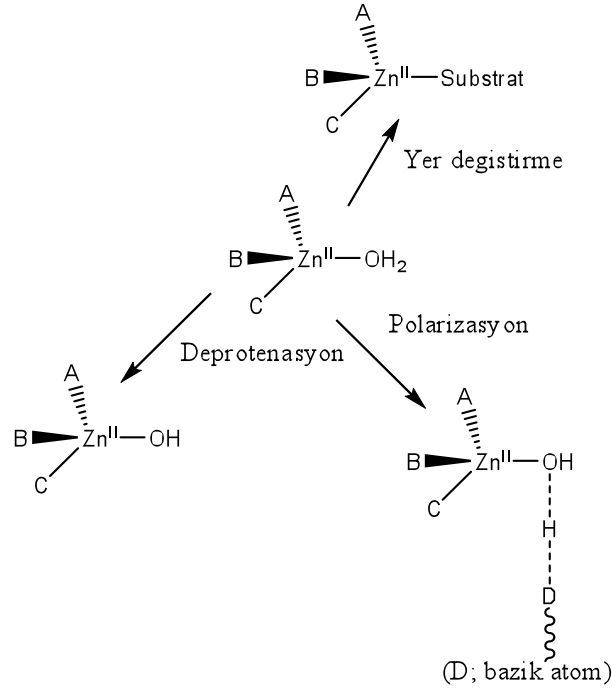
Şekil 4. Çinko içeren metaloenzimlerdeki çinko iyonunun oluşturduğu kompleks (Simonson, 2002).

Tablo 1: Çinko içeren metaloenzimlerin katalitik gruplarındaki amino asitlere göre sınıflandırılması (Simonson, 2002).

A, B, C	Enzimin İsmi	Enzimin Fonksiyonu
His, His, His	Karbonik Anhidraz	Karbondioksit hidrasyonu
His, His, Glu	Karboksi Peptidaz Thermolisin Nötral Peptidaz	Ekzopeptidaz Endopeptidaz Endopeptidaz
His, His, Asp	Proteaz from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Endopeptidaz
His, His, Cys	Bakterofaj T7 lizozom	Polisakkaritlerdeki L-alanin ve N-asetilmuramat arasındaki amit bağının kırılması
His, Asp, Cys	Farnesil Protein Transferaz	Farnesil isoprenoidin sistinin fonksiyonel grubuna aktarılması
His, Cys, Cys	Alkol dehidrogenaz Sistidin deaminaz	Alkollerin aldehit ve ketonlara yükseltgenmesi Sistidin molekülünün amino grubunun koparılmasıyla üridine dönüştürülmesi
Cys,Cys, Cys	5-aminolevulinat dehidrataz	5-aminolevulinik asitin porfobilinojene dönüştürülmesi

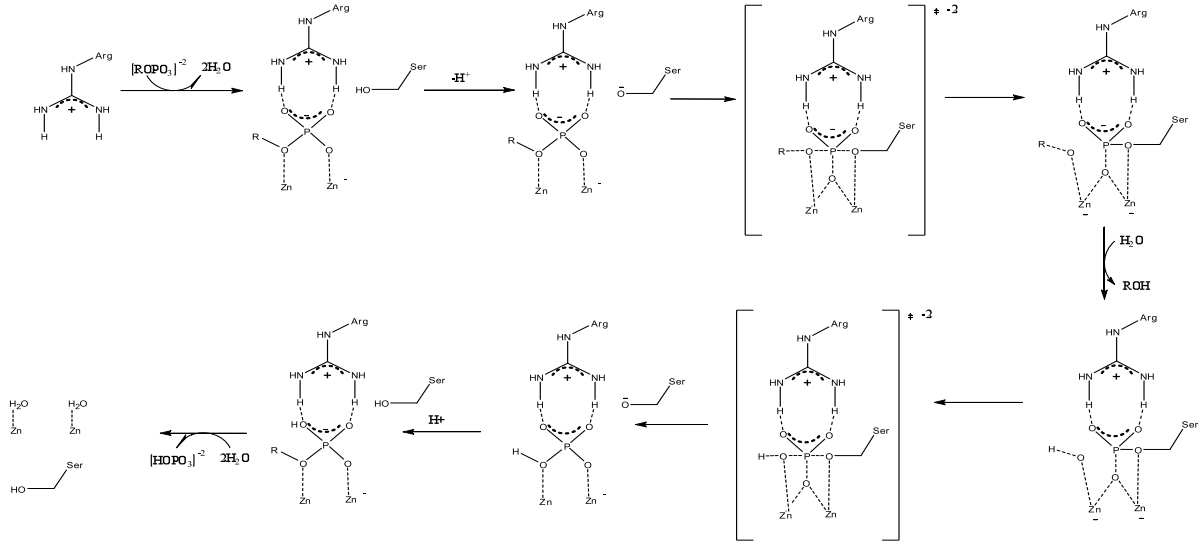
Çinko içeren metaloenzimleri mekanistik olarak incelersek, çinko ile koordine olmuş H₂O molekülünün Lewis asidik özelliğe sahip Zn (II) ile hidroksite dönüşmesinin önemli bir etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 5). İyi bir Lewis asidi olan Zn (II) koordine olduğu su molekülünü nötral pH'da güçlü bir nükleofil olan hidroksite dönüştürebilmektedir. Bu mekanizmaya daha çok karbonik anhidraz enziminde rastlanmaktadır (Coleman, 1986). Bir diğer aktivasyon çeşidi ise karboksipeptidazlardaki anyonik glutamatın katılımı ile gerçekleşir. Bu durumda, çinko iyonuna bağlı su molekülünün proton vermesi nötral pH'da zorlaşacaktır. Çinkoya komşu eksi yüklü glutamat sayesinde ise su molekülü polarize olur, protonu glutamatın karboksilat kısmı ile paylaşılır. Bir diğer durumda ise, çinko ile koordine olmuş su molekülü substrat ile yer değiştirir. Bu mekanizma ise katalitik bölgesinde iki adet sistin bulunan karaciğer alkol dehidrogenazında görülür (Vallee, 1994). Metaloenzimlerde çinko iyonunun

suyu aktifleştirmesi dışında sistindeki tiol gruplarını da aktive ettiği bilinmektedir (Myers, 1993; Matthews, 1997) .



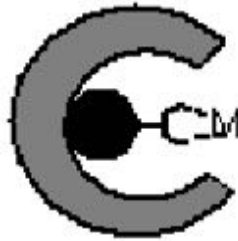
Şekil 5. Metaloenzimin katalitik bölgesinde bulunan su ile koordine olmuş çinko iyonunun gerçekleştirdiği olası mekanizmalar. (Coleman, 1986)

Alkalın fosfatazlar, fosfat monoesterlerdeki fosfat grubunun kırılmasını sağlayan katalitik bölgesinde çinko iyonu bulunan metaloenzimlerdir (Wicox, 1996; Holm, 1996; Jedrzejas, 2001; Gani, 1995). Reaksiyon monofosfatın iki çinko iyon merkezi ile koordine olup suyun hidrolizi ile başlar. Sonrasında bir serin amino asidinin fonksiyonel grubundaki deprotone olmuş hidroksil grubunun fosfat grubundaki fosfora saldırmasıyla, ester bağının kırılıp grubun enzime bağlanmasıyla devam eder. Çinkoya bağlanan alkoksit grubu bir süre sonra hidroliz olup hidroksite dönüşür. Güçlü bir nükleofil olan hidroksit grubu, serine bağlı fosfor merkezine saldırarak fosfatın enzimden ayrılmasını sağlar. Son basamakta ise çinko iyonuna bağlı olan fosfat grubu su molekülleri ile yer değiştirerek reaksiyon tamamlanır. Mekanistik basamaklar aşağıdaki şemada gösterilmiştir (Parkin, 2004).



Şekil 6. Alkalın fosfataz enziminin temel mekanistik basamakları. (Parkin, 2004).

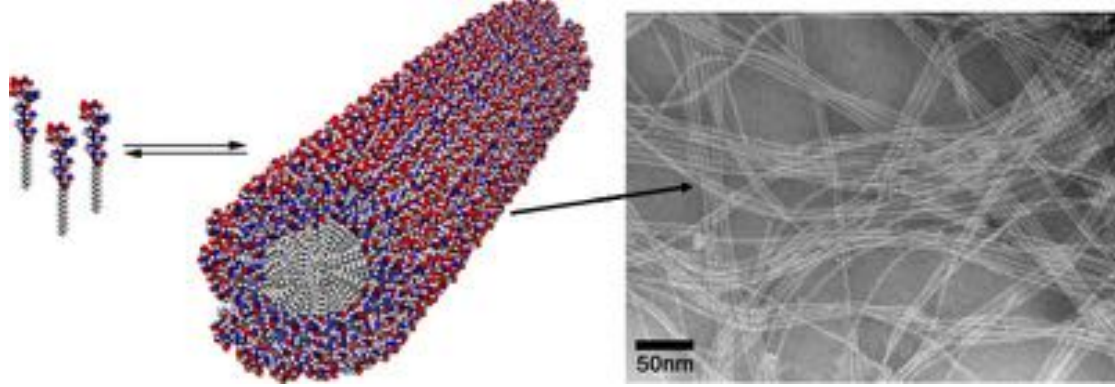
Metalloenzimlerde metal ve ligand etkileşimi aşağıda gösterilmiştir. Metal iyonları ligandlarla, birincil bağlanma katmanları ya da ikincil bağlanma katmanları olmak üzere iki şekilde koordine olabilir (Rosati 2010, 1994; Collot, 2003). Birincil bağlanma katmanı elektron alıcı ligandlar ve elektron verici metal iyonlarından oluşur. İkincil bağlanma katmanı kovalent olmayan bağlarla birincil bağlanma katmanına bağlanan moleküllerden oluşur. Koordinasyon katmanları şematik olarak Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. Metal ve ligand arasındaki etkileşimi gösteren şema. Siyah olan birincil bağlanma katmanını, gri olan ise ikincil bağlanma katmanını göstermektedir. (Vallee, 1994; Collot, 2003).

Bu projede sentezlenen, histidin amino asitleri ile aktifleştirilmiş peptit nanosistemlerin değişik konfigürasyonları ve çinko metali ile koordine edilmiş alkalın fosfataz enzimini mimik eden peptit tabanlı malzemeler kullanılarak osteojenik hücre aktivitesi enzimatik yolla artırılmış hücreler arası matrise benzeyen yapay ortamlar oluşturulmuştur. Halihazırda kemik doku rejenerasyonunda ve mineralizasyonunda kullanılmak üzere üç boyutlu nanoyapılar oluşturan, peptit tabanlı nanoyapılı malzemeler oluşturulmaktadır (Şekil 8). Daha önce, fosfat grubu eklenmiş serin amino asiti içeren peptit amfiller, alkalın fosfataz enzimi varlığında doğal kemik doku ortamında olduğu gibi hidroksiapatit oluşumuna ve kalıp olarak kullanılan bu peptitlerin üzerinde kalsiyum fosfat minerallerinin büyümesine olanak sağlamıştır (Spoerke, 2009). Yine başka bir çalışmada, alkalın fosfataz enzimi fibronektin

iskele yüzeylerine kovalent olarak bağlanmış ve üzerinde inkübe edilen primer kemik hücrelerinin mineralizasyonunu önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Osathanon, 2009). Bu sebeplerle bu çalışmada geliştirilen olan peptit nanofiber sistem, alkalın fosfataz enzim aktivitesinin de etkisiyle daha önce geliştirilmiş olan malzemelerden daha etkin bir şekilde biyomineralizasyonu tetiklemiştir.



Şekil 8. Programlanabilir peptit moleküllerinden oluşan nanoyapılar. (Spoerke, 2009).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Peptit sentezi:

Fmoc ve Boc korumalı amino asitler, MBHA Rink amid rezini ve HBTU NovaBiochem ve ABCR'dan alınmıştır. Diğer kimyasallar, Fisher, Merck, Alfa Aesar ya da Aldrich gibi firmalardan alınmış ve saf oldukları için herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır. Peptit MBHA Rink amid rezini üzerinde yapılandırılmıştır (Şekil 9). Amino asitleri birbirilerine ekleme reaksiyonları 2 eşdeğer mol Fmoc korumalı amino asite, 1,95 eşdeğer mol HBTU ve 3 eşdeğer mol DIEA ile 2,5 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Fmoc koruma grupları, %20 Piperidin/DMF çözeltisi ile 20 dakika sürede ayrılmıştır. Sentezlenen peptitlerin rezinden ayrılması, %95:2,5:2,5 oranlarında TFA:TIS:H₂O çözeltisi ile 3 saatte gerçekleştirilmiştir. Fazla TFA, dönen buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen peptitlerin toz halinde çöktürülmesi, düşük sıcaklıkta dietil eter ile yapılmış ve oluşan beyaz çökelek soğuk-kurutucu ile kurutulmuştur. Peptitler, quadropol-uçuş zamanlı kütle spektrometresiyle karakterize edilmiştir (Q-TOF MS). Kütle spektrumunda gözlenen kütle, peptidin doğru kütesidir ve RP-HPLC ile analiz edildiğinde %95'den daha saf olduğu görülmüştür.

2.2 Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometresi (LC/MS):

1 mg peptit amfifil, 1 mL saf suda çözülmüş ve 15 dakika oda sıcaklığında sonike edilmiştir. LC/MS ölçümleri Agilent Technologies 1200/6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS ile yapılmış, Agilent Zorbax Extend-C18 kolonu (hızlı çözünürlük HT 2,1 x 50 mm 1,8-mikron) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak aşamalı (A) Su (%0,1 formik asit) ve (B) Asetonitril (%0,1 formik asit) karışımı kullanılmıştır.

2.3 Dairesel Dikroizm (CD):

%1 (ağırlık) peptit çözeltisi su içinde çözüldükten sonra, jel oluşumu 0,1 M NaOH çözeltisi ile elde edilmiştir. Sonrasında peptit çözeltisi pH 7'deki seyreltik NaOH çözeltisi ile 5×10^{-4} M'a seyreltilmiştir. Ölçüm için Jasco J-815 CD spektrofotometresi kullanılmıştır. 300 nm ile 190 nm arasındaki dalga boyları 0,1 veri hatvesi, 100 nm/dk tarama hızı ve 1 nm bant genişliği ile ölçülmüştür. Her ölçüm üç kez tekrarlanmış ve ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

2.4 İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (ITC) ile Metal Bağlanma Analizi :

0,2 mM peptit çözeltisi, 2 mM $ZnCl_2$ çözeltisi ile 25 °C'de, 5 μ cal/s referans gücü ile 500 rpm hızda titre edilmiştir. Çözeltiler pH 8'de hazırlanmıştır. Ölçümler MicroCal 200 mikrokaloimetresi ile yapılmıştır

2.5 *p*-nitrofenil asetat Hidroliz Deneyi:

Hidroliz deneyleri, pH 7,4'teki 50 mM TRIS tampon çözeltisindeki 0,028-1,2 mM *p*-nitrofenil asetatın 15 μ M peptit amfifil ve 10 μ M $ZnCl_2$ varlığında ve yokluğunda gerçekleşmiştir. *p*-nitrofenil asetatın stok çözeltisi asetonitril içinde hazırlanmıştır.

2.6 CaP oluşum deneyleri:

Cam yüzeyler, 400 μ M $ZnCl_2$ çözeltisi varlığında ve yokluğunda pH 7,4'teki 600 μ M peptit çözeltileri ile kaplanmıştır. Kaplanan yüzeyler 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Kontrol grupları olarak da, sadece $ZnCl_2$ çözeltisi ile kaplanmış ve hiçbir şey ile kaplanmamış cam yüzeyler kullanılmıştır. Sonrasında da her bir kuyucuğa 24 mM $CaCl_2$, 14,4 mM β -gliserol fosfat içeren pH 7,4'teki 50 mM TRIS tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

2.7 Raman Spektrometresi:

WITec Alpha300S Raman modülü olan taramalı yakın-alan optik mikroskobu, Nd:YAG 532 nm lazer kaynağı, 0,53492 s integrasyon süresi, 50 toplanma sayısı ile karakterizasyonda kullanılmıştır. Raman spektral görüntülemesi için 150 μ m x 150 μ m'lik alanlar her görüntü 50 çizgi, her çizgi 50 nokta ile 10,610 s/çizgi hızı ve 0,2122 s integrasyon süresi ile kullanılmıştır.

2.8 Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-Işını Analizi (SEM/EDX):

FEI Nova 600i Nanolab taramalı elektron mikroskobu, EDAX enerji dağıtıcı spektrometresi ile kullanılmıştır. Gerekli durumlarda numuneler, 3 nm Au/Pd ile kaplanmıştır.

2.9 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM):

Seyreltilmiş numuneler Lacey ultra ince karbon kaplı bakır gridler üzerine alınmış, organik numuneler %2'lik uranil asetat ile 5 dakika boyanmıştır. İnorganik numuneler, kalsinasyon işleminden sonra etanol içine alınmış, bu etanoldaki süspansiyondan gridlerin üzerine damlatılarak, herhangi bir boyama yapılmadan bakılmıştır. FEI Tecnai G2 F30 marka Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanılmıştır.

2.10 X-Işını Saçılım Spektroskopisi (XRD):

Kalsiyum fosfat kristallerinin kristalografik karakterizasyonu için Panalytical X-Pert MPD Pro Multi-Purpose marka X-Işını Saçılım Spektrometresi 16 s dönme hızı, 20° ile 70° arasındaki tarama alanı ve 0,0525° adım boyu ile kullanılmıştır.

2.11 p-nitrofenil fosfat Hidroliz Deneyi:

Hidroliz deneyleri, pH 7,4'teki 50 mM TRIS tampon çözeltisindeki 0,3-10 mM p-nitrofenil fosfatın yüzende 1 mM peptit amfifil ve 200 µM kaplı ZnCl₂ varlığında ve yokluğunda gerçekleşmiştir. p-nitrofenil fosfatın stok çözeltisi Tris içinde hazırlanmıştır.

2.12 Yüzey hidrolizi:

pH 7,4'teki 50 mM TRIS tampon çözeltisindeki 200 µM p-nitrofenil fosfatın hidrolizi yüzeyinde kaplı olan 1 mM peptit amfifil ve 100 µM ZnCl₂ varlığında/yokluğunda gerçekleşmiştir.

2.13 Hücre Kültürü Çalışmaları:

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere hücre kültürü tabaklarının yüzeyleri 1 mM peptit amfifil ve DMEM kullanılarak pH değişimi sonucunda oluşan jel ile kaplanmış ve hemen ardından çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Hücre ekimi öncesi kaplı hücre kültürü tabakları 2 saat UV altında sterilize edilmiştir. Mineralizasyon ve kRT-PZR deneylerinde Saos-2 hücreleri (insan osteoblast hücre hattı, ATCCR HTB-85TM) kullanılmıştır. Hücreler %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin ve 2 mM L-glutamin ile tamamlanmış DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besi yeri içerisinde 37 °C'de ve %5 CO₂ altında kültürlenmiştir. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra besi yerleri bir grup 10 mM β-gliserofosfat, 50 µg/mL askorbik asit ve 10 nM deksametazon ile diğer bir grup ise sadece 10 mM β-gliserofosfat desteklenmiş %10 FBS içeren DMEM osteojenik besi yeri ile değiştirilmiştir.

2.14 Hücrelerin Canlılık Testi:

Saos-2 hücrelerinin canlılık testleri, Alamar blue boyaması ile belli aralıklarla yapılmıştır (1., 3. ve 6. günler). Bu amaçla, 5×10^3 hücre/cm² yoğunluğundaki hücreler PA kaplanmış ve kaplanmamış 24 kuyucuklu hücre tabakları üzerinde inkübe edilmiştir. 1. ve 2. günler sonrasında, besi yeri kaldırılıp; hücreler PBS ile yıkanmış ve FBS'siz besiyeri içerisindeki Alamar Blue ile 3 saat oda 37 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak, mikropilaka okuyucuda 600 nm'de ölçüm alınmıştır.

2.15 İstatiksel Analiz:

Bütün kantitatif değerler ortalama \pm s.e.m (ortalamaların standart hatası) olarak gösterilmiştir ve tüm deneyler her grup için en az 3 replika ve en az 3 bağımsız tekrar ile gerçekleştirilmiştir. İki yönlü Varyans Analizi (ANOVA) veya t-testi istatistiksel analiz için kullanılmıştır ve 0,05'ten küçük p-değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.16 Alizarin Kırmızısı Boyaması:

Saos-2 hücrelerinin PA nanofiber kaplı ve kaplanmamış hücre kültürü tabakları üzerinde mineralize nodül oluşturabilme ve kalsiyum biriktirme becerileri Alizarin Kırmızısı boyaması ile incelenmiştir. Özetle, PA nanofiber kaplanmış ve kaplanmamış 24 kuyucuklu hücre tabaklarına 3×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda hücreler ekilmiştir. Ertesi gün, eski besiyeri osteojenik destek (10 mM β -gliserofosfat, 50 μ g/mL askorbik asit ve 10 nM deksametazon) içeren ve sadece yeni osteojenik besi yeri ile değiştirilerek hücreler 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra PBS ile yıkanmış ve oda sıcaklığında çok soğuk etanol ile 1 saat süresince fiksasyonları yapılmıştır. Daha sonra, fikse edilen hücreler ilk olarak distile su ile yıkanıp, 40 mM Alizarin Kırmızısı (pH 4.2) çözeltisi ile oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bir karıştırıcı üzerinde boyanmıştır. Nonspesifik bağlanmalardan kurtulmak için distile su ile 4-5 kez yıkandıktan sonra, kalsiyum nodüller mikroskop altında gözlenmiştir. Görüntülemelerden sonra kantitatif analiz için hücrelerin üzerine Cetylpyridinium eklenmiştir, bu şekilde Alizarin kırmızısı çözünür hale getirilmiş ve mikropilaka okuyucu ile aborbans ölçümleri alınmıştır. Okunan değerler daha önce hazırlanmış olan kalsiyum konsantrasyonları standart grafiğinden elde edilen denkleme yerleştirilerek hücre yüzeyinde depozit edilen kalsiyum konsantrasyonları saptanmıştır.

2.17 kRT-PZR Gen İfade Analizi:

Hücrelerin peptit nanofiberler üzerindeki farklılaşmalarını incelemek için kemiğe özgü genlerin ifadelerine bakılmıştır. Saos-2 hücrelerinin farklı nanofiberler üzerindeki farklılaşmaları, gen ifade oranlarının kRT-PZR yöntemi ile incelenmesiyle analiz edilmiştir. Bu

deneyde Kollajen-I ve Runx2 gibi kemik spesifik genlerin primerleri kullanılmıştır. Hücreler yukarıda bahsedildiği gibi peptit nanofiberler ile kaplandıktan sonra yine 5×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda 3. ve 6. gün için paralel hücre tabaklarına osteojenik destek içeren ve içermeyen besi yerlerinde ekilmiştir. RNA izolasyonu için 3. ve 6. günlerde hücreler 1 mL/cm² miktarında Trizol ile hücre tabağından kaldırılmış, patlatılmış ve eppendorf tüplere aktarılmıştır. Sonrasında Trizol ile eşit hacimde kloroform trizolün üzerine eklenmiş ve karışmaları için hızlıca çalkalanmıştır. Hücre içeriklerinin fazlara ayrılıp RNA'nın izole edilebilmesi için örnekler 15000 rpm'de 17 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst saydam faz RNA içerdiği için yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve RNA'nın çöktürülmesi için isopropanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra örnekler 15000 rpm'de 12 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında çöken RNA eppendorf tüplerin alt kısmında beyaz pelletler olarak gözlemlenmiştir. RNA pelletleri tüplere 1 mL 70% ethanol eklenerek ve 15000 rpm'de 8 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir. Yıkama işleminden sonra ethanolleri uçurmak için pelletler akış kabininde 20 dakika bekletilmiştir. Sonrasında pelletler 30 µL distile su ile çözülmüş ve Nanodrop kullanılarak konsantrasyonları belirlenmiştir. RNA örnekleri -80 °C'de saklanmıştır. kRT-PZR reaksiyonu Tablo 2'de gösterilen primer sekansları kullanılarak yapılmıştır. RNA örneklerinden cDNA sentezi ve kRT-PZR reaksiyonu "SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit" kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon şartları ise şu şekildedir; 5 dakika 55 °C, 5 dakika 95 °C, 40 kere 15 saniye 95 °C, 30 saniye 60 °C ve 1 dakika 40 °C, sonrasında erime eğrisi analizi olacak şekildedir. Elde edilen Ct değerleri GAPDH genine göre karşılaştırmalı CT metoduna göre normalize edilmiştir.

SAOS-2 ifade analizinde kullanılan primerlerin sekansları aşağıda gösterildiği gibidir.

Tablo 2. Kol I: Kollajen I, Runx2: Runx2

Gen	Primer Sekansı
Kol I	5'-AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG-3' 3'- AGATCACGTCATCGCACAA -5'
Runx2	5'-TCTGGCCTTCCACTCTCAGT-3' 3'- GACTGGCGGGGTGTAAGTAA -5'

rMKH ifade analizinde kullanılan primerlerin sekansları aşağıda gösterildiği gibidir.

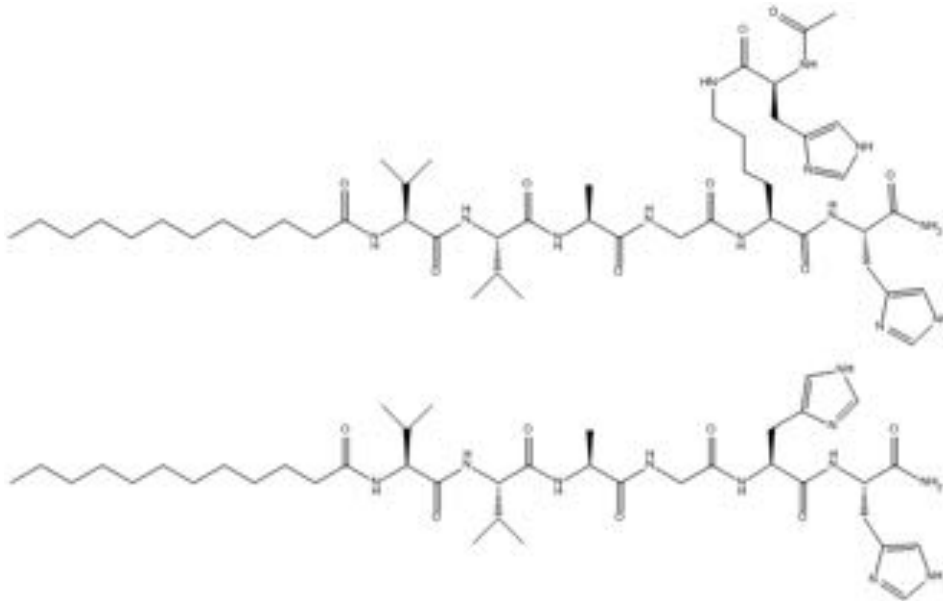
Tablo 3: Kol I: Kollajen I, OP: Osteopontin

Gen	Primer Sekansı
Kol I	5'-GAATATGTATCACCAGACGCAGA-3' 3'- GGACATCTGGGAAGCAAAGT -5'
Runx2	5'-GGACATCTGGGAAGCAAAGT-3' 3'- CCCTAAATCACTGAGGCGGT-5'
OP	5-GCCGAGGTGATAGTGTGGTT-3' 3- GTGGGTTTCAGCACTCTGGT -5'

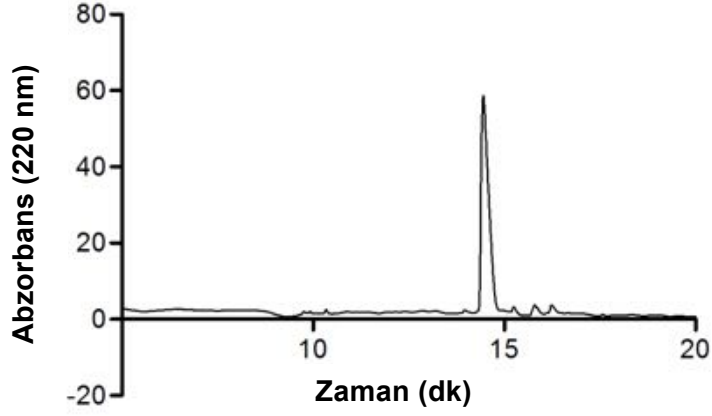
3. BULGULAR

3.1 Peptit amfifil moleküllerinin sentez ve karakterizasyonu

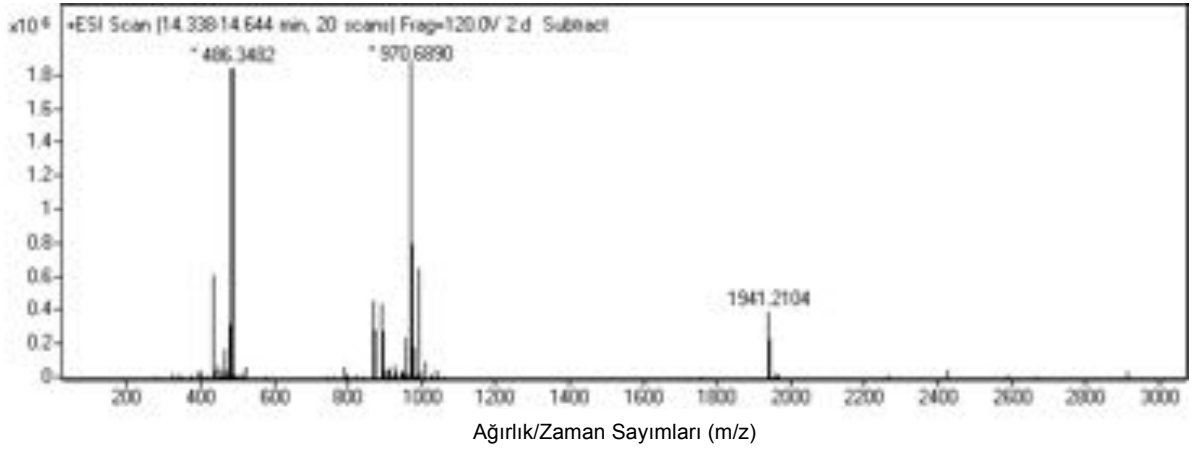
Projede kullanılmak üzere sentezlenmiş olan peptit amfifil moleküllerinin (PA) kimyasal yapıları Şekil 9'de verilmiştir. Lauryl-VVAGK(H-Ac)H-Am (1) ve Lauryl-VVAGHH-Am (2) peptit amfifil molekülleri sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve çinko iyonu ile olan etkileşimleri incelenmiştir. 1 ve 2 no'lu peptit amfifil molekülleri katı faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiştir. Peptit amfifiller sentezlendikten sonra, saflıkları sıvı kromatografi cihazı ile kontrol edilmiştir. Kütle spektrometrisi sonuçları ile peptitlerin varlığı ispatlanmıştır. (Şekil 10-13)



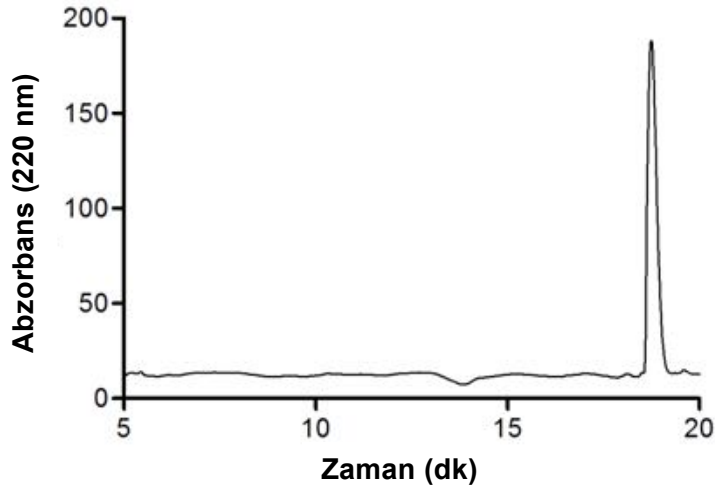
Şekil 9. Kullanılan peptit amfifil moleküllerinin kimyasal yapısı. Üst: Lauryl-VVAGK(H-Ac)H-Am (1) ve Alt: Lauryl-VVAGHH-Am (2)



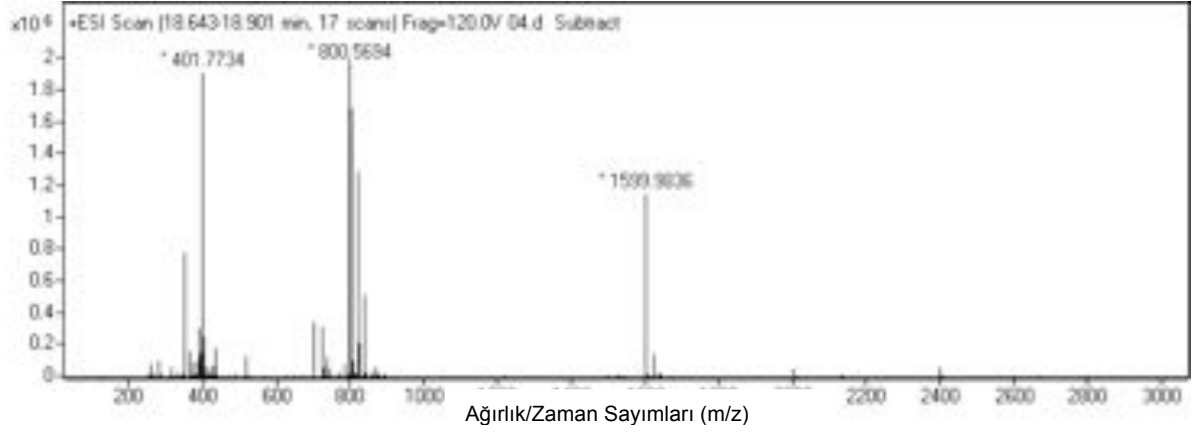
Şekil 10. 1 nolu peptit amfilin 220 nm'deki sıvı kromatogramı.



Şekil 11. 1 nolu peptit amfilin kütle spektrumu. Deneysel; M= 969.6890, $[M+H]^+=970.6890$, teorik; M= 970.21, $[M+H]^+= 971.21$.

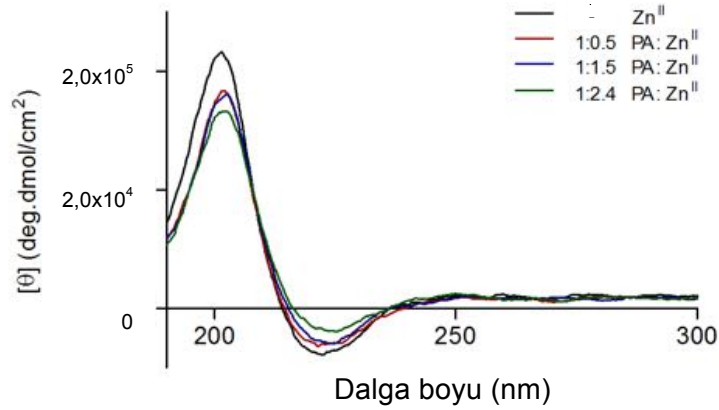


Şekil 12. 2 nolu peptit amfile a ait sıvı kromatogramı.

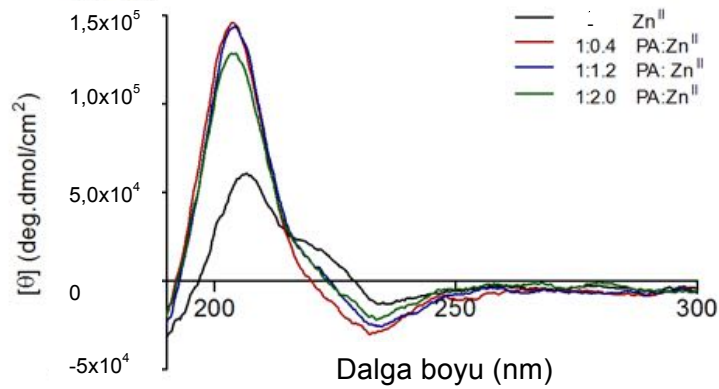


Şekil 13. 2 nolu peptit amfifile ait kütle spektrumu. . Deneyisel; $M = 799.5694$ $[M+H]^+ = 800.5694$, teorik; $M = 799.51$, $[M+H]^+ = 800.51$.

Dairesel dikroizm analizinde 1 ve 2 nolu peptit amfillerin pH 7 civarında jel oluşturdukları, bu jelin de beta-düzlemsel yapıdaki peptit dizinlerinden ileri geldiği kanıtlanmıştır. (Şekil 14 ve 15) Belirtilen oranlardaki Zn^{II} iyonu varlığında da peptit amfillerin beta-düzlemsel yapısını koruduğu gösterilmiştir.



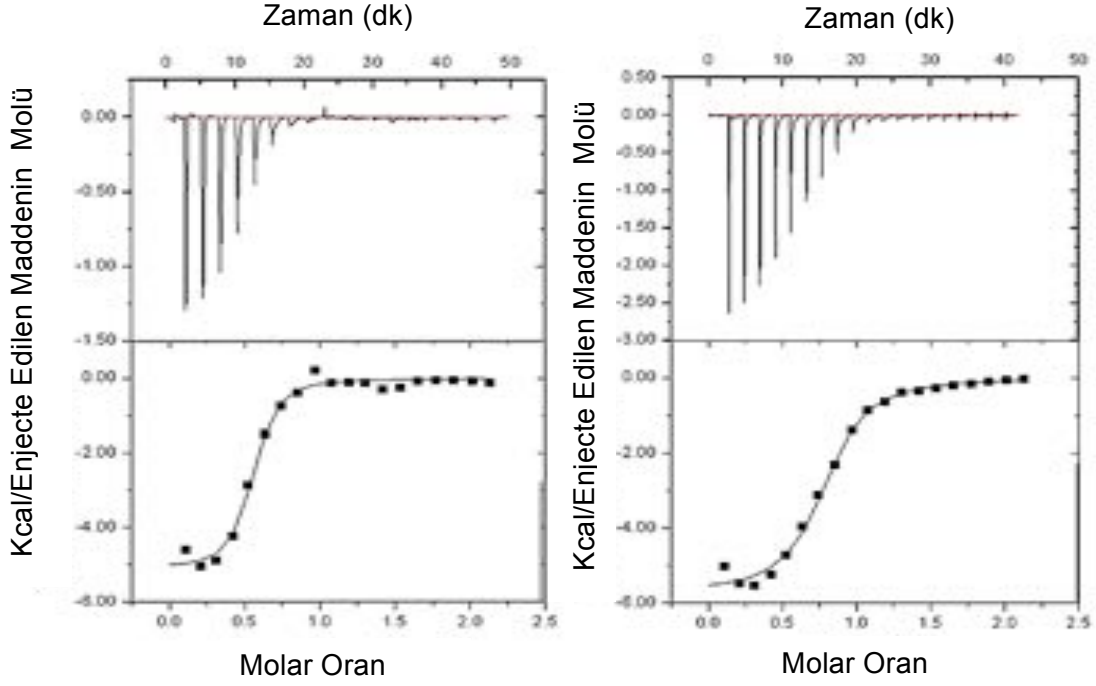
Şekil 14. 1 nolu peptit amfil molekülünün Zn^{II} titrasyonu ile ikincil yapısındaki değişiklikler.



Şekil 15. 2 nolu peptit amfil molekülünün Zn^{II} titrasyonu ile ikincil yapısındaki değişiklikler.

3.2 İzotermal Kalorimetre

1 ve 2 nolu peptit amfifillerin Zn^{II} iyonu ile etkileşimi, izotermal titrasyon kalorimetresi ile gösterilmiştir. Şekil 16, sırasıyla 1 ve 2 nolu peptit amfifillerin pH 7,4'teki $ZnCl_2$ solüsyonundaki izotermal titrasyon kalorimetresi kullanarak yapılan analizini göstermektedir. Bu sonuçlarda, 1 nolu peptit amfifilin Zn^{II} iyonu ile etkileşiminin 2 nolu peptit amfifile göre daha fazla olduğu görülmüştür.



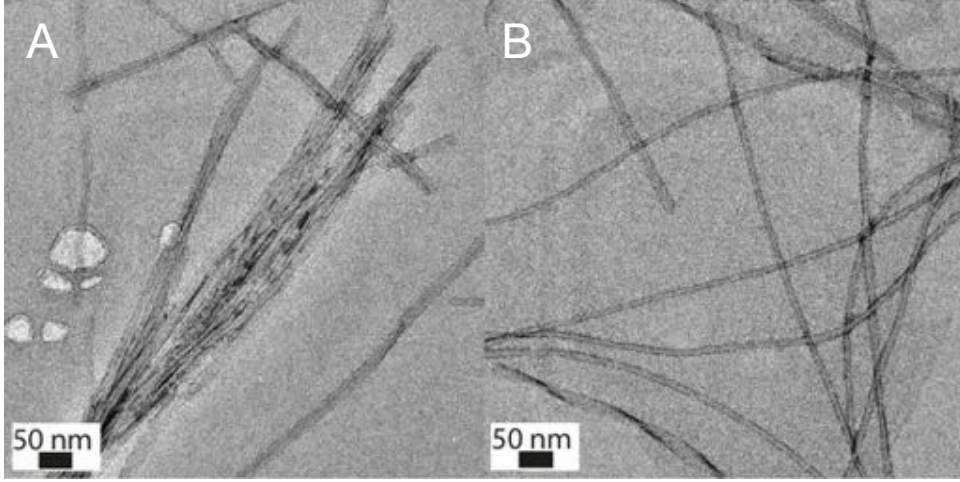
Şekil 16. 1 nolu peptit amfifilin $ZnCl_2$ ile izotermal titrasyon eğrisi.

	K (M^{-1})	Bağlanma Oranı (PA:Zn)
PA1	$4,35 \times 10^{-5}$	2:1
PA2	$1,73 \times 10^{-5}$	1:1

Tablo 4. Çinkonun peptit amfifillere bağlanma sabiti ve bağlanma oranları.

3.3 Geçirimli Elektron Mikroskobu Nanofiber Görüntüleri

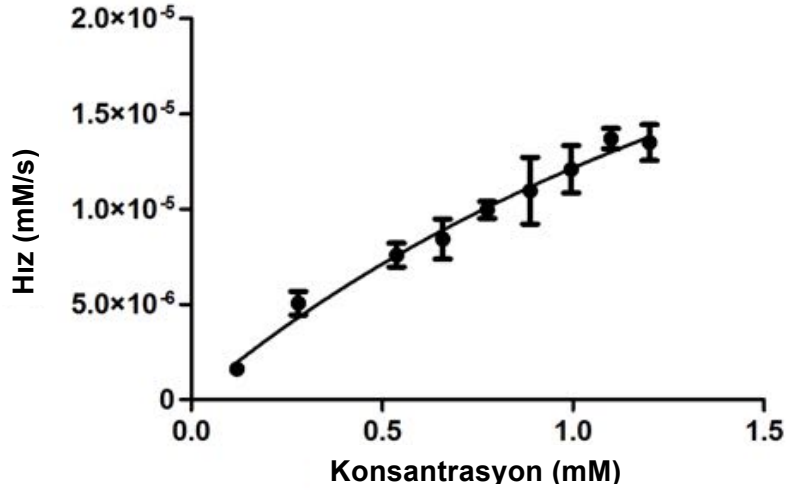
1 ve 2 nolu peptit amfillerin pH 7,4'te oluşturdukları 3 boyutlu nano yapılar, geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 17'de, oluşan 10 nm çapındaki peptit amfil nanofiberleri görülmektedir. Bu sonuçlarla peptitlerin ikincil yapı oluşumları kanıtlanmıştır.



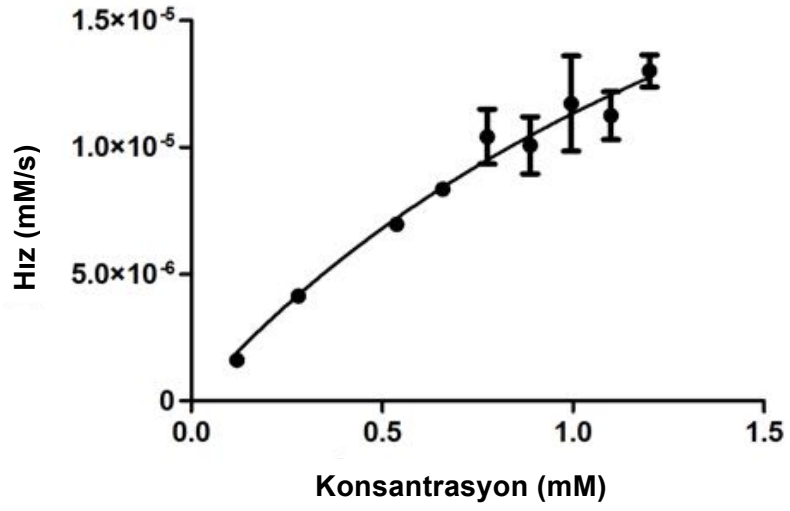
Şekil 17. a) 1 ve b) 2 no'lu peptit amfillerin geçirimli electron mikroskobu ile çekilen mikrografları.

3.4 Enzim Kinetiği Hesaplaması (p-nitrofenil asetat sübstratı ile)

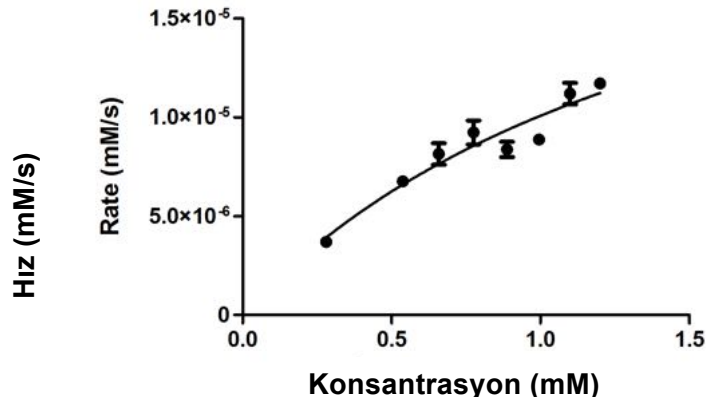
Enzim kinetiği deneylerinde ilk önce hidroliz edilmesi daha kolay olan asetil ester grubunu bulunduran p-nitrofenil asetat kullanılmıştır. p-nitrofenil asetat ester hidrolizi deneylerinde öncelikli olarak kullanılmakta olan bir sübstrat olup, ester grubu imidazol katalist varlığında hidroliz edilebilmektedir. Sübstratın üzerindeki nitrofenil grubu enzimatik kataliz sonrası emisyon vererek katalitik verimin hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. PA katalizörler ve farklı konsantrasyonlardaki p-nitrofenil asetat varlığında hidroliz deneyi ve enzim kinetiği hesaplamaları yapılmıştır. Zn^{II} iyonu varlığında ve yokluğunda peptit amfil moleküllerinin Michealis-Menten (enzimlere özgü sıfırıncı derece reaksiyon) denklemine uyduğu gözlemlenmiştir, yani sübstrat hidrolizi belli bir konsantrasyondan sonra doğal enzim varlığında olduğu gibi satüre olmuştur. (Şekil 18-21) Böylece, peptit amfil moleküllerinin enzimatik aktiviteleri olduğu düşünülmektedir. Sadece Zn^{II} iyonu varlığında ise p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği doğrusal regresyona uymaktadır. Ayrıca, p-nitrofenil asetatın hidrolizi de doğrusal regresyondadır yani enzime bağlı hidroliz karakteri göstermemektedir. (Şekil 22) Hidroliz deneylerine ait veriler Tablo 5'de özetlenmiştir.



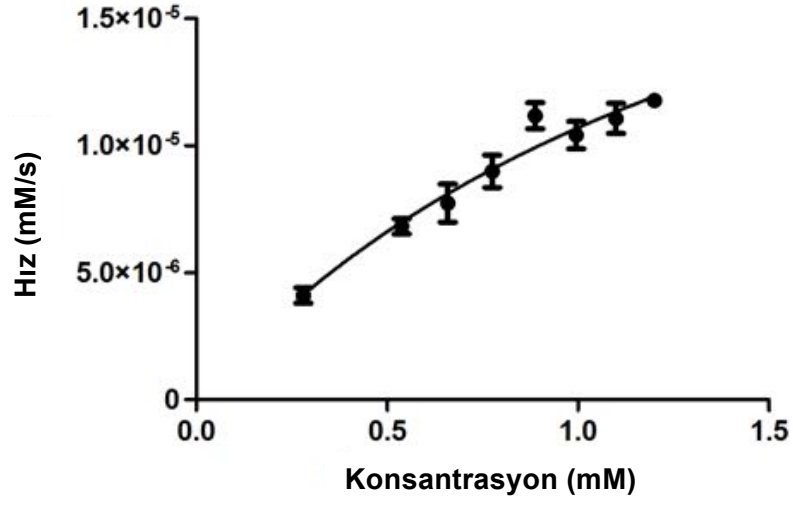
Şekil 18. 1 nolu peptit amfil varlığında *p*-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.



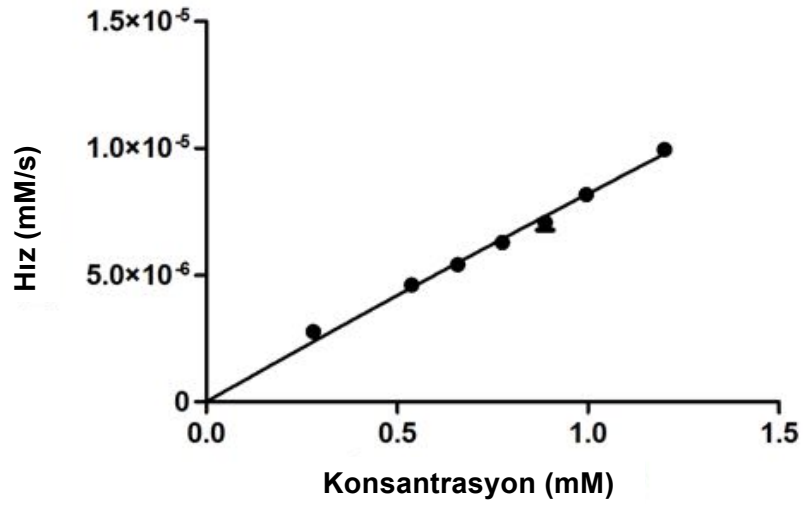
Şekil 19. 1 nolu peptit amfil ve Zn^{II} iyonu varlığında *p*-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.



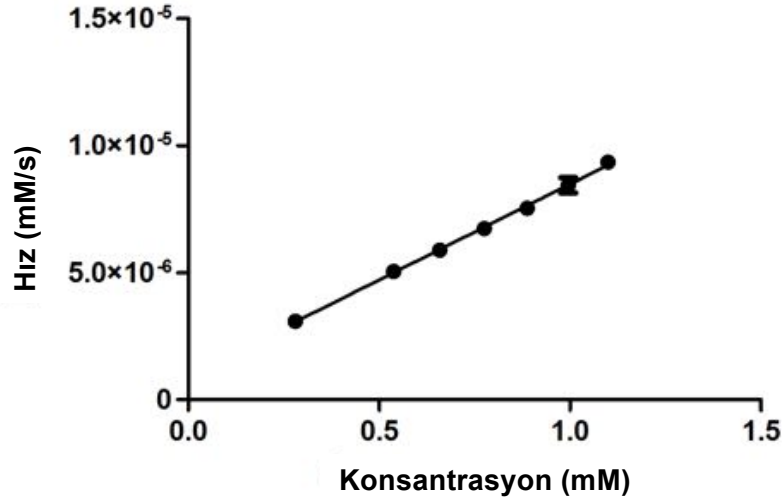
Şekil 20. 2 nolu peptit amfil varlığında *p*-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.



Şekil 21. 2 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.



Şekil 22. p-nitrofenil asetatın, Zn^{II} iyonu varlığında hidroliz kinetiği.



Şekil 23. *p*-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.

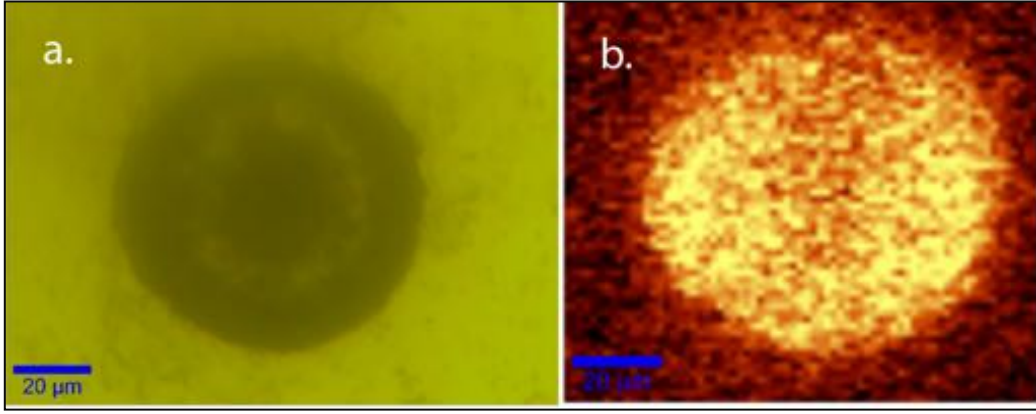
Tablo 5: *p*-nitrofenil asetatın hidroliz kinetiği.

Kullanılan katalizör	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	V_{max}
PA1	2,436±0,7223	0,002783±0,0006000	4,175 x10 ⁻⁵
PA1+Zn ^{II}	2,032±0,6621	0,003412±0,0007744	3,412x10 ⁻⁵
PA2	1,587±0,7853	0,001737±0,0005487	2,605x10 ⁻⁵
PA2+Zn ^{II}	1,625±0,5558	0,002807±0,0006179	2,807x10 ⁻⁵

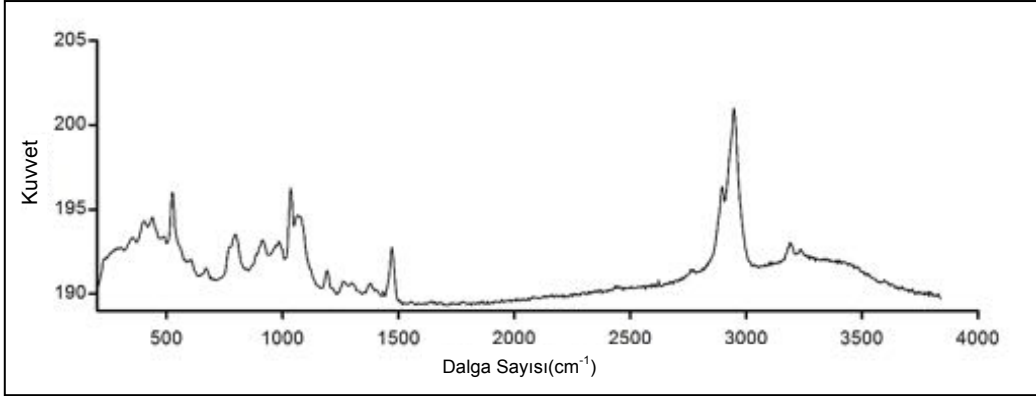
3.5 CaP mineralizasyonu ve mineral analizi (RAMAN, SEM, XRD)

Peptit amfifillerin Zn^{II} iyonu varlığında ve yokluğunda hidrolitik aktivitelerini kanıtlamak amacıyla, cam yüzeyler, 1 ve 2 nolu peptit amfifiller, pH 7,4'te, Zn^{II} iyonu ile karıştırılarak ve karıştırılmadan kaplanmıştır. Ayrıca, kontrol olarak sadece Zn^{II} iyonu ile kaplanan ve hiçbir şey kaplanmamış cam yüzeyler de kullanılmıştır. Bu cam yüzeyler, CaCl₂ ve β-gliserol fosfat içeren pH 7,4'teki 50 mM TRIS tampon çözeltisi ortamında 1 ve 3 gün boyunca muhafaza edilmiştir. Bu süreler sonunda kalsiyum fosfat kristallerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Oluşan kristaller, Raman spektrometre, taramalı elektron mikroskobu, elektron kırınım spektrometresi ve X-ışını kırınım spektrometresi ile karakterize edilmiştir. Kullanılan peptit nanofiberlerin enzimatik aktiviteleri sonucu oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin, optik ve konfokal Raman görüntüleri alınmıştır (Şekil 24 ve 26). Şekil 24'te 1 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu ile, Şekil 26'da 2 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin optik (20X) ve konfokal Raman görüntüleri görülmektedir. Şekil

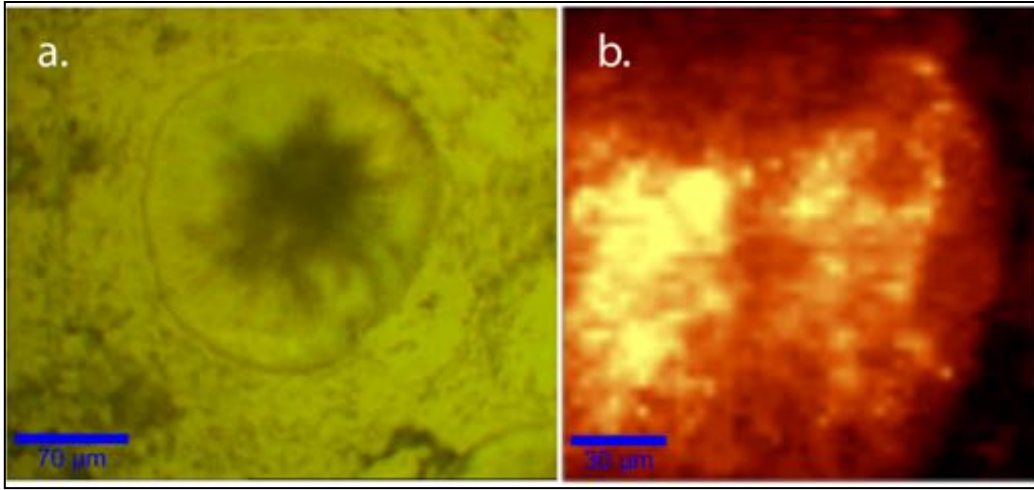
25'te fosfat grubunun, 402, 437, 476 ve 490 cm^{-1} 'de çiftli dejenere bükülme modu görülmektedir. Ayrıca, 969 cm^{-1} 'de tetrahedral fosfat grubunun simetrik gerinme modu vardır. 1034, 1064 and 1080 cm^{-1} 'deki titreşimler ise fosfat grubunun üçlü dejenere asimetrik gerinme modunu göstermektedir. Şekil 27'de ise 403, 444, and 484 cm^{-1} 'deki titreşimler, fosfat grubunun çiftli dejenere bükülme modunu belirtmektedir. 1035 and 1076 cm^{-1} 'deki titreşimler de fosfat grubunun üçlü dejenere asimetrik gerinme modunu temsil etmektedir. Tüm bunların yanısıra, hidroksil grubunun varlığını kanıtlayan Raman titreşiminin olmaması, oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin β -trikalsiyum fosfat benzeri olduğunu göstermektedir.



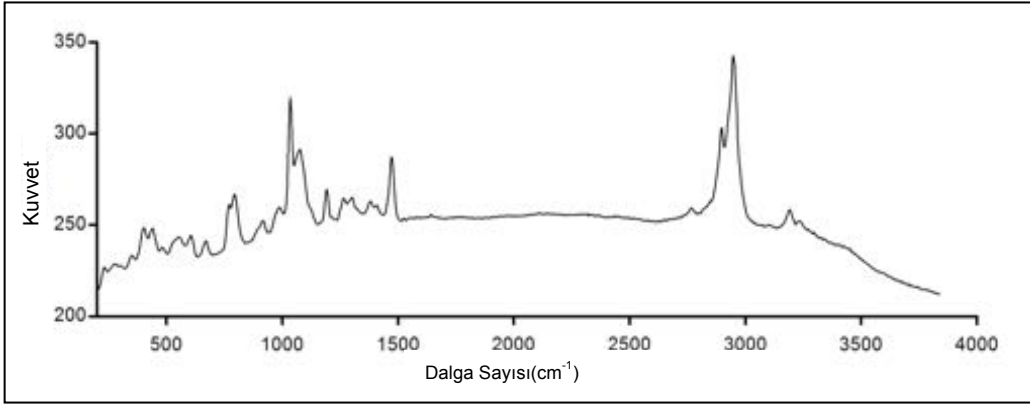
Şekil 24. 1 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin a. Optik (20X) ve b. Konfokal Raman görüntüleri.



Şekil 25. 1 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ alanda ortalama Raman spektrumları.

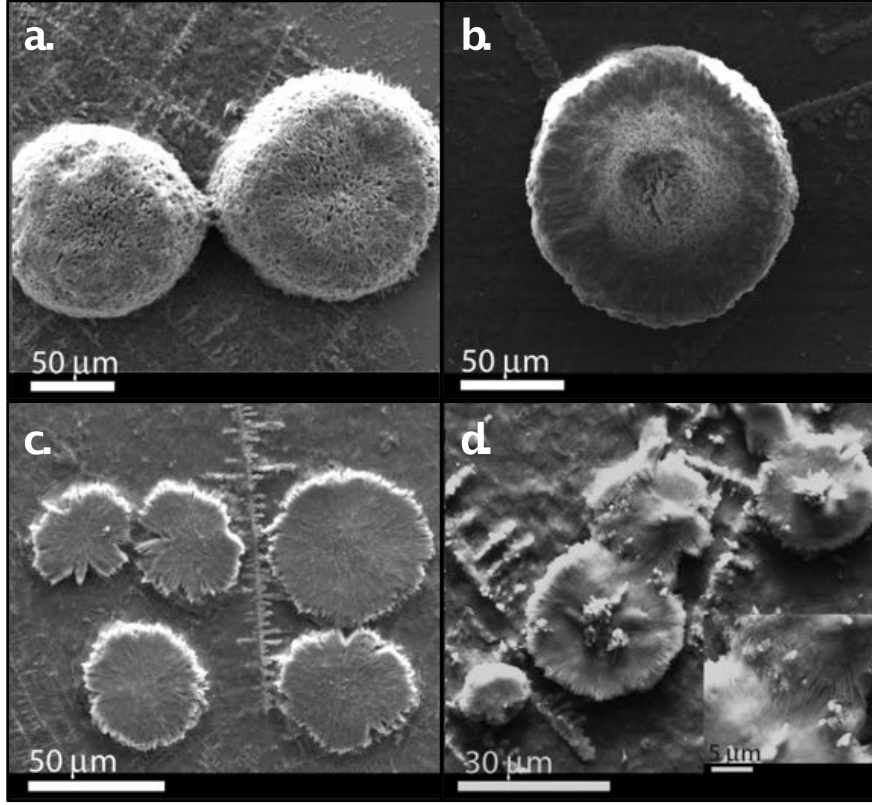


Şekil 26. 2 nolu peptit amfil ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin a. Optik (20X) ve b. Konfokal Raman görüntüleri

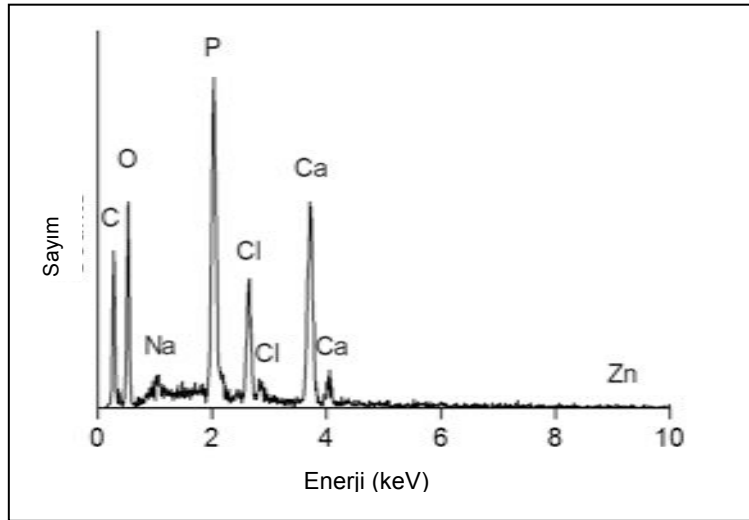


Şekil 27. 2 nolu peptit amfil ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin 150x150 μm^2 alanda ortalama Raman spektrumları.

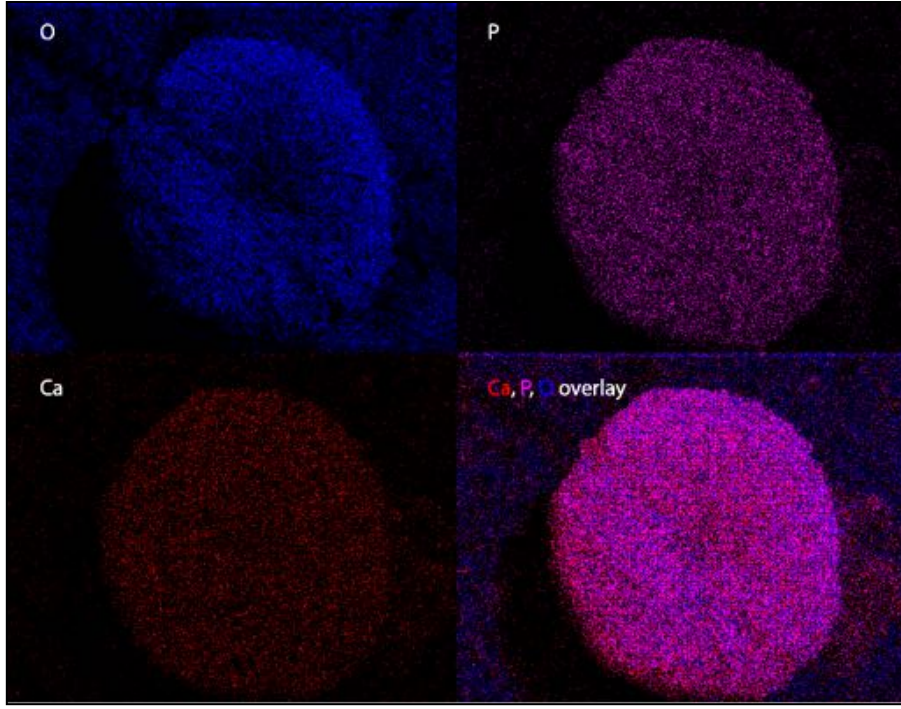
Cam yüzeylerde oluşan kalsiyum fosfat kristalleri, taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Görüntülere göre, 3. günde oluşan kalsiyum fosfat kristalleri 1. günde oluşanlardan daha büyüktür. (Şekil 28 ve 31) Zn^{II} iyonu ile kaplanmış cam yüzeylerde ise kalsiyum fosfat iyonları gözlenmemiştir. (Şekil 29) Kristallerin elementel oranları elektron kırınım spektrometresi ile karakterize edilmiştir. Bu sonuçlara göre, kristallerin Ca/P oranları 0,7'dir. (Şekil 29 ve 32) Ayrıca, kristallerin elementel haritaları da yüzeydeki Ca, P ve O yoğunluğunu ortaya koymaktadır. (Şekil 30) Ca/P oranı oluşan kristallerin dikalsiyum fosfat dehidrat olabileceğini belirtmektedir. [2]



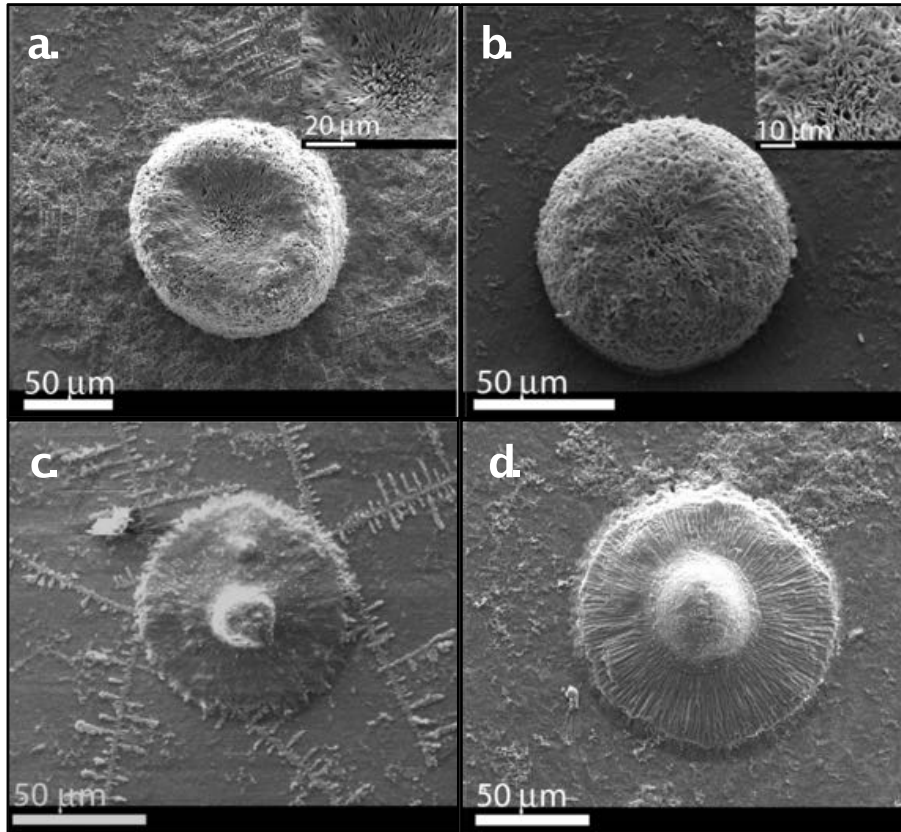
Şekil 28. a.1 nolu peptit b. 1 nolu peptit ve Zn^{II} , c. 2 nolu peptit ve d. 2 nolu peptit ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış cam yüzeylerde 1. gün sonucu oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntüleri.



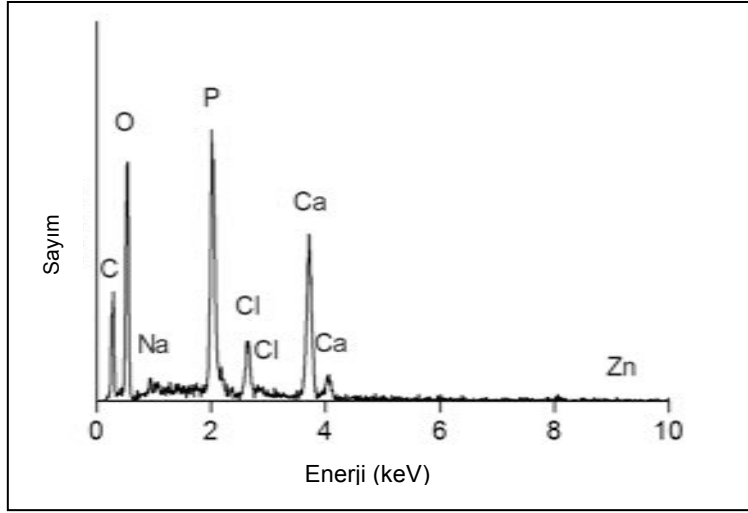
Şekil 29. 1 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin elektron kırınımı spektrumu.



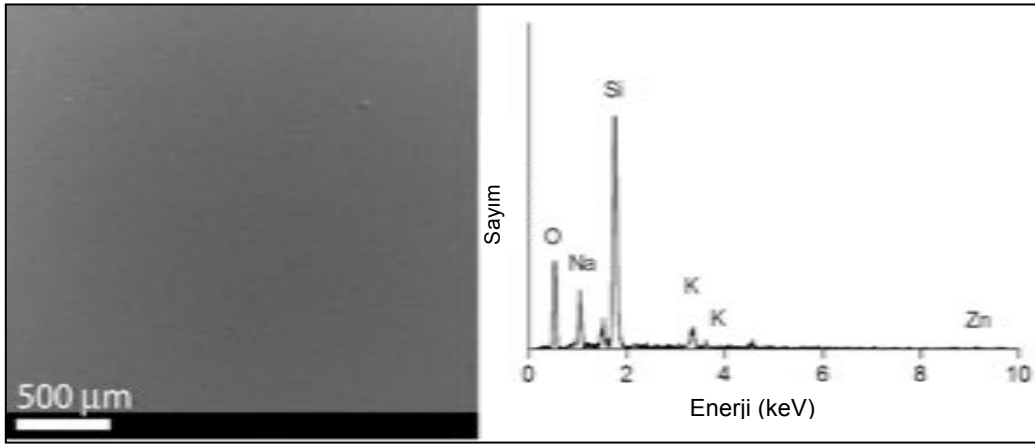
Şekil 30. 1 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristalinin elemental haritalaması.



Şekil 31. a. 1 nolu peptit b. 1 nolu peptit ve Zn^{II} iyonu, c. 2 nolu peptit ve d. 2 nolu peptit ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış cam yüzeylerde 3. gün sonucu oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntüleri.



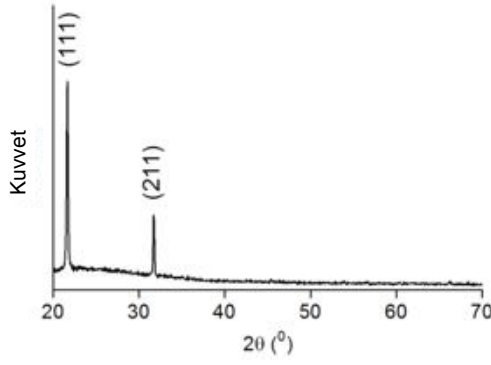
Şekil 32. 2 nolu peptit amfifil ile kaplanmış yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat kristallerinin elektron kırınımı spektrumu.



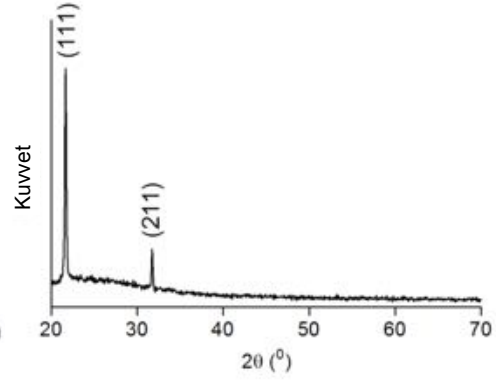
Şekil 33. Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeyin 3. gün sonucundaki taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (sol) ve elektron kırınımı spektrumu (sağ).

X-ışını kırınım spektrometresi kalsiyum fosfat katılarının oldukça yüksek kristal yapıda olduğunu göstermiştir. Oluşan kristallerdeki baskın yüzeyler ise (111) ve (211) yüzeyleridir. (Şekil 34-37)

a.

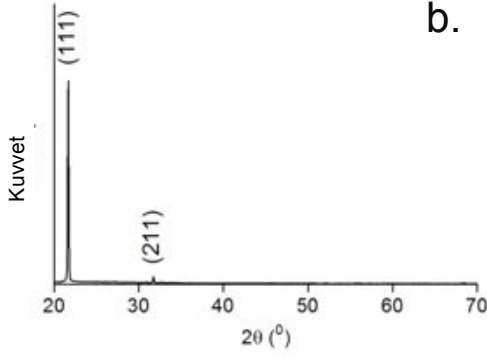


b.

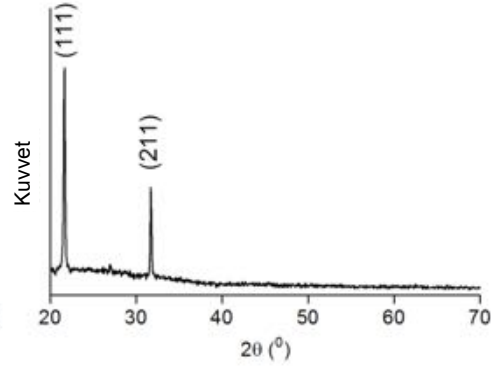


Şekil 34. a. 1 nolu peptit ve b. 1 nolu ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 1. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.

a.

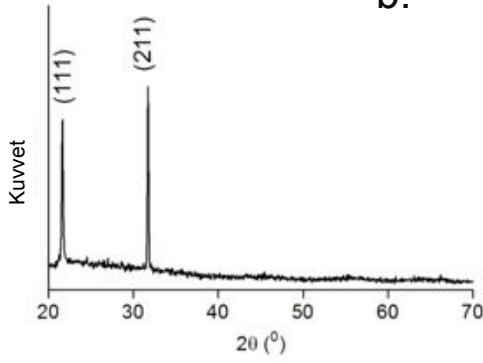


b.

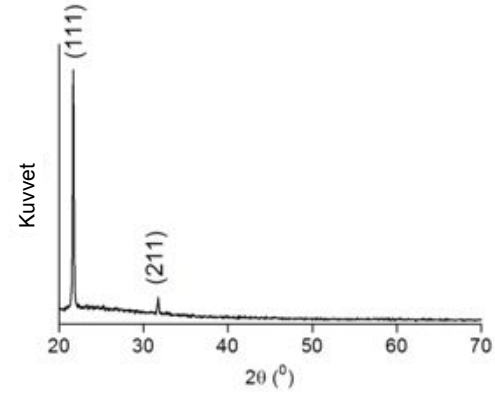


Şekil 35. a. 2 nolu peptit ve b. 2 nolu ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 1. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.

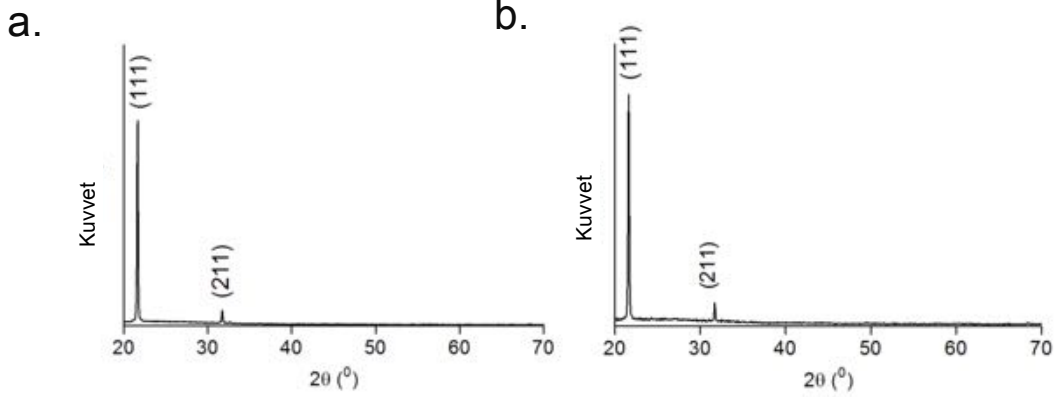
a.



b.



Şekil 36. a. 1 nolu peptit ve b. 1 nolu ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 3. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.

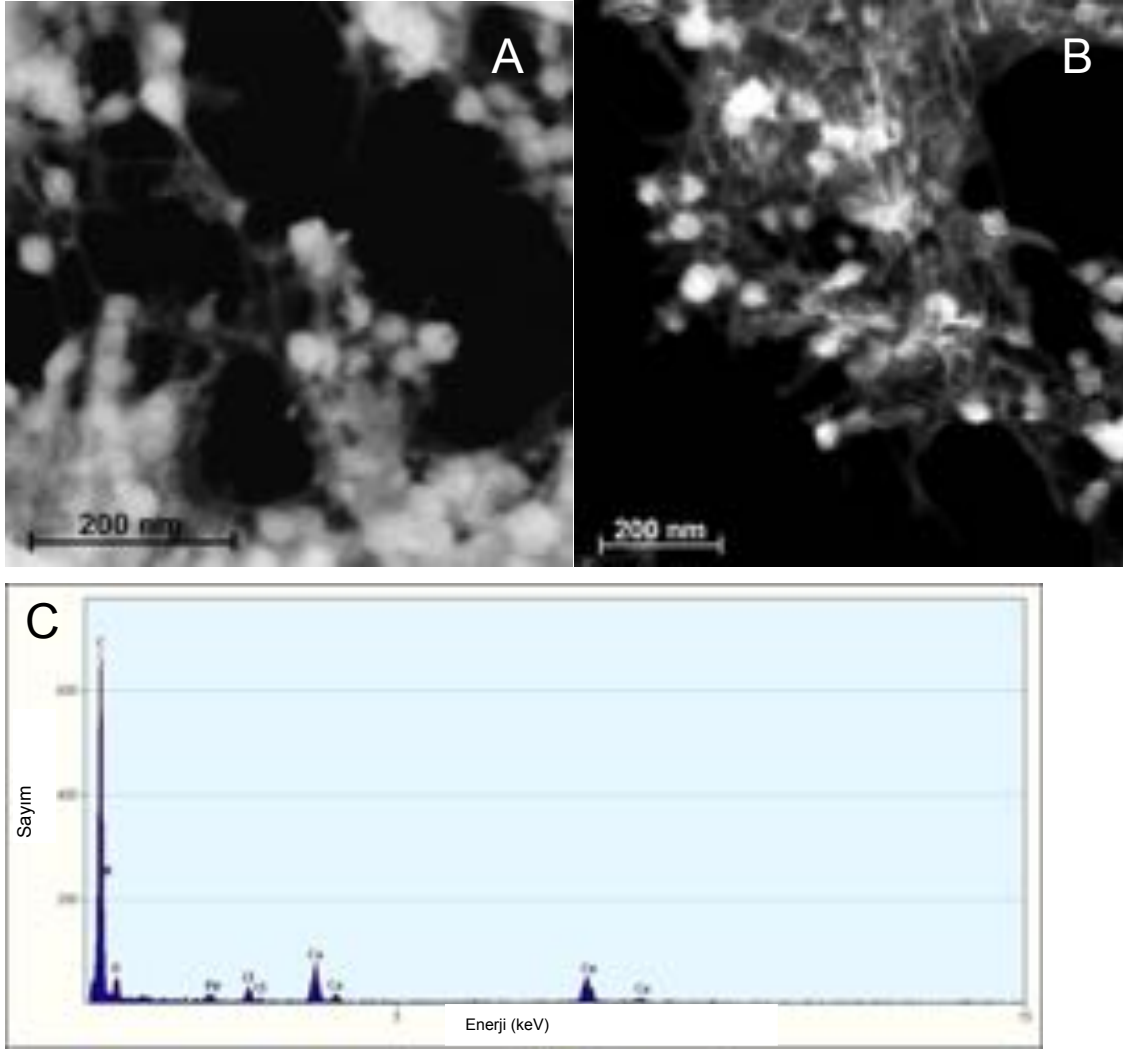


Şekil 37. a. 2 nolu peptit ve b. 2 nolu ve Zn^{II} iyonu ile kaplanmış yüzeylerin 1. gün sonundaki X-ışını kırınım motifi.

Bu aşamada malzeme sentezi, karakterizasyonu ve enzimatik özellikleri takiben nanoyapıların mineralizasyonu ve depozit edilen minerallerin kristal yapıları çalışılmıştır. Mineral birikimi mikroskop görüntülemeleri ile gösterilmiş ve elemental analiz (EDX) yöntemi ile oluşan mineralin kalsiyum fosfat olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, oluşan kristallerin kalsiyum ve fosfat dağılım haritalaması Raman spektrometresi yöntemiyle yapılmış ve bu yolla minerallerin içindeki element dağılımı gösterilmiştir. Oluşan kristallerin birikme karakterleri X-ışını kırınım motif yöntemi ile belirlenmiş ve hidroksiapatitin literatürdeki kırınım dataları ile uyumlu paternler bulunmuştur. (JSPDS card no 73-0293)

3.6 Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-ışını Analizi (SEM/EDX)

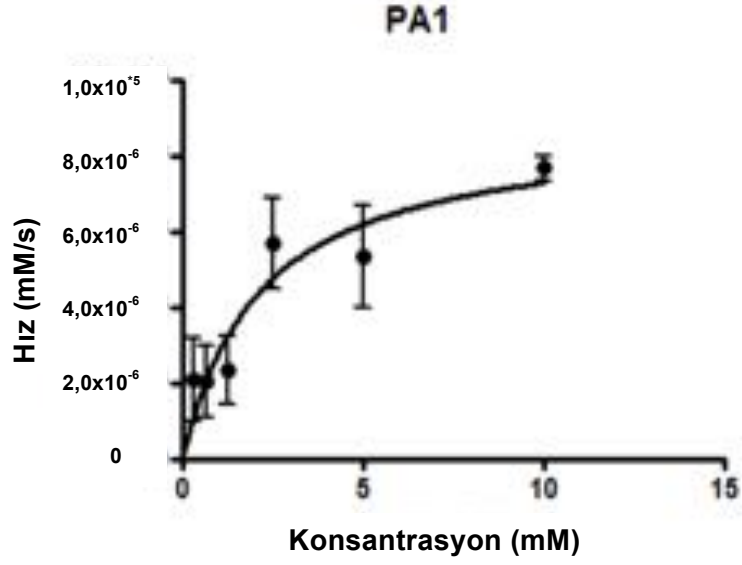
1 ve 2 nolu peptit amfifillerin pH 7,4'te oluşturdukları 3 boyutlu nanoyapılar ve organik fosfat ve kalsiyum iyonu varlığında oluşturdukları CaP nodulleri, geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 38'de, oluşan peptit amfifil nanofiberleri ve CaP nodülleri görülmektedir.



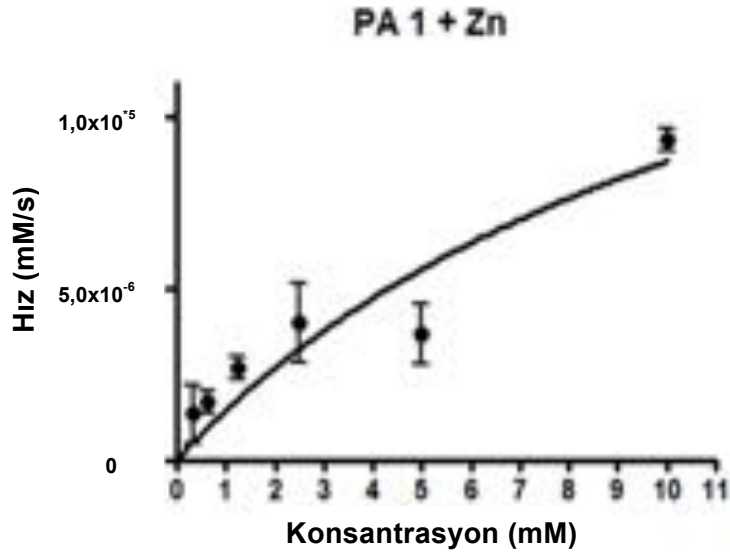
Şekil 38. A. 1 ve B. 2 nolu peptit amfifiler üzerindeki CaP birikiminin geçirimli electron mikroskobu ile çekilen mikrografları C. CaP nodüllerinin EDX'le elemental analizi.

3.7 Enzim Kinetiği Hesaplaması (p-nitrofenil fosfat sübstratı ile)

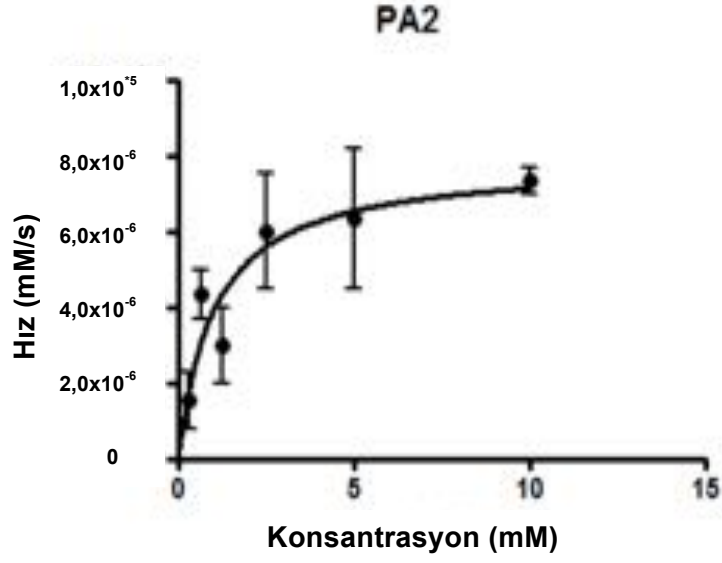
Hidroliz deneylerinde Zn^{II} iyonu varlığında ve yokluğunda peptit amfil moleküllerinin Michealis-Menten denkleminde uyduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 39-42) Böylece, peptit amfil moleküllerinin enzimatik aktiviteleri olduğu düşünülmektedir. Sadece p-nitrofenil fosfat hidrolizi de doğrusal regresyondadır. (Şekil 43) Hidroliz deneylerine ait veriler Tablo 6'da özetlenmiştir.



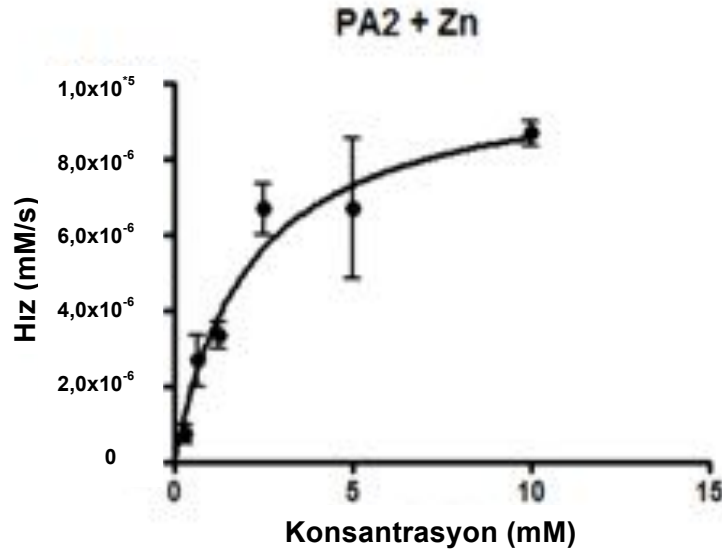
Şekil 39. 1 nolu peptit amfil varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.



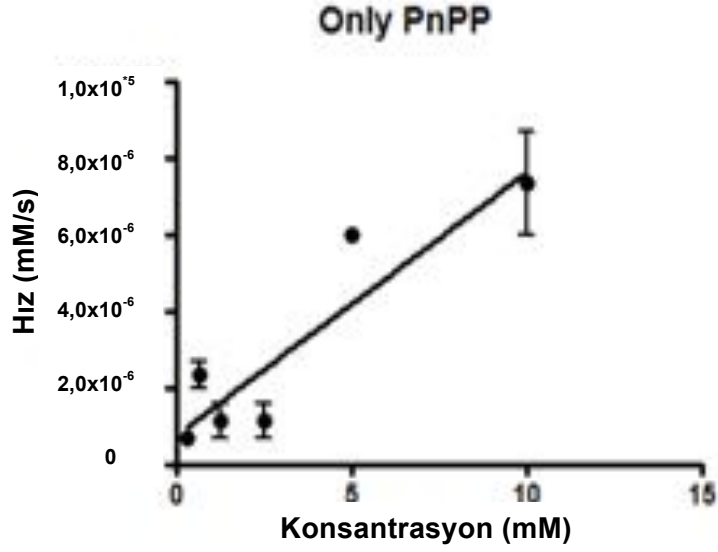
Şekil 40. 1 nolu peptit amfil ve Zn^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.



Şekil 41. 2 nolu peptit amfifil varlığında p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.



Şekil 42. 2 nolu peptit amfifil ve Zn^{II} iyonu varlığında p-nitrofenil fosfat hidroliz kinetiği.



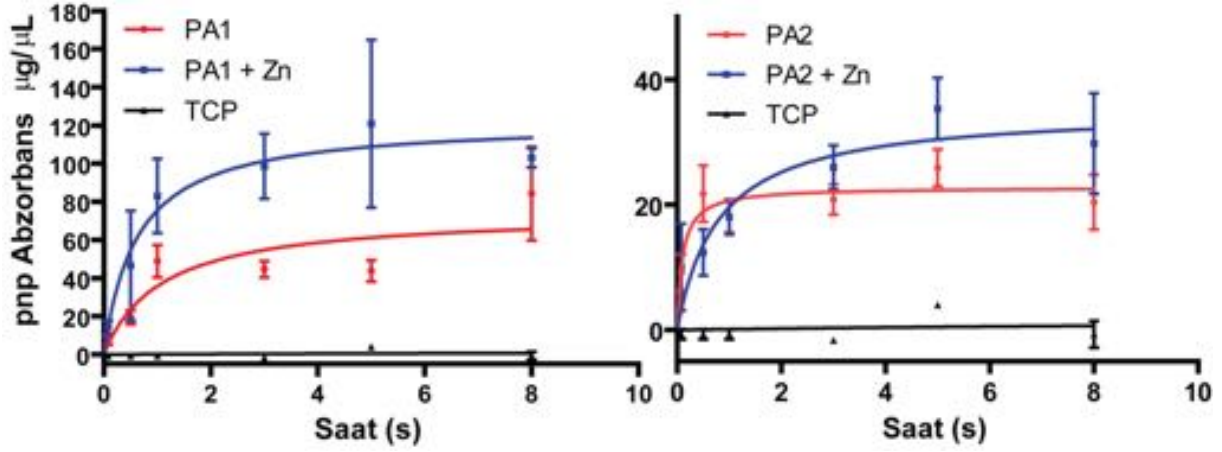
Şekil 43. p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.

Tablo 6. p-nitrofenil fosfatın hidroliz kinetiği.

Kullanılan Katalizör	Vo (mM/s)	K _m (mM)	k _{cat} (1/s)
PA1	8,842x10 ⁻⁶	2,146	8,84x10 ⁻²
PA1 + Zn	1,993x10 ⁻⁵	2,89	1,99x10 ⁻¹
PA2	7,861x10 ⁻⁶	1,15	7,86x10 ⁻²
PA2 +Zn	1,035x10 ⁻⁵	2,098	1,04x10 ⁻¹
Only PnPP	6,240x10 ⁻⁷		

3.8 Peptit Yüzeyler üzerinde Hidroliz Analizi

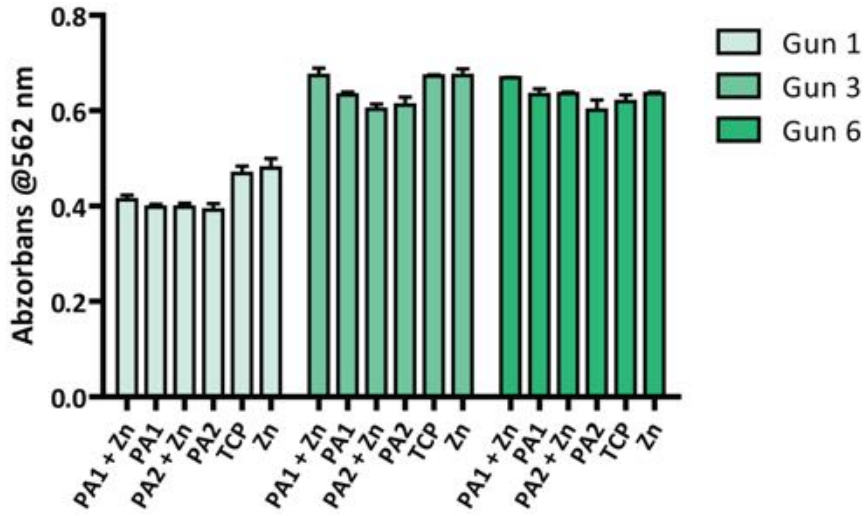
Bu deneyde peptitler solüsyon içinde değil, hücre tabaklarının yüzeyinde, SEM ve hücre deneylerinin yapıldığı koşullarda yapılmıştır. Yüzeyde yoğun peptit nanofiber varlığı p-nitrofenilin hidrolizini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Solüsyon içindeki sonuçlarda olduğu gibi 1 numaralı peptit nanofiber sistemlerin daha iyi çalıştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 44. p-nitrofenil fosfatın peptit kaplı yüzeyler üzerinde zamana bağlı hidrolizi.

3.9 Peptit Yüzeyler üzerinde SaOS-2 Hücrelerinin Canlılık Analizi

Alamar blue boyaması ile yapılan canlılık analizine göre, peptitlerin hücre deneyleri için herhangi bir toksik etkisi olmadığı, 1-3 ve 6 günler için kontrol edilmiştir. Farklılaşmaya başlayan hücrelerin 3. günden sonra çoğalmadığı gözlemlenmiştir. Hücrelerin çoğalmaması beklenen bir sonuçtur ve aynı zamanda bir farklılaşma göstergesidir.

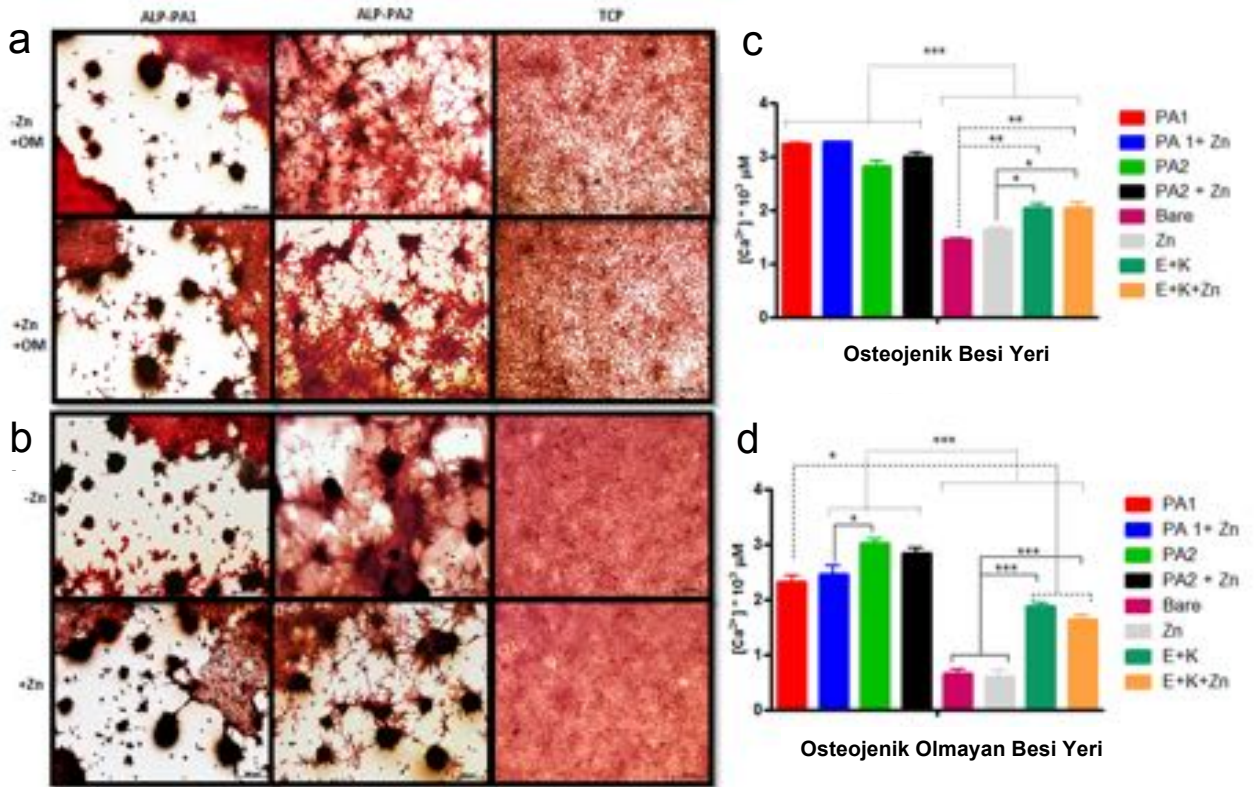


Şekil 45. Peptit amfifiller üzerindeki hücrelerin canlılık analizi.

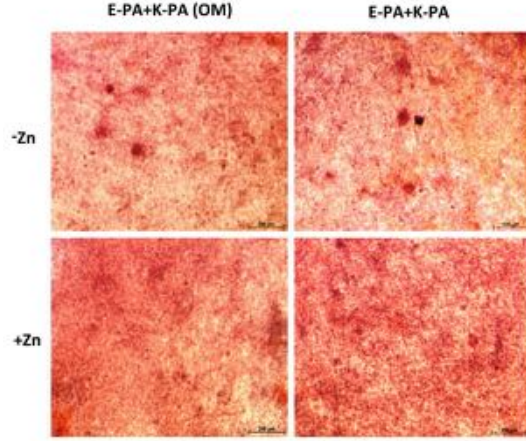
3.10 SaOS-2 Alizarin Kırmızı Boyaması Görüntüleme ve Biriken Kalsiyum Miktarının Saptanması

Osteoblast benzeri hücrelerin mineral biriktirme becerilerini test etmek amacıyla, Zn^{II} varlığında ve yokluğunda Alizarin Kırmızısı boyaması uygulanmıştır. Alizarin Kırmızısı Ca⁺² iyonunu şelat eder ve bu boyama mineralizasyon için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

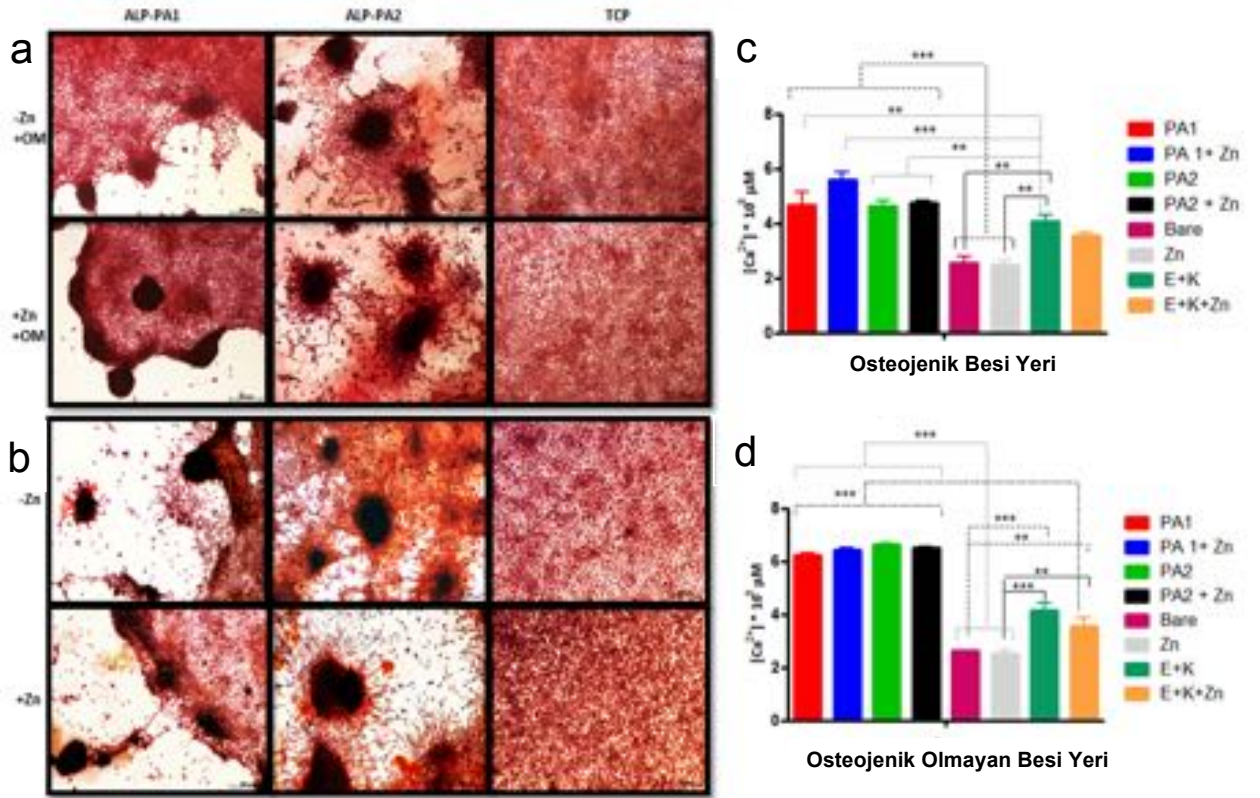
Mineralize nodül oluşumu öncesinde, osteoblastların göç ve agregat oluşturması önceden gösterilmiştir. Osteojenik besi yeri (β -gliserofosfat-askorbik asit-deksametazon) ile veya osteojenik olmayan sadece β -gliserofosfat içeren besi yeri ile 3 ve 6 gün boyunca inkübe edilen Saos-2 hücreleri alkaline fosfataz benzeri peptit nanofiberleri üzerinde mineralize kemik-benzeri nodüller oluşturmuşlardır (Şekil 46-48). Bununla birlikte, nanofiber içermeyen hücre kültürü tabaklarında nodül oluşumu gözlenmemiştir. Kontrol grubu olarak üzerinde imidazol aktif grubu bulundurmayan sadece yük etikleşimini sağlayarak fiber oluşturan glutamik asit eklenmiş E-PA (Lauryl-VVAG-E) ve lizin eklenmiş K-PA (Lauryl-VVAGK-Am) karıştırılarak oluşan nanofiberler (E+K) kullanılmıştır. Bu kontrol fiberleri üzerinde kültürlenmiş hücreler ile karşılaştırıldığında, ALP benzeri nanofiberler üzerinde daha çok mineralize nodüller oluşmuştur ve osteojenik destek olmadan da CaP birikimi, nodüllerin oluşumu gözlemlenmiştir. Mineralize nodül oluşumu osteojenik destek varlığında ve yokluğunda gözlenmiştir. Bununla birlikte, mineralize nodül oluşumu 6 gün sonunda, PA kaplı olmayan kontrol yüzeylerde gözlenmemiştir.



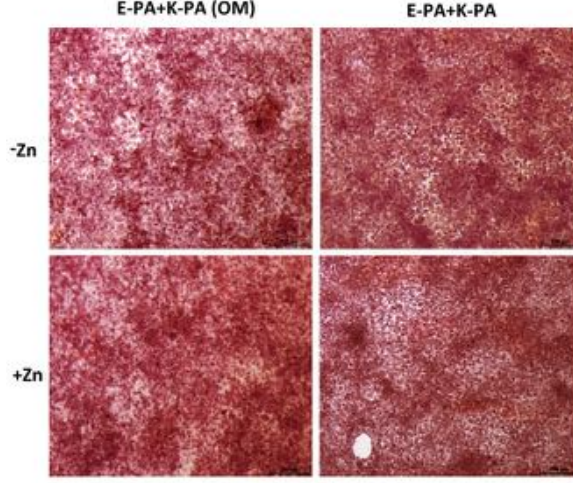
Şekil 46. Alkaline Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde a. Osteojenik besi yeri varlığında b. sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyaması c. d. Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak kalitatif analizi.



Şekil 47. Kontrol grubu E-PA ve K-PA peptitler üzerinde a. Osteojenik besi yeri varlığında b. sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyaması.



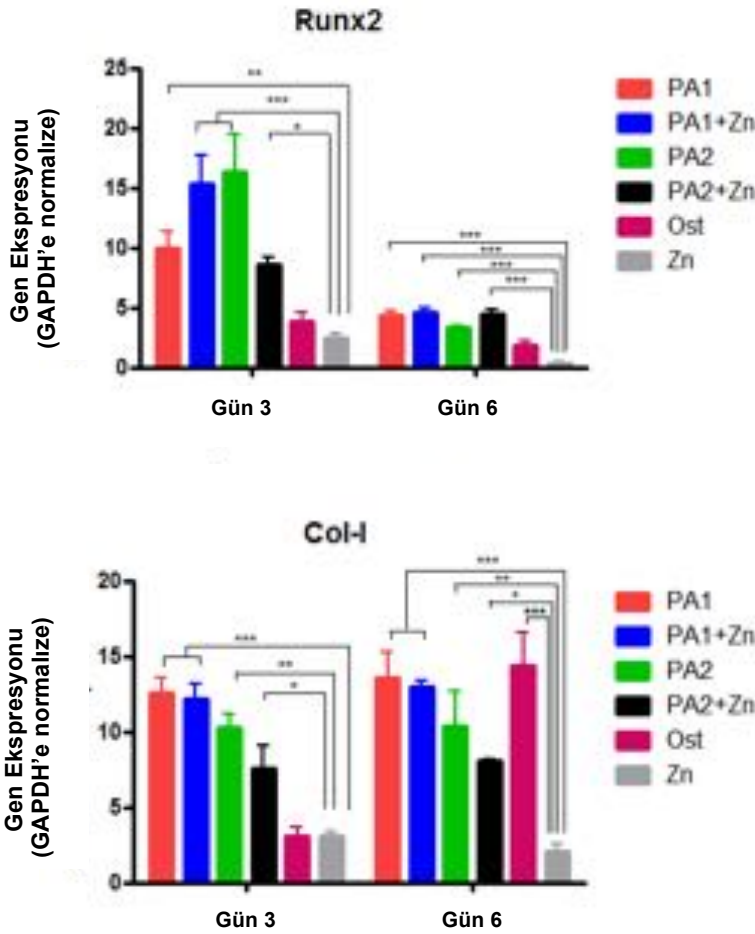
Şekil 48. Alkalın Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde a. Osteojenik besi yeri varlığında b. sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyaması c. d. Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak kalitatif analizi.



Şekil 49. Kontrol Grubu E-PA ve K-PA peptitler üzerinde a) Osteojenik besi yeri varlığında b) sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyaması.

3.11 Kemige Özgü Gen Expresyon Analizleri

Saos-2 hücrelerin peptit nanofiberlere olan tepkisi osteojenik besi yeri varlığında ve yokluğunda takip edilmiştir. Runx2 gen ekspresyon açısından 3. günde peptit olmayan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli derecede farklılık göstermiştir. Runx2 nun hücrelerin kemik hücrelerine transformasyonunun erken markerı olması sebebi ile 3. günde gözlemlenen artış, Saos-2 hücrelerinin osteoblast hücrelerine dönüşmeye başladığı anlamına gelmektedir. Çalışmanın 6. gün sonuçları analiz edildiğinde gen ifadesinin azalmış olduğu görülmüştür. Bunun sebebi kullanılan markerın erken aşamalarda farklılaşmaların göstergesi olmasıdır, osteoblastların olgunlaşmaya doğru gittiği ileriki aşamalarda ifadesinin azalması beklenen bir sonuçtur. Aynı şekilde Kollajen-I ekspresyonunda kontrol gruplarına göre arttığı gözlemlenmiştir. Hücrelerde Kollajen-I birikimi kemik oluşumu için önemli bir parametredir. Bu yüzden artışının istatistiksel farklar ile gözlemlenmesi önemli bir sonuçtur. 6. güne gelindiğinde Runx2 dan farklı olarak yalnızca osteojenik destek bulunan kontrol grubunda Kollajen-I birikiminde artış gözlemlenmiştir. Bu sonuç literatürdeki çalışmalarla paralel olarak, osteojenik besi yerinin etkisinin 7. günden sonra görülmeye başladığı sonucunu desteklemektedir. Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan peptit amfifillerin osteojenik destek olmadan, osteojenik destek olan kontrol grubuna nazaran daha erken bir aşamada kemik oluşumu sürecine girdiği gözlemlenmiştir. Başka bir deyişle kullanılan peptitlerin kemik oluşumunu hızlandırıcı bir etkisi mevcuttur.

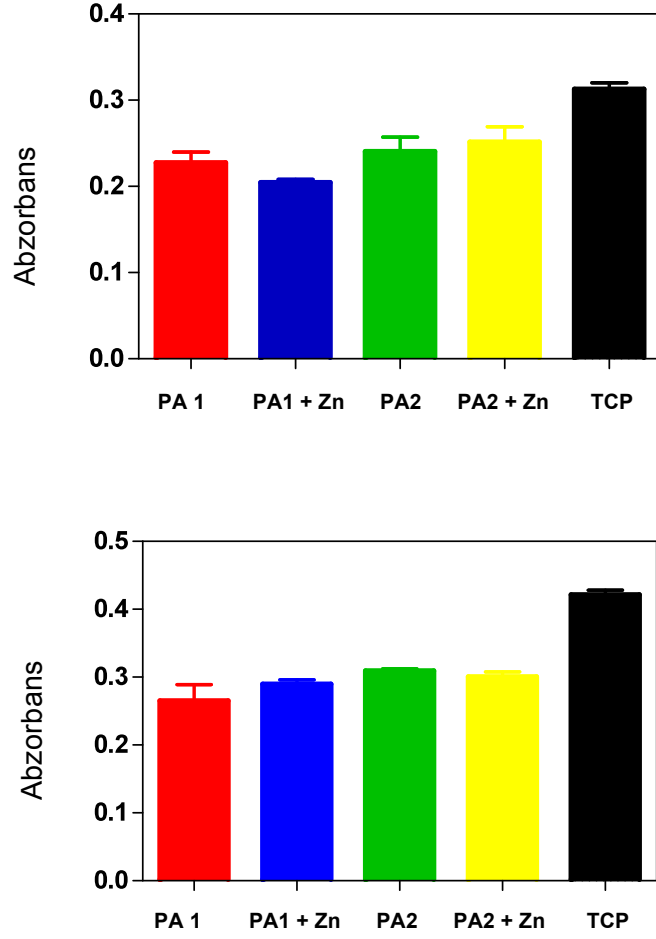


Şekil 50. 3.ve 6. günlerde osteojenik destek olmadan peptit üzerinde kemiğe özgü genlerin ifade analizleri.

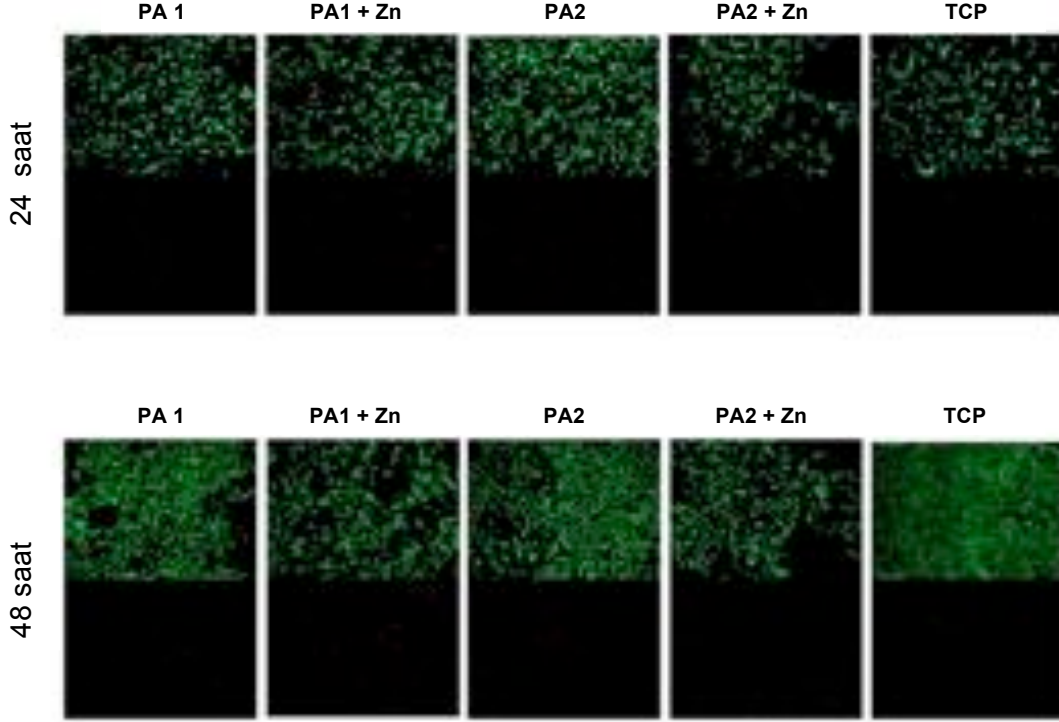
3.12 Peptit Yüzeyler üzerinde rMKH'lerin Canlılık Analizi

In vitro hücre deneyleri öncesi hücrelerin kullanılacak sentetik maddeye göstereceği reaksiyon ve toksisite öyküleri öncelikli olarak kontrol edilmelidir. Bu nedenle SaOS-2 hücrelerinde olduğu gibi ilk olarak peptit kaplı yüzeylerin rMKH'lerin canlılığına olan etkisi test edilmiştir. Alamar Blue boyaması ile yapılan canlılık analizine göre, peptitlerin bu hücrelerin canlılıklarına negatif etkisi olmadığı, 1, 3 ve 6. günler için kontrol edilmiştir (Şekil 51). Peptit ortamına konulan hücrelerin çoğalmadığı gözlemlenmiştir ve calcein boyaması ile hücrelerin hala canlı olduğu onaylanmıştır. Calcein boyaması hücrelerin canlılığını görselleştirmek açısından önemli bir yöntemdir ve Şekil 52'de gösterildiği gibi yeşille boyanan hücreler canlılıklarını hala devam ettirmektedirler ve ölü hücreleri temsil eden az miktarda kırmızı boyamalar da gözlemlenmiştir. Bu oran sentetik ortamlarda özellikle kök hücre gibi birçok hücreye dönüşme potansiyeli bulunduran hücreler için kabul edilebilir düzeydedir. Bunun

yanında hücrelerin çoğalmaması farklılaşma göstergesi olabileceği için, hücrelerin çok erken kemik hücresi dönüşümüne başlaması göz önünde bulundurularak, beklenen bir sonuçtur.



Şekil 51. Çinko varlığında ve yokluğunda PA nanofiberleri üzerinde 24 saat (altta) ve 48 saat (üstte) Alamar blue hücre canlılık deneyi.



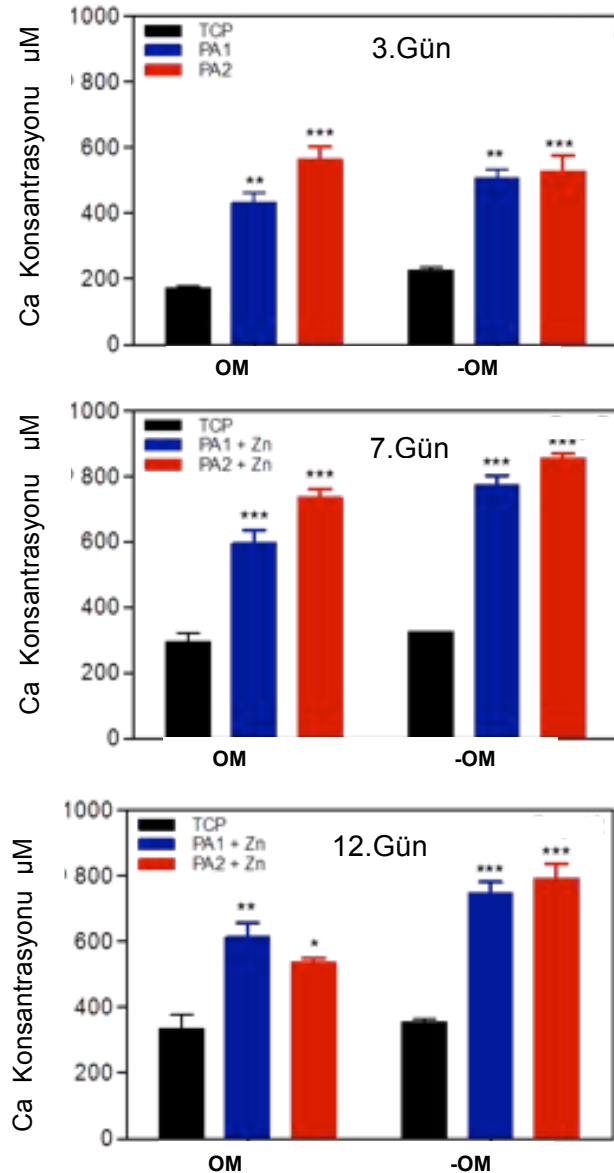
Şekil 52. Çinko varlığında ve yokluğunda PA molekülleri üzerinde rMKH lerin 24 saat (üstte) ve 48 saat (altta) Calcein Ethidium Bromür boyaması ile ölü ve canlı hücrelerin görsel analizi.

3.13 rMKH Alizarin Kırmızı Boyaması Görüntüleme ve Biriken Kalsiyum Miktarının Saptanması

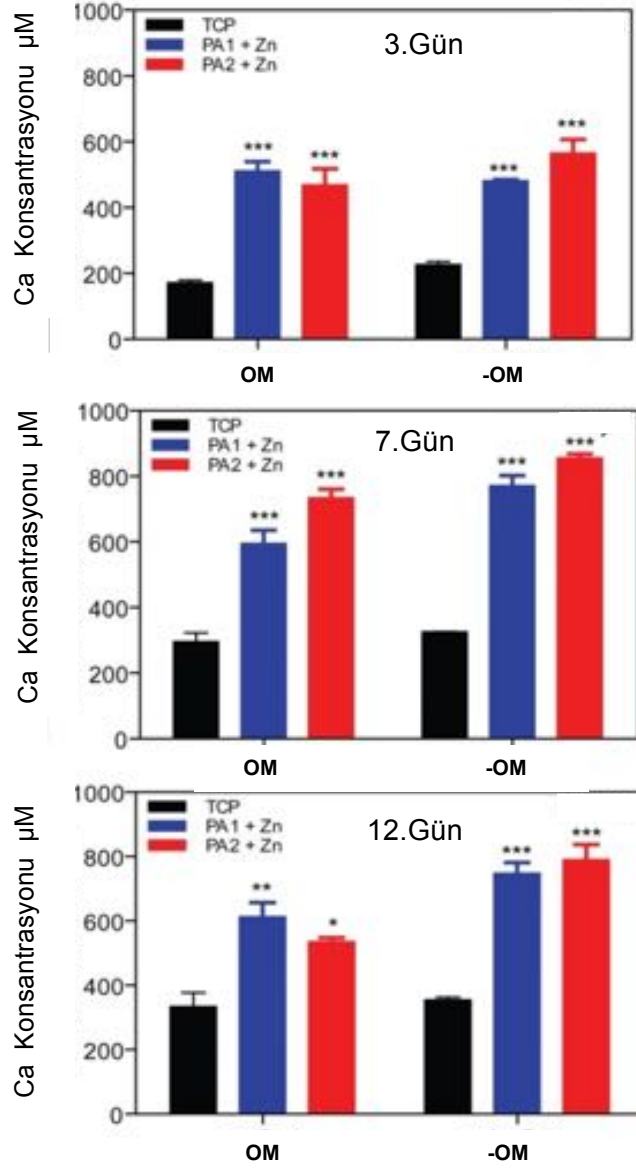
Hücre yüzeyindeki kalsiyum fosfat birikimi hücrelerin osteoblasta başkalaşmasının en önemli göstergelerinden biridir ve kemiğin yapı taşlarını oluşturur. Ortamda kalsiyum ve fosfat iyonlarının artması bu sürecin devamını sağlamasının yanında, önemli bir destek olarak da görev yapar. Dönüşüm sürecinin başlangıcında sentezlenen alkalın fosfataz proteini fosfat iyonunun ortamda artmasını sağlamaktadır. Bizim projemizde ortama konulan alkalın fosfataz benzeri yapılar tıpkı doğal ALP'deki gibi inorganik iyon artışını destekleyerek, hücrelerin kemik hücrelerine dönüşümünü sağlayan gen bazındaki yolakların ve mekanizmaların açılmasını hızlandırmaktadır. Osteoblasta dönüşen hücrelerin mineral biriktirme becerilerini test etmek amacıyla, Zn^{II} varlığında ve yokluğunda Alizarin Kırmızısı boyaması uygulanmıştır. Alizarin Kırmızısı Ca^{+2} iyonunu şelat eder ve bu boyama mineralizasyon için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Mineralize nodül oluşumu öncesinde, osteoblastların göç ve agregat oluşturması önceden gösterilmiştir. Osteojenik besi yeri (β -gliserofosfat-askorbik asit-deksametazon) ile veya osteojenik olmayan sadece β -gliserofosfat içeren besi yeri ile 3, 7 ve 12 gün boyunca inkübe edilen rMKH'leri alkalın fosfataz benzeri peptit nanofiberleri üzerinde kalsiyum fosfat

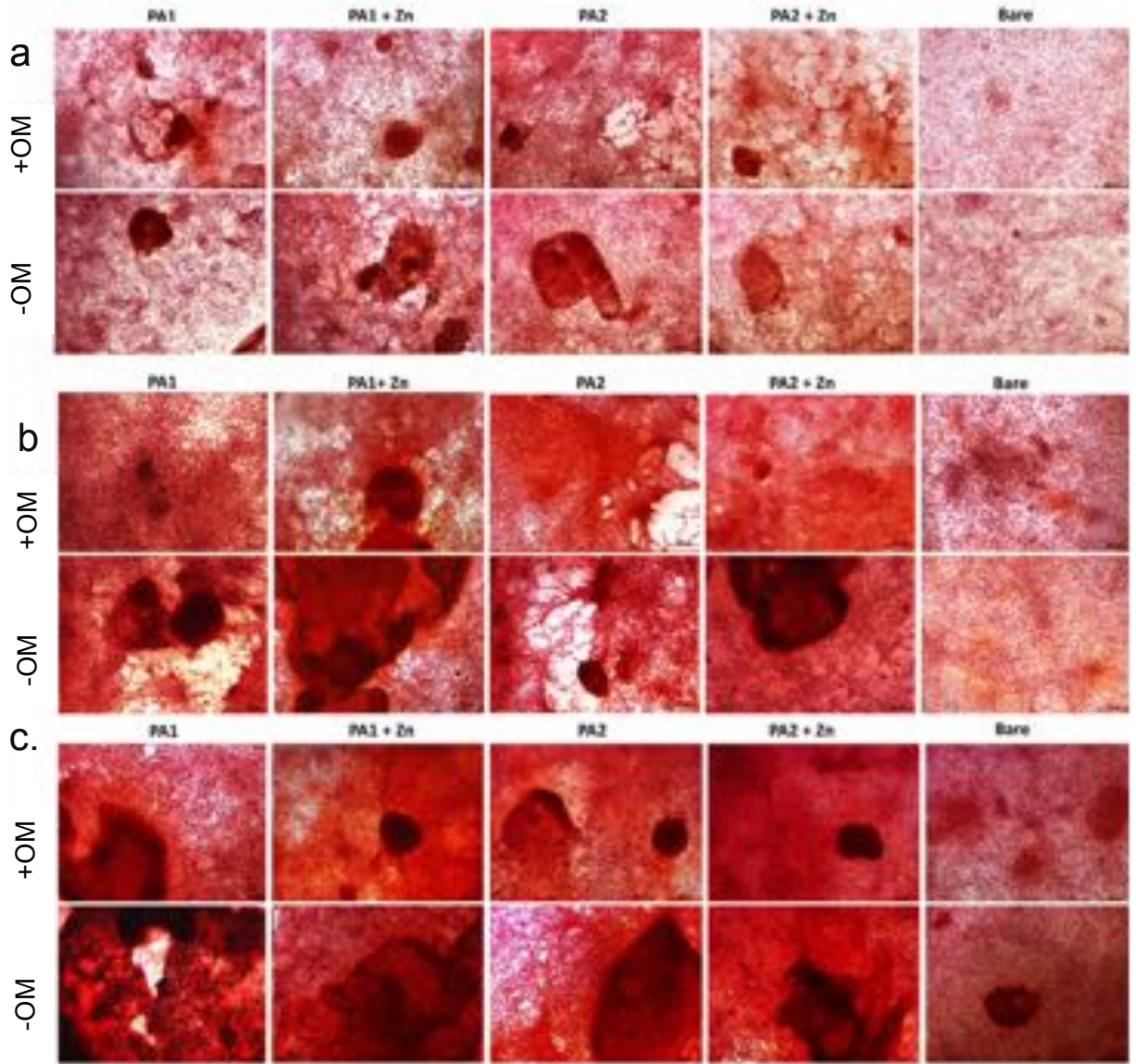
depozisyonuna bağılı olarak mineralize kemik-benzeri nodüller oluşturmuşlardır (Şekil 53-54). Hücrelerin ve nodüllerin kırmızıya boyanması hücreler üzerindeki kalsiyum birikimini ifade etmektedir. Cetylpyridinium kullanılarak hücre yüzeyindeki kalsiyumlara tutunan boyalar çözünebilir hale getirildikten sonra absorpsiyon spektrası gruplar arasında kantitatif karşılaştırma yapabilmek için ölçülmüştür. Bu ölçümler sonunda, nanofiber içermeyen hücre kültürü tabaklarında nodül oluşumu gözlenmemiştir. Peptit yapılar üzerinde mineralize nodül oluşumunun osteojenik destek varlığında ve yokluğunda gözlenmesi dikkate değer bir sonuçtur. Osteojenik destek özellikle kök hücre çalışmalarında önemli bir yer teşkil etmektedir. Kök hücrelerin başka hücre tiplerine çoklu başkalaşım kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda bu tarz destek solüsyonlarının kullanılması, kök hücrelerin kemik hücrelerine başkalaşımı için gereklidir. Burada kullandığımız peptit sisteminde bu desteklere ihtiyaç kalmadan hücrelerin kemik hücrelerine başkalaşımı ve kalsiyum fostat birikimi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre peptit sistemlerin kemik rejenerasyon kapasiteleri kök hücreler kullanarak da kanıtlanmış olmuştur.



Şekil 53. Alkalın Fosfataz Benzeri peptitler üzerinde sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak 3, 7, 12. gün kalitatif analizi.



Şekil 54. 25 μ M Zn ile desteklenmiş Alkalın Fosfataz benzeri peptitler üzerinde sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamalarının cetylpyridinium kullanılarak 3., 7. ve 12. günde kantitatif analizi.



Şekil 55. Alkalın Fosfataz benzeri peptitler üzerinde sadece β -gliserofosfat varlığında Alizarin kırmızı boyamasının kalitatif mikroskop analizleri.

3.14 rMKH Kemiğe Özgü Gen İfade Miktarı Analizleri

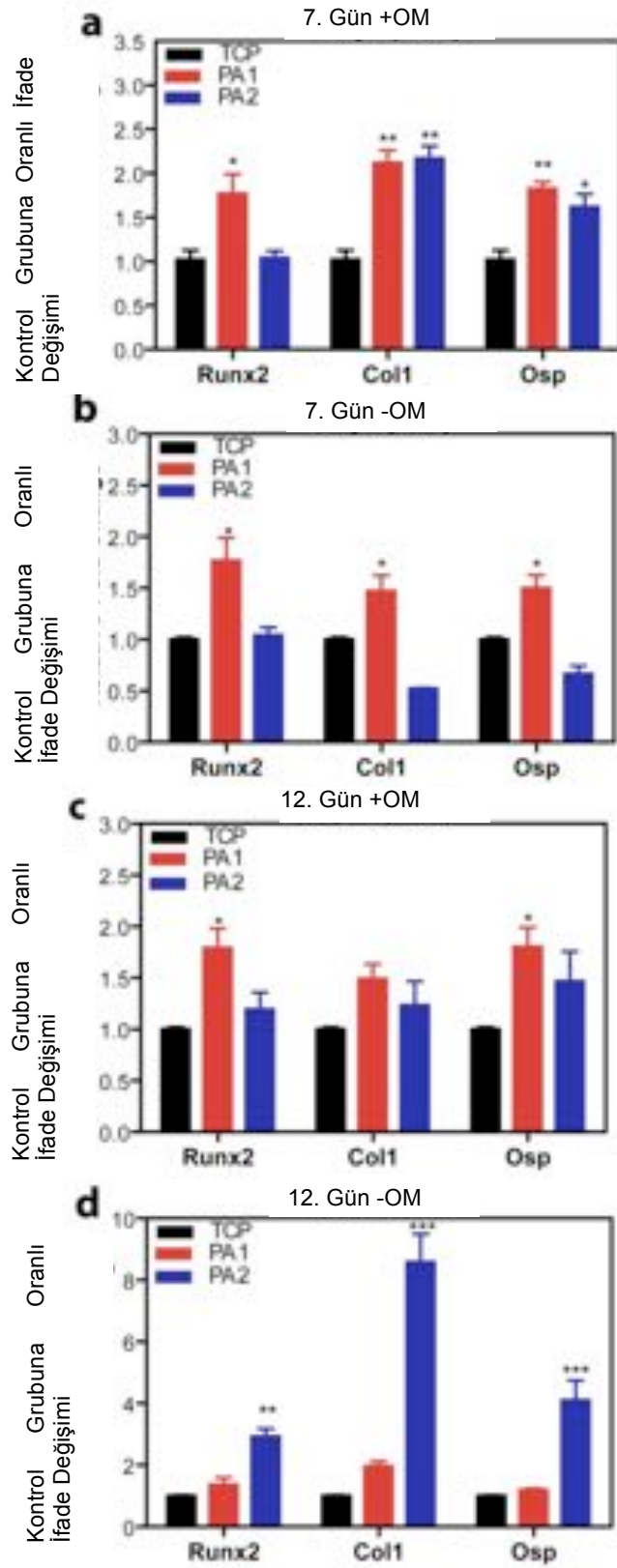
Projenin bu kısmında rMKH'lerin kemik hücrelerine dönüşümünde peptit nanofiberlerin etkisi osteojenik besi yeri varlığında ve yokluğunda kRT-PZR yöntemi ile incelenmiştir. Runx2 gen ekspresyon açısından 3. ve 7. günlerde peptit olmayan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak az miktarda farklılık göstermiştir. Runx2'nun hücrelerin kemik hücrelerine başkalaşımının erken markörü olması sebebi ile bir hafta içinde gözlemlenen artış, rMKH hücrelerinin osteoblast hücrelerine dönüşümünün başlangıcı olarak kabul edilebilir. Runx2 kemik oluşumunda rol alan birçok önemli genin (kolajen I ve osteopontin gibi) regülasyonunda önemli rol oynamasından dolayı erken aşamada ifadesi artan önemli bir

faktördür. Bu faktörün artış göstermesi diğer genlerin ekspresyonu açısından önemli bir durum teşkil etmektedir. Çalışmanın 12. gün sonuçları analiz edildiğinde gen ifadesinin yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmüştür, Runx2'nun ekspresyonunun devam ediyor olması hücrenin farklılaşmasını tamamlaması açısından gerekli olduğunu göstermektedir. Runx2 ifadesi, SaOS-2 hücreleri kullanılarak yapılan analizlerde olduğu gibi azalmak yerine, farklılaşma sürecinde sabit kalmıştır. Bunun en birincil sebebi kök hücrelerin başkalaşmalarının daha uzun periyotlarda olmasıdır ve osteoblastların olgunlaşmaya doğru gittiği ileriki aşamalarda ifadesinin azalması beklenen bir sonuçtur.

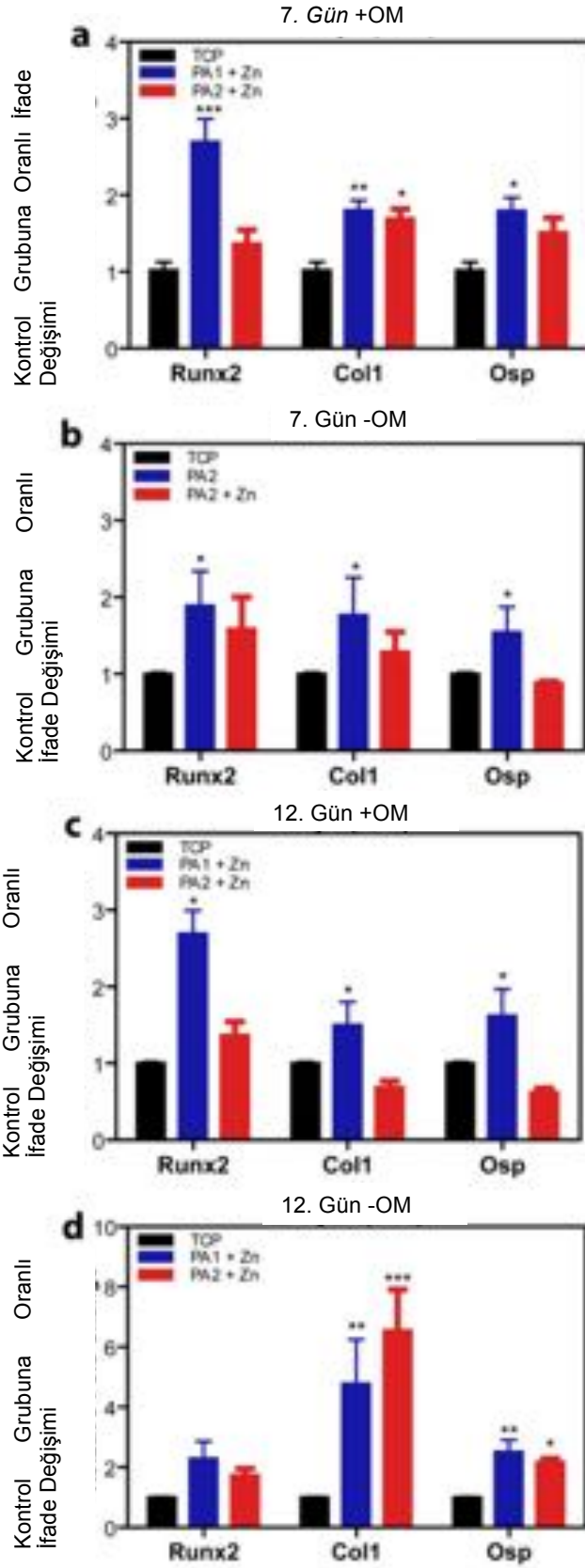
Aynı şekilde Kolajen-I ekspresyonunun da kontrol gruplarına göre arttığı gözlemlenmiştir. Hücrelerde Kolajen-I birikimi kemik oluşumu için önemli bir parametredir. Bu yüzden artışının istatistiksel farklar ile gözlemlenmesi önemli bir sonuçtur. 12. güne gelindiğinde Kolajen-I ifadesi özellikle PA2 molekülü için dikkate değer şekilde artmıştır. PA molekülüleri, rMKH'lerle yapılan gen ifadesi analizlerinde farklılıklar göstermişlerdir, erken aşamada PA1 molekülü daha iyi görünürken 12. güne gelindiğinde PA2 molekülü önemli bir artış göstermiştir. PA2 molekülünün PA1'e göre daha yavaş hidroliz göstermesinde daha kontrollü dozda inorganik fosfat sağlayarak gecikmiş ama etkili bir sonuç veriyor olmasının etken olması mümkündür. Ek olarak 12. günde tüm gruplarda görülen artış, literatürdeki çalışmalarla paralel olarak, osteojenik besi yerinin etkisinin 7 günden sonra görülmeye başlandığı sonucunu desteklemektedir.

Erken markörlere ek olarak, osteoblastların geç aşamalarında ifade edilen osteopontin (OP) geni de kRT-PZR metodu ile analiz edilmiştir. Kolajen-I ile tutarlı olarak, OP ifadesinde 12. günde istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Osteopontin hücrenin kemik hücrelerine olgunlaşmasının son aşamasında hücre dışına verilerek CaP minerallerine bağlanarak mineral birikimini ve kemik farklılaşmasını sonlandırır. Bu yüzden osteopontin hücrelerin olgunluğunu test edebilmek için gerekli bir gendir. Hücre modelimizde OP görülmesi, hücrelerin olgunlaşma yolunda olduğunun göstergesidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan peptit amfillerin osteojenik destek olmadan, osteojenik destek olan kontrol grubuna paralel olarak kemik oluşumu sürecini farklılaşması daha zor olan kök hücrelerde desteklediği gözlemlenmiştir. Başka bir deyişle kullanılan peptitlerin kemik oluşumunu hızlandırıcı bir etkisi mevcuttur.



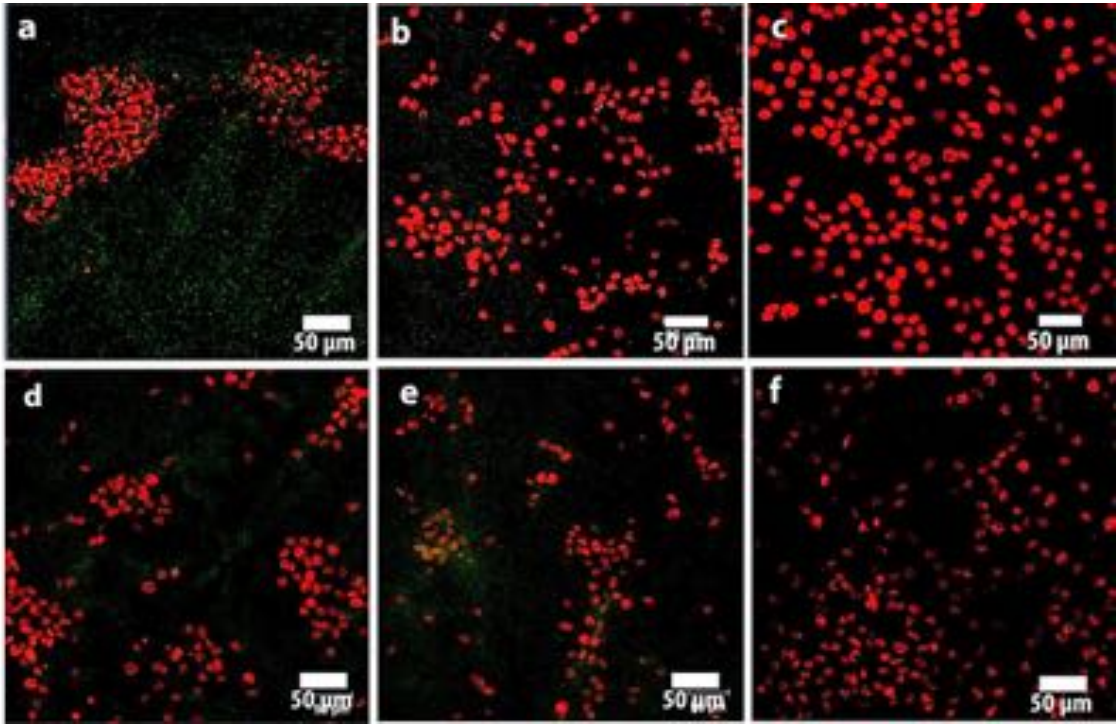
Şekil 56. Alkalin Fosfataz benzeri yapılar üzerinde osteojenik destek varlığında ve yokluğunda 7 ve 12. günlerde gen ifade profil değişimi.



Şekil 57. 25 μ M Zn ile desteklenmiş Alkalın Fosfataz benzeri yapılar üzerinde osteojenik destek varlığında ve yokluğunda 7 ve 12. günler kemiğe özel gen ifadesinin kantitatif analizi.

3.15 Kemik Spesifik DMP1 Protein Sentezinin Takibi

DMP kolajenik olmayan asidik bir proteindir ve mineralize olmuş matriste transkripsiyon faktörlüğü ve matris proteinliği gibi önemli görevleri vardır. DMP-1 kemik hücresine dönüşmemiş hücrelerde genellikle çekirdekte bulunur ve mineralizasyon sırasında hücreler arasındaki kalsiyum miktarının artması proteinin hücreden dışarı çıkarılmasını tetikler. Bu proteinin dışarıda bulunması hücrelerin olgun kemik hücresine farklılaşmasının önemli bir göstergesidir. Bu sebeple kıkırdak farklılaşmasını karakterize etmek için peptit nanofiberler üzerinde büyütülen rMKH ler kemiğe özgü DMP-1 antipadisi ile boyanmıştır.

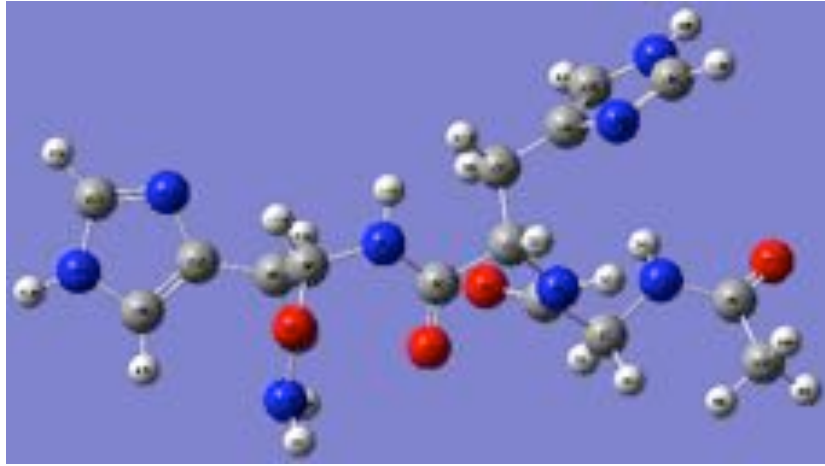


Şekil 58. 7. günde alkalın fosfataz taklidi peptitler üzerinde immunositokimya yöntemi ile hücreler üzerinde DMP-1 ekspresyonunun gösterilmesi. a. PA1 üzerinde, b. PA2 üzerinde, c. Kontrol peptitsiz ortam, d. PA1 + Zn, e. PA2 + Zn, f. Çinkolu peptitsiz ortam.

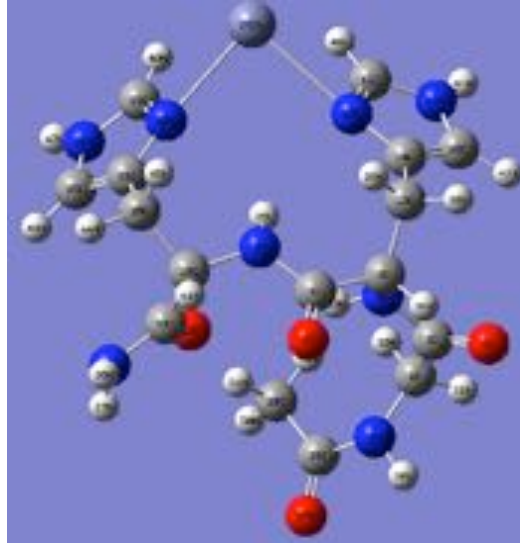
İmmünoisitokimya deneylerine göre çinkolu ve çinkosuz yüzeyler üzerinde DMP-1 proteini üretimi ve hücre dışına salgılandığı gözlemlenmiştir. 7. günde kontrol gruplarının aksine peptit kaplı yüzeylerde DMP-1'e özgü antipadi boyanması peptitli yüzeylerin kök hücrenin kemik hücresine farklılaşmasında stimüle edici ve hızlandırıcı bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır.

3.16 Moleküler Hesaplamalar

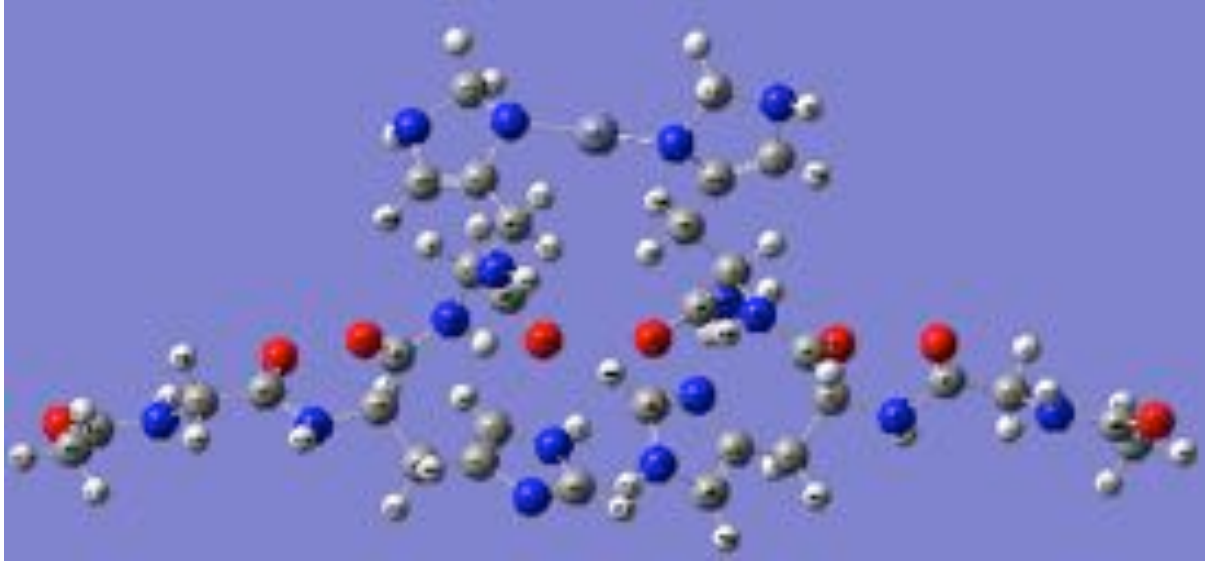
Projede PA1, PA1+Zn ve 2PA1+Zn moleküllerinin yarı-ampirik yöntemlerden birisi olan PM3 yöntemi ile geometri iyilemeleri yapılarak, moleküllerin minimum enerji konfigürasyonları belirlenmiştir (Şekil 59). Geometri iyilemelerinden sonra Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (Density Functional Theory, DFT) B3LYP (Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) değişim ve korelasyon potansiyelleri ve 6-31G(d) baz seti ile "Tek Nokta Enerjisi (Single Point Energy, SPE)" hesabı yapılmış olup, moleküllerin enerji düzeyleri ve elektrostatik özellikleri bu hesaba göre bulunmuştur.



Şekil 59. PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi



Şekil 60. Zn bağlanmış PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi



Şekil 61. Zn bağlanmış iki PA1 molekülünün PM3 yöntemi ile enerji iyileşmesi

Yapısal Özellikler:

PA1 + Zn molekülü için Zn ve N atomları arasındaki bağ uzunlukları $15N-29Zn= 2,64 \text{ \AA}$ ve $22N-29Zn= 2,59 \text{ \AA}$ olup bu üç atom arasındaki açı ise $15N-29Z-22N= 89^\circ$ dir. (Şekil 60) Bu bağ uzunluklarının ve açı deney/teorik sonuçlarla uyuşmamakta olduğu gözlemlendi. Bu yüzden tek peptidin çinko koordinasyonu için uygun olmadığı hesaplandı. Bu sonuçların önceki raporumuzda gösterdiğimiz çinko bağlanmasını gösteren izotermal titrasyon (ITC) deneyleri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

2 PA1+ Zn molekülü için ise bu değerler $50N-57Zn= 1,90 \text{ \AA}$, $22N-57Zn= 1,91 \text{ \AA}$ ve $50N-57Z- 22N= 154^\circ$ ölçülmüş olup deneyle uyumludur (Şekil 61). Deneysel sonuçlarda, teorik hesaplamalarda olduğu gibi sonuçlarda bir peptitde iki çinko bağlanmaktadır. Enerji iyileşmelerine göre iki peptidin geometrisi metal koordinasyonu için bir peptitden daha uygundur.

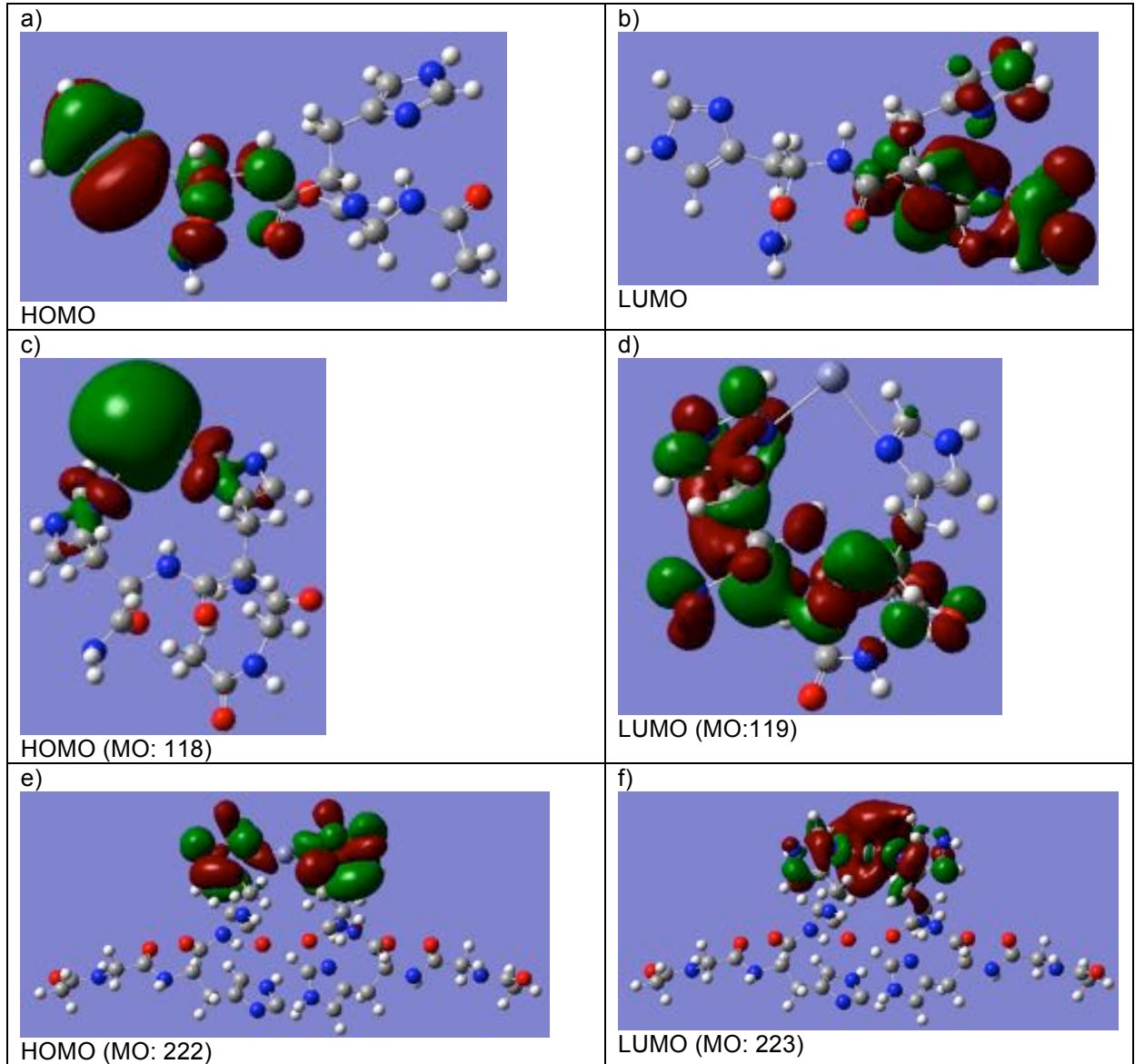
Elektronik Özellikler:

Sınır Moleküler Orbitaleri (HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) = Dolu olan en yüksek moleküler orbital ve LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) = Boş olan en düşük enerjili moleküler orbital) DFT/B3LYP/6-31G (d) ile yapılan SPE hesaplarına göre HOMO-LUMO arasındaki enerji boşluğu PA1 için 5.91 eV, 1 tane PA1+Zn için 3.87 eV ve 2PA1+Zn için ise 2.90 eV olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre PA1 molekülü kinetik olarak diğer yapılardan daha kararlı olurken, 2PA1 + Zn molekülü kimyasal olarak daha

reaktiftir. Bu bulgular yapılan deneylerle de uyum göstermektedir, yani çinkonun varlığı molekülün reaktivitesini arttırmıştır.

Ayrıca 3-boyutlu HOMO ve LUMO çizimleri de her bir yapı için sunulmuştur (Şekil 62). Bu çizimlere göre: PA1 için HOMO genel olarak molekülün sol kısmında bulunan İmidazol ve ona bağlı atomlar üzerinde lokalize olurken, LUMO aşağıdaki görsel molekülün sağ kısmında lokalize olmuştur (Şekil 62 a,b). PA1 + Zn molekülünde HOMO Zn atomu ve ona bağlı İmidazollerde bulunan N atomları üzerinde lokalize olurken, LUMO genel olarak Zn atomu ve molekülün sağ tarafında bulunan İmidazol dışında kalan bölgeye yayılmıştır (Şekil 62 c,d).

2 PA1 + Zn yapısında ise HOMO Zn atomuna bağlı her iki İmidazol grubu üzerinde lokalize olurken, LUMO Zn atomunu da içine alarak yine aynı bölgelerde lokalize olduğu gözlenmiştir (Şekil 62 e,f).



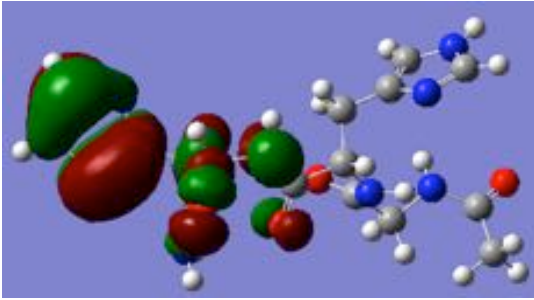
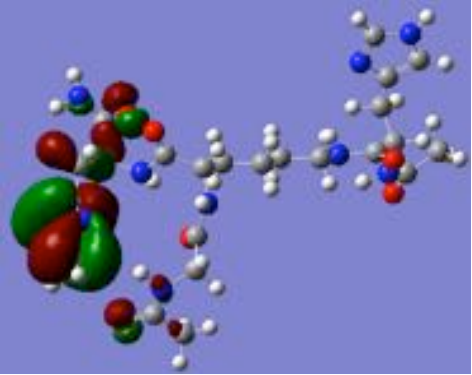
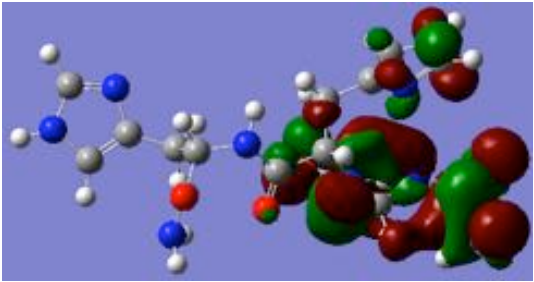
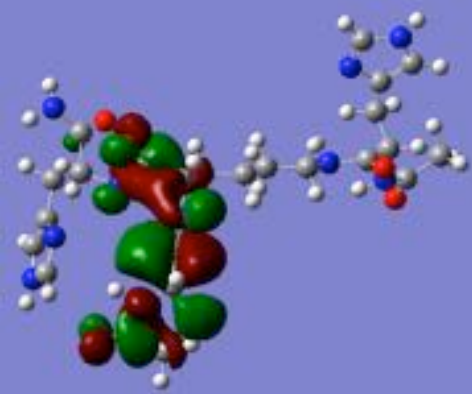
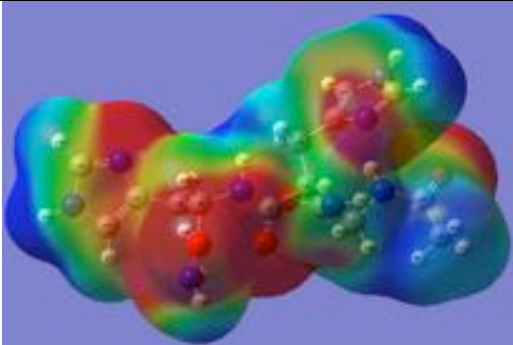
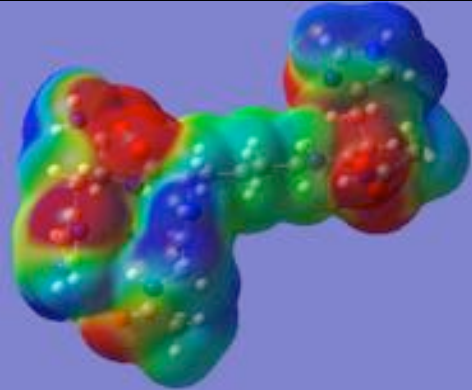
Şekil 62. 3-boyutlu HOMO ve LUMO çizimleri

Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP):

Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) haritası, moleküllerin elektron-sever ve proton-sever bölgelerini göstererek, molekülün kimyasal aktivitesinin belirlenmesinde ve bir molekülün diğer moleküllerle nasıl etkileşeceğini anlaşılmasında önemli bir araçtır. MEP haritasının negatif (kırmızı) bölgesi proton-sever, pozitif (mavi) bölgesi elektron-sever kısımlarını göstermektedir.

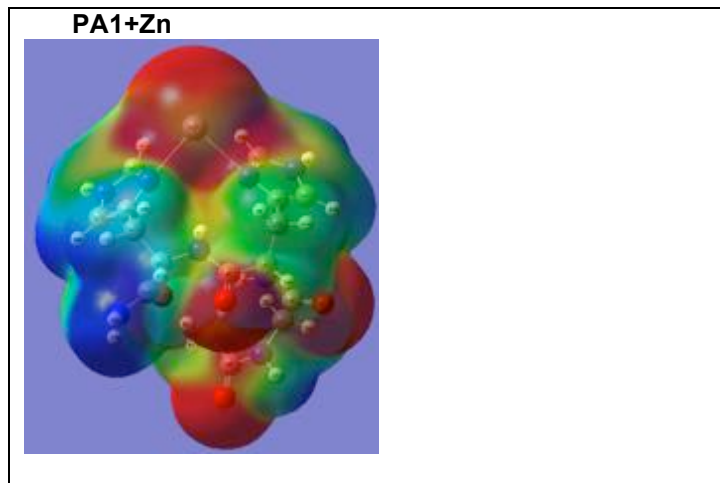
PA1, PA1+Zn, 2PA1+Zn, PA2, 2PA2+Zn ve 2PA2+Zn moleküllerinin her biri için ayrı ayrı B3LYP/6-31G (d) düzeyinde Tek Noktada Enerji hesabı (Single Point Energy, SP) ile MEP haritaları oluşturulmuştur (Şekil 63-64). Bu haritalara göre her üç molekülün elektron-sever en pozitif bölgeleri O atomu ile çift bağ yapmış C atomları (yani karbonil karbon atomları) üzerinde bulunup, elektrostatik potansiyel değerleri karbon atomları için +0,55 ile +0,60 a.u. arasında değişmektedir. Molekülün proton-sever en negatif bölgeleri ise moleküllerdeki N atomları üzerinde olup, burada potansiyelin değeri -0,49 ile -0,74 a.u. arasında değişmektedir. PA1, PA1+Zn, 2PA1+Zn, PA2, ve 2PA2+Zn moleküllerindeki Zn ve N atomları üzerindeki yüklere bakıldığında ise şekildeki sonuçlar görülmektedir.

2 PA1 + Zn molekülü ise N atomlarının yükleri -0,69 a.u, Zn atomunun yükü ise +0,64 a.u. (Şekil 3b) olup Zn atomunun 2 tane PA1 molekülü ile bağlandığının göstergesidir. Yani, Zn 2 PA1 molekülüne bağlandığında daha elektronegatif özellik kazanır. 2 PA1 + Zn molekülü ise N atomlarının yükleri -0,69 a.u, Zn atomunun yükü ise +0,64 a.u. (Şekil 64) olup çinko atomunun 2 tane PA2 molekülü ile bağlandığının göstergesidir.

	PA1	PA2
HOMO		
LUMO		
ESP		

Şekil 63. Çinkosuz eklenmiş moleküllerin HOMO-LUMO, Moleküler Elektrotatik Potansiyel Haritaları

	2PA1+Zn	2PA2+Zn
HOMO		
LUMO		
ESP		



Şekil 64. Çinko eklenmiş moleküllerin HOMO-LUMO, Moleküler Elektrostatik Potansiyel Haritaları

PA1+Zn ve 2PA1+Zn moleküllerinin dipol momentlerini su molekülünün dipol momenti (PM3 seviyesinde = 1,74 Debye) ile kıyaslayarak 2 PA1+Zn molekülünün suya göre daha az polar olduğunu, PA1 + Zn molekülünün ise suya kıyasla çok daha fazla polar olduğunu görürüz. Yani, 2PA1+ Zn molekülleri suya atıldığı zaman zaman kendi aralarındaki etkileşim küçük olurken su ile etkileşimleri büyük olacağı anlamına gelmektedir. PA1 + Zn molekülünde ise tersi durum söz konusudur, yani kendi aralarındaki etkileşim su ile etkileşimlerinden daha büyük olacaktır (yani su ile etkileşimi daha küçük olacaktır) (Tablo 7). Ayrıca her 3 molekülün toplam enerji değerleri de Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7: Moleküler Enerji Değerleri

	PA1	PA1+Zn	2PA1+Zn
Toplam Enerji	-1361,85 au	-3140,96 au	-4504,03 au
Dipol Moment (SP) (Dipol Moment(PM3))	3,46 Debye (3,85 Debye)	5,27 Debye (6,45 Debye)	0,82 Debye (1,13 Debye)

Bu sonuçlardan da çinkonun iki peptit tarafından koordinasyonunun tek peptide oranla daha olası olduğu elektrostatik potansiyel haritaları ile de kanıtlanmıştır. Aynı zamanda peptitlerin suyla etkileşimlerinin daha iyi olması, suyun Zn tarafından deprotona edilmesi ile aktifleşen ve deprotona olmuş suyun ester bağını kırması ile tamamlanan katalitik mekanizma için önemli bir parametredir. Tek peptidin koordine ettiği çinko bu açıdan da iki peptitten geri kalmaktadır.

4. SONUÇ

Bu çalışmada çeşitli fosfataz proteinlerinden esinlenilerek sentezlenmiş katalitik özellik göstermesinin yanında mineral oluşumunu destekleyen peptit nanofiber iskeleleri üretilmiş ve bu multifonksiyonel sistemin kullanılabilirliği gerek kimyasal, gerek *in vitro* yöntemler kullanılarak kanıtlanmıştır. Kısaca proje süresince; malzeme sentez ve karakterizasyonları, enzim kinetiği deneyleri ve hesaplamaları, peptitlerin katalitik ve moleküler özelliklerinin teorik hesaplamalarla açıklanması, yüzeyler üzerinde mineral kristallerinin oluşturulması ve kristallerin yapı analizi ve model hücreler üzerinde (SaOS-2 ve rMKH) *in vitro* 2D biomineralizasyon çalışmaları yapılarak geliştirilen peptitlerin fosfataz gibi davrandığı gösterilmiştir.

Geliştirdiğimiz sentetik peptit amfifil enzim benzeri yapıların nötr pH'ta fiberleşmeleri, kolay modifiye edilebilirliği, metal koordinasyon kapasiteleri, kataliz için yüksek yüzey alanı

sağlaması ve fiberlerin oluşturduğu jellerin β -düzlemsel yapılarının kalsiyum fosfat birikimi için fiziksel iskelet görevi görmesi gibi özellikleri araştırmamızda hedeflediğimiz çok fonksiyonlu kemik rejenerasyonunun katalizden mineral birikimine kadar bir çok aşamada simüle edilebilmesine olanak sağlamıştır. Bu biyo-taklit yöntemi ile çok karşılaşılan kemik hasarı tedavileri için etkili, kolay uygulanabilir, kısa zamanlı, ucuz ve dolayısıyla önemli bir yöntem geliştirilmiştir.

In vitro uygulamalarda kullanım olanağı sağlayan enzim takliti peptit nanofiberler literatürde ilk olmakla birlikte, mineralizasyon ve osteojenik tetikleme için oldukça ümit vaatmektedir. Bugüne kadar yapılan enzim taklidi yapılar genellikle biyoyumlu olmayan kimyasallardan türetilmelerinden dolayı, terapi amacı ile denemeleri mümkün olmamıştır. Çünkü bu yapıların vücutta toksik özellik göstermelerinin yanında, çoğu zaman vücuttan atılamamaktadırlar. Bu projemizde enzim aktivitesini taklit eden biyoyumlu peptitler ilk defa biyomineralizasyon için kullanılmıştır. Uygulamadan sonra işlevleri biten peptit yapıların vücuttan kolaylıkla atılabilmesi, peptit bazlı biyomolekül taklitlerini sağlık alanında uygulamalar için çekici kılmaktadır.

Yukarıda bahsi geçen bu özellikler daha farklı enzimlerin taklidi olanağı sağlanmasının yanında ileri vadede endüstride kullanılan katalizörlerin taklidine de olanak sağlayabilecek niteliktedir ve klinik uygulamalar için potansiyel teşkil etmektedir. Özellikle günümüzde çoğunlukla karşılaşılan kemik deformasyonu, kırılma yada osteoporoz gibi tamamen iyileşemeyen, uzun vadede terapi ve ilaç kullanımı gerektiren rahatsızlıklar için, etkili ve düşük maliyetli bir tedavi yöntemi çok gereklidir. Bu amaçla geliştirdiğimiz etkin, üretimi kolay ve maliyeti düşük yöntem, hem hasta sağlığı için hem uzun süreli tedavilerin süresinin kısaltılması ve aynı zamanda ekonomik külfetinin azaltılması için önemli olabilecek niteliktedir.

KAYNAKÇA

- Coleman, J. E. 1986. 'In Zinc Enzymes'; Bertini, I., Luchinat, C., Maret, W., Zeppezauer, M., Eds.; Birkhäuser, Boston, 1, 49-58.
- Collot, J., Gradinaru, J., Humbert, N., Skander, M., Zocchi, A., & Ward, T. R. 2003. Artificial 'Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis Based on Biotin-Avidin', *Journal of the American Chemical Society*, 125(30), 9030-9031.
- Eby, G. A. 1997. 'Zinc ion availability--the determinant of efficacy in zinc lozenge treatment of common colds', *J. Antimicrob. Chemother*, 40, 483-493.
- Gani, D., Wilkie, J. 1995. 'Stereochemical, mechanistic and structural features of enzyme catalysed phosphate monoester hydrolysis', *Chem. Soc. Rev.*, 24, 55-63.
- Guler, M. O., Stupp, S. I. 2007, 'A self-assembled nanofiber catalyst for ester hydrolysis, *Journal of the American Chemical Society*', 129, 12082-3.
- Holm, R. H., Kennepohl, P., Solomon, E. 1996.' Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology', *Chem. Rev.*, 96, 2239-2314.
- Jedrzejewski, M. J., Setlow, P. 2001. 'Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis via a phosphoserine intermediate', *Chem. Rev.*, 101, 607-618.
- Lipscomb, W. N., Straub, N. 1996. 'Recent Advances in Zinc Enzymology', *Chem. Rev.*, 96, 2375- 2433.
- Matthews, R. G., Goulding, C. W. 1997. ' Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc', *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1, 332-339.
- Myers, L. C., Terranova, M. P., Ferentz, A. E., Wagner, G., Verdine, G. L. 1993.' Repair of DNA methylphosphotriesters through a metalloactivated cysteine nucleophile', *Science*, 261, 1164-1167.
- Osathanon, T., Giachelli, C. M. and Somerman, M. J. 2009. 'Immobilization of Alkaline Phosphatase on Microporous Nanofibrous Fibrin Scaffolds for Bone Tissue Engineering', *Biomaterials*, 30(27), 4513-4521.
- Parkin, G. 2004. 'Synthetic Analogues Relevant to the Structure and Function of Zinc Enzymes', *Chem. Rev.*, 104, 699-767.
- Rosati, F., & Roelfes, G. 2010. 'Artificial Metalloenzymes', *ChemCatChem*, 2(8), 916-927.
- Simonson, T., Calimet, N. 2002. 'Cys(x)His(y)-Zn²⁺ interactions: thiol vs. thiolate coordination', *Proteins*, 49, 37-48.
- Spoerke, E. D., Anthony, S. G., & Stupp, S. I. 2009.' Enzyme Directed Templating of Artificial Bone Mineral', *Advanced Materials*
- Vallee, B. L., Galde, A., 1984. 'The metallobiochemistry of zinc enzymes', *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 56, 283-430.

Vallee, B. L., Auld, D. S. 1992 'Matrix Metalloproteinases Inhib.', Proc. Matrix metalloproteinase Conf. 5-19.

Vallee, B. L., Auld, D. S. 1994. 'Zinc: biological function and coordination motifs', Acc. Chem. Res., 26, 543-551.

Wilcox, D. E. 1996. 'Binuclear Metallohydrolases'. Chem. Rev., 96, 2435-2458.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. MUSTAFA ÖZGÜR GÜLER
Proje No:	112T602
Proje Başlığı:	Alkalın Fosfataz Benzeri Peptit Nanokatalizörler
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	AYŞE BEGÜM TEKİNAY, EMİNE DENİZ TEKİN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İHSAN DOĞRAMACI BİLKENT Ü. UNAM MALZEME BİLİMİ VE NANOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2012 - 01/09/2014
Onaylanan Bütçe:	243320.0
Harcanan Bütçe:	201520.88
Öz:	<p>Alkalın fosfataz (ALP) enzimi, nükleotitler ve alkaloidler gibi moleküllerdeki fosfat grubunun hidrolizinde görev alan bir enzimdir. Bu enzimin çinko varlığında aktivitesinin arttığı in vitro ve in vivo çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bu enzim, aynı zamanda biyomineralizasyon için gerekli olan fosfat üretimine yardımcı olduğundan kemik dokuda yer alan hidroksiapatit üretimini hızlandırır.</p> <p>Bu projede, ALP aktivitesini taklit edebilen peptit nanofiber sistemleri geliştirilmiştir. Kendiliğinden düzenlenerek nonkovalent etkileşimler sayesinde multivalent aktif yüzey oluşturan peptit molekülleri, ALP'nin aktif bölgesindeki benzer şekilde çinkoya bağlanan amino asitler ile aktifleştirilerek hidroksiapatit üretilmesini sağlamıştır.</p> <p>Peptit nanosistemlerinin kararlılığı, hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlardan oluşmasından ileri gelmektedir. Hidrofobik kısma eklenen, beta yaprak oluşturma özelliğine sahip amino asitler sayesinde üç boyutlu bir yapı oluşturulabilmektedir. Bu özelliğe sahip amino asit dizininden sonra da, istenilen fonksiyona sahip amino asitler eklenebilmektedir. Bu projede, aynı stratejiyi kullanarak farklı yapısal özellikteki peptit moleküllerinin sentezlenmesi ve bu yapısal özelliklerin katalitik aktiviteye etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle, yapay enzim yapımına, nanosistemlerle çözüm adımları ileri vadede sağlanacaktır.</p> <p>Sentezlenen yeni peptit nano yapıların katalitik aktivitelerinin, canlı organizmalar üzerindeki etkisi de hücre üzerinde yapılacak in vitro deneyler ile gösterilmiştir. Ayrıca, sentezlenen yeni peptitler ve bu peptitlerin metal iyonlarıyla koordinasyonu sonucu oluşan üç boyutlu yapıların modellemeleri de desteklenmiştir. Bu tür teorik çalışmalar, sonraki supramoleküler yapıların tasarımında örnek teşkil edecektir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Nanoteknoloji, Supramoleküler Kimya, Peptit, Biyomalzemeler, Hücre-Malzeme Etkileşimleri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Supramolecular peptide - copper complex for click reactions (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- Supramolecular peptide nanosystems for biomimetic extracellular matrix interactions (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 3- Supramolecular peptide nanosystems for biomimetic extracellular matrix interactions (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 4- Metalloenzyme inspired peptide nanofibers for bone mineralization (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 5- Metalloenzyme inspired peptide nanofibers for bone mineralization (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 6- Nanotechnology for Medicine at National Nanotechnology Research Center at Bilkent University (Bildiri - Uluslararası Konferans - Davetli Konuşmacı),