



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**PEPTİT TEMELLİ NANO-MATERYALLERİN HAZIRLANMASI
VE HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Emrah DİKİCİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI**

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182322401 numaralı Doktora öğrencisi Emrah DİKİCİ tarafından hazırlanan “**PEPTİT TEMELLİ NANO-MATERYALLERİN HAZIRLANMASI VE HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Erciyes Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Talat BARAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Doç. Dr. Tülden İNANAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 06.02.2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dūřecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gōsterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her tūrlū intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitū tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tūm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Emrah DİKİCİ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her türlü desteği veren, bilimsel ahlakı ve insani değerleri ile de bize ışık olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na,

Tez İzleme Komitemde yer alan tecrübeleriyle ve engin bilgileriyle bana destek olan Sayın Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Tülden İNANAN'a,

Tez Savunması Komitemde yer alan desteklerini her zaman hissetmiş olduğum Sayın Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL ve Prof. Dr. Talat BARAN'a sonsuz saygı ve hürmetlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen grup arkadaşlarım Doç. Dr. Ömür ACET, Burcu Önal ACET ve Tuba GÖK'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan babama, anneme ve kardeşlerime, beni sabırla her zaman destekleyen sevgili eşim Zehra, oğullarım Yusuf Mirza ve Ali Tahir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hücre çalışmalarında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda bana yardımcı olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burak Evren İNANAN'a, Doç. Dr. İsmail BİLİCAN'a ve Dr. Ömer SONKAYA'a şükranlarımı sunarım.

Analizlerdeki yardımlarından ve desteklerinden dolayı Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM) yönetimine ve çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte bana sağlanan burs için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, Proje No: 220N178)'na ayrıca teşekkür ederim.

Emrah DİKİCİ
AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Peptit Temelli Nano-Materyaller.....	4
2.1.1 Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesinden sorumlu etkileşimler	4
2.1.1.1 Kovalent olmayan etkileşimler	7
2.1.1.2 Peptit kendiliğinden düzenlenmesinde dinamik kovalent bağ.....	10
2.1.2 Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen faktörler	10
2.1.2.1 İçsel faktörler	11
2.1.2.2 Dışsal faktörler	13
2.1.3 Difenilalanin (FF) peptitinin kendiliğinden düzenlenmesi: sentez ve özellikleri.....	14
2.1.3.1 Peptit nano-materyallerin sentezi.....	15
2.1.3.2 Amid fonksiyonel grubu	17
2.1.4 Peptit nano-materyallerin özellikleri	18
2.1.5 Peptit nano-materyal uygulamaları.....	20
2.1.5.1 Süper kapasitör.....	20
2.1.5.2 Biyoalgılama	21
2.1.5.3 İlaç dağıtımı	22
2.2 Peptit Temelli Nano-Materyallerin Hücresel Etkileşimleri.....	23
2.2.1 Nano-materyal iskelelerin yüzey karakteristikleri.....	24
2.2.2 Dokuların yeniden doğuşu	25
2.3 RNA İnterferans (RNAi)	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	27
3.2 Peptit Temelli Nano-Materyallerin (NM) Sentezi.....	27
3.3 FFA Temelli Nano-Materyallerin (NM) Sentezi ve Ca ²⁺ Modifikasyonu	27
3.3.1 FFA temelli nano-materyallerin (NM) Sentezi	27
3.3.2 FFA temelli NM'lerin Ca ²⁺ iyonları ile dekore edilmesi.....	30
3.4 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Karakterizasyonu.....	30
3.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri	31
3.4.2 Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile FFA Nano-materyallerin boyut ve zeta potansiyel (ZP) analizleri.....	31
3.4.3 Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri.....	31
3.4.4 Kütle spektrofotometre (MS) analizleri	31
3.4.5 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri.....	32
3.5 Nano-Materyallerin Farklı Biyomoleküller ile Etkileşimleri.....	32
3.5.1 Dipeptit temelli nano-materyallerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri.....	32
3.6 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Sitotoksikite Analizleri	33

3.7 siRNA'nın FFA ve Ca ²⁺ -FFA-NM'leri ile Komplekslerinin Dinamik Işık Saçılma (DLS) ve Zeta-Potansiyel Ölçümleri	34
3.8 Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.9 Akış Sitometri Kullanılarak HT-29 ve Hela Kanser Hücrelerine NM-siRNA Komplekslerinin İnternalizasyonu.....	36
3.10 Tümör Hücrelerine Karşı NM-siRNA Komplekslerinin Sitotoksosite Analizi	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Karakterizasyonu.....	37
4.2 FFA Temelli NM'lerin Ca ²⁺ İyonları ile Dekore Edilmesi.....	44
4.3 Dipeptit Temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile Etkileşimleri	45
4.3.1 Ca ²⁺ -FFA temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile oluşturduğu korona yapıların TEM analizleri	48
4.4 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Sitotoksosite Analizleri	48
4.5 siRNA-NM Komplekslerinin DLS ve Zeta-Potansiyel Ölçümleri.....	50
4.6 Agaroz Jel Elektroforezi.....	51
4.7 Akış Sitometri Kullanılarak HT-29 ve Hela Kanser Hücrelerine NM-siRNA Komplekslerinin İnternalizasyonu.....	52
4.8 Tümör Hücrelerine Karşı NM-siRNA Komplekslerinin Sitotoksosite Analizi	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	69

DOKTORA TEZİ

PEPTİT TEMELLİ NANOMATERYALLERİN HAZIRLANMASI VE HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Emrah DİKİCİ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ÖZET

Kanser hastalıklarına karşı alışlagelmiş tedavi yöntemlerinde rastlanan tümör invazyonu, farklı dokulara tümörün yayılması ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlardan ötürü, yeni yöntemler geliştirmek büyük öneme sahiptir. Gen terapisi alanında terapötik geni hedef dokuya taşıyan, kendiliğinden düzenlenme, biyo-uyumluluk ve biyo-bozunurluk gibi avantajlara sahip nano-materyallerin üretiminde öne çıkan peptit temelli yapılara, moleküler tanıma fonksiyonları nedeniyle her geçen gün ilgi artmaktadır. Tez kapsamında, gen susturucu olarak kullanılan siRNA'ları kanser hücrelerine taşımak üzere kendiliğinden düzenlenebilen boyutu ve dengelenmiş yüzey yükü bakımından yeni olan difenilalanin amid (FFA) temelli nano-materyaller (NM) sentezlendi. FFA-NM'ler sentezlendikten sonra Ca^{2+} iyonları ile dekore edildi. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında SEM (taramalı elektron mikroskobu), TEM (transmisyon elektron mikroskobu), MS (kütle spektrometresi), DLS (dinamik ışık saçılma), Zeta-potansiyel ölçümü, Image J boyut değerlendirmesi ve FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi) spektroskopisi ile analiz edildi. Biyolojik moleküllerle korona oluşturma potansiyellerini değerlendirmek için sentezlenen FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'ler HSA, IgG ve DNA molekülleri ile etkileştirildi. NM'lerin yüzeyinde oluşan korona tabakası DLS ve spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Gerçekleştirilen hücre toksisite ve internalizasyon testlerinden sonra elde edilen bazı bulgular şöyle özetlenebilir: Ortalama boy dağılımı 87,93 nm olan FFA-NM'lerin yüzey yükleri -20,1 mV iken Ca^{2+} dekorasyonundan sonra +9,3 mV olmuştur. Yüzey yük dağılımı, Ca^{2+} -FFA-NM'lerin HSA, IgG ve DNA molekülleri ile oluşturduğu korona yapılarına göre de sırasıyla -7,6, -3,7 ve -9,7 mV olarak belirlenmiştir. Ca^{2+} -FFA-NM'lerin HeLa ve HT29 hücre hatlarıyla 24 saatlik etkileşimleri sonrasında toksisite görülmemiştir. Farklı siRNA türlerinin (Mcl-1 ve Bcl-xL) Ca^{2+} -FFA-NM'ler ile oluşturduğu komplekslerinin HeLa ve HT29 hücre hatlarına internalize olduğu ve canlılıklarında yaklaşık %36 oranında bir azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan FFA tabanlı NM'ler biyo-uyumlu olup, susturucu siRNA'ların kanser hücrelerine internalizasyon derecesini artırmak için yapılacak olan daha ileri çalışmalarda umut vadedeceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Difenilalanin Amid, siRNA, HeLa, HT29, Sitotoksosite, Internalizasyon

Ocak, 2024; 70 sayfa

PhD. THESIS

PREPARATION OF PEPTIDE-BASED NANOMATERIALS AND INVESTIGATION OF THEIR CELLULAR INTERACTIONS

Emrah DİKİCİ

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ABSTRACT

Traditional treatment methods for cancer diseases encounter disadvantages such as tumor invasion, the spread of tumors to different tissues, and multiple drug resistance. Therefore, developing new methods is of great importance. In the field of gene therapy, there is a growing interest in peptide-based structures that stand out in the production of nanomaterials with advantages such as self-regulation, biocompatibility, and biodegradability, thanks to their molecular recognition functions. In the scope of this thesis, novel nanomaterials (NM) based on diphenylalanine amide (FFA), which are self-regulating in terms of size and balanced surface charge and are novel for carrying small interfering RNA (siRNA) as a gene silencer to cancer cells, were synthesized. After the synthesis of FFA-NMs, they were decorated with Ca^{2+} ions. Characterization studies included analysis using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), mass spectrometry (MS), dynamic light scattering (DLS), Zeta potential measurement, Image J size assessment, and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. To evaluate their potential in forming coronas with biological molecules, the synthesized FFA and Ca^{2+} -FFA-NMs were interacted with HSA, IgG, and DNA molecules. The corona layer formed on the surface of NMs was assessed both by DLS and spectrophotometrically. Some findings obtained after conducting cell toxicity and internalization tests can be summarized as follows: The average size distribution of FFA-NMs, which was 87.93 nm, had a surface charge of -20.1 mV, while after Ca^{2+} decoration, it became +9.3 mV. Surface charge distribution of Ca^{2+} -FFA-NMs occurred as -7.6, -3.7, and -9.7 mV, respectively, depending on the corona structures they formed with HSA, IgG, and DNA molecules. No toxicity was observed after the 24-hour interaction of Ca^{2+} -FFA-NMs with HeLa and HT29 cell lines. Complexes formed by different siRNA types (Mcl-1 and Bcl-xL) with Ca^{2+} -FFA-NMs were internalized into HeLa and HT29 cell lines, leading to an approximately 36% decrease in their viabilities.

The FFA-based NMs used in this study are considered as biocompatible and are believed to hold promise for future advanced studies aimed at increasing the internalization degree of silencing siRNAs into cancer cells.

Keywords: Diphenylalanine Amide, siRNA, HeLa, HT29, Cytotoxicity, Internalization.

January, 2024; 70 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen faktörler	11
Şekil 2.2. Peptit Nano-materyallerin Sentezine ilişkin çeşitli metodolojiler	15
Şekil 3.1. NM çapraz bağlanma ve kendiliğinden düzenlenme şeması	28
Şekil 3.2. Difenilalaninamid (FFA) dipeptit temelli nano-materyalin olası sentez reaksiyonu.	28
Şekil 3.3. Çapraz bağlanma sonucu oluştuğu öngörülen olası FFA-2GA-FFA ve FFA-3GA-FFA yapıları.	29
Şekil 3.4. MTT analizinin şematize ön hazırlık işlemi.	33
Şekil 3.5. Hücre canlılığını belirlemede kullanılan MTT analiz şeması.....	34
Şekil 4.1. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM'lerin SEM görüntüleri.....	37
Şekil 4.2. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM'lerin boyutlarının yüzdesel dağılımı.....	38
Şekil 4.3. Belirlenen optimum sürede (48 saat) çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA NM'lerin farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri.....	39
Şekil 4.4. Belirlenen optimum sürede (48 saat) çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM'lerin SEM görüntüsü (A) ve Image J üzerinden yapılan boyut değerlendirmesi (B).....	40
Şekil 4.5. FFA dipeptiti (A) ve FFA-NM 'lerin (B) kütle spektrometresi analizi sonucu.	41
Şekil 4.6. FFA NM'lerinin SEM (A) ve TEM (B) analizi görüntüleri.	41
Şekil 4.7. FFA-NM'lerin DLS sonuçları.	42
Şekil 4.8. Gluteraldehit (A), FFA dipeptidi (B) ve FFA-NM (C) lerinin FT-IR analizleri.	42
Şekil 4.9. FFA NM'lerin farklı $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ derişimlerinde alınmış Zeta-potansiyelleri: (A) Yalın FFA, ζ : -20,1 mV; (B) 500 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : -10,5 mV; (C) 1000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +6,6 mV; (D) 2000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +9,3 mV.	44
Şekil 4.10. FFA-NM'ler ve Ca^{2+} iyonları arasındaki olası etkileşim modeli.	45
Şekil 4.11. Korona oluşturmuş Ca^{2+} -FFA-NM'lerin farklı Zeta potansiyelleri: (A) 2000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +9,3 mV; (B) Ca^{2+} -FFA-HSA, ζ : -7,6 mV; (C) Ca^{2+} -FFA-IgG, ζ : -3,7 mV; (D) Ca^{2+} -FFA-DNA, ζ : -9,7 mV.	47
Şekil 4.12. Ca^{2+} iyonu ile dekore edilmiş FFA-NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri sonucu oluşan korona yapılarının şematize gösterimi.....	47
Şekil 4.13. Ca^{2+} -FFA-NM'lerin HSA (a), IgG (b) ve DNA (c) ile etkileşim sonrası oluşan korona yapılarının TEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.14. 24 saat (A) ve 72 saat (B) boyunca 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerinde FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyalleri ile inkübasyon sonrası canlı HeLa hücrelerinin yüzdesi (Hücre kültürü ortamı: DMEM; İnkübasyon:37°C).	49
Şekil 4.15. 24 saat (A) ve 72 saat (B) boyunca 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerinde Ca^{2+} -FFA-NM'leri ile inkübasyon sonrası canlı HT29 hücrelerinin yüzdesi (Hücre kültürü ortamı: DMEM; İnkübasyon sıcaklığı:37°C).....	49

- Şekil 4.16.** FFA (A), Ca^{2+} -FFA (B) NM'lerin değişen derişimlerine karşı 30 dakika ve 20 saatlik inkübasyon süresinde NM-siRNA arasındaki etkileşime bağlı olarak zeta-potansiyeldeki değişim (1X siRNA tamponu 0,5 μM siRNA, pH 7,4; inkübasyon süresi: 30 dakika ve 20 saat; inkübasyon sıcaklığı: 25°C)..... 51
- Şekil 4.17.** Farklı derişimlerdeki FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyallerine sahip siRNA'nın elektroforegramı (2 μM siRNA; 1X siRNA tamponu, pH, 7,4; NM'lerin siRNA ile inkübasyon süresi: 25°C'de 30 dakikadır.). 51
- Şekil 4.18.** Farklı derişimlerdeki FFA, Ca^{2+} -FFA-NM'lerin ntRNA ve siRNA komplekslerinin HeLa(A) ve HT29(B) hücrelerine internalizasyonu (Hücre etkileşim süresi; 37°C'de 24 saat). 53
- Şekil 4.19.** siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL)'lar ile muamele edilmiş ve edilmemiş FFA ve Ca^{2+} -FFA- NM'lerin HeLa (A-B) ve HT29 (C-D) tümör hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi: NM derişimi: 0,88 $\mu\text{g/mL}$; Inkübasyon süresi: 24 saat; Sıcaklık: 37°C..... 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM'lerin boyutlarının ortalama değeri.	38
Çizelge 4.2. Ca^{2+} iyonları ile dekore edilmiş FFA Temelli NM'lerin Zeta potansiyel değeri.	44
Çizelge 4.3. FFA temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri.	45
Çizelge 4.4. Korona oluşturmuş Ca^{2+} -FFA-NM'lerin Zeta-potansiyel değeri.	46
Çizelge 4.5. 1X siRNA tamponunda (pH 7.4) incelenen nano-materyallerin zeta-potansiyel değeri.	50
Çizelge 4.6. Farklı derişimlerdeki FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyallerine sahip siRNA'nın elektroforegram karşılığı.	52



SİMGELER VE KISALTMALAR

ATR-FTIR	Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
Bcl-xL	B-cell lymphoma gene-xL
Ca²⁺-FFA-NM	Ca ²⁺ ile dekore edilmiş FFA temelli NM
DLS	Dinamik ışık saçılması
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FF	Difenilalanin
FFA	Difenilalanin amid
GA	Glutaraldehit
HeLa	İnsan servikal adenokarsinom hücre hattı
HFIP	1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol
HSA	İnsan serum albümini
HT29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IgG	İmmünglobulin G
kDa	Kilo dalton
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
Mcl-1	Myeloid cell lymphoma gene-1
MS	Kütle spektrofotometresi
MTT	3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenilltetrazoyum bromür
mV	Milivolt
NM	Nano-materyal
nm	Nanometre
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PDI	Polidispersite indeksi
pI	İzoelektrik nokta
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	Küçük interferans RNA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
UV-VIS	Ultraviyole-görünür bölge
°C	Santigrat derece
ζ	Zeta-potansiyel

1. GİRİŞ

Son yıllarda nanoteknoloji ve nanobilim alanlarında görülen gelişmelerle birlikte nano-materyal sistemlerin sentezi ve kullanım olasılıkları ile ilgili çalışmalara ilgi artmaktadır. Günümüzde boyutlarından kaynaklı işlevselliklerinden dolayı nano-materyaller (NM) birçok alanda olduğu gibi ilaç sektöründe de geleneksel ilaçların yerini almaya başlamıştır (Fosgerau vd., 2015; Hancock ve Sahl, 2006).

Tabiatta mevcut olan çoğu yapının oluşumundaki en temel mekanizma olan kendiliğinden düzenlenme (self-assembly), üç boyutlu geometriye sahip moleküllerin, belirli koşullar altında spontane olarak oluşan doğal bir konformasyonudur ve nano-materyallerin üretim yöntemlerinden biri olarak sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Lee,1986; Dikici, 2023).

Biyolojik sistemlerde biyoaktif ajanların hedef dokuya ulaştırılabilmesi için taşıyıcı sistemler tasarlanırken biyomoleküllerden (DNA, lipit, peptit ve protein gibi) yoğun bir şekilde faydalanılmaktadır (Huang, 2011).

Proteinler, canlı bünyesinde birçok hayati göreve sahiptir (katalizör, transportör, depo, savunma ve düzenleme gibi.) ve kendiliğinden düzenlenme yapabilen organik moleküllerin başında yer alır. Kendiliğinden düzenlenen protein yapılar, doğada makro boyuttan nano boyuta kadar birçok yerde karşımıza çıkmasıyla bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Ayrıca moleküler tanıma kabiliyetleri proteinleri, biyolojik dünyanın en önemli varlıkları haline getirmiştir. Kendiliğinden düzenlenmeye güzel bir örnek olarak, genetik materyal ve proteinden oluşan bakteriyofajlar verilebilir (Jeon ve Shell, 2014; Bozdoğan, 2017).

Kendiliğinden düzenlenme sürecini kovalent olmayan zayıf etkileşimler yönetmektedir. Uygulamada sağladığı kolaylıktan ötürü moleküler kendiliğinden düzenlenme, nano-materyal eldesi için en pratik yol olarak görülmektedir. Serbest enerjiyle yönlendirilen bu süreç, molekülleri farklı ölçeklerde düzenli yapılara organize edebilmektedir (Bozdoğan, 2017; Hyman, 2012).

Temel yapı taşları amino asitler olan peptitler, iyi biyolojik aktivite gösteren biyo-bozunur ve biyo-uyumlu nano-materyallere kendiliğinden düzenlenebilir. Bu nedenle

son yıllarda yapılan çalışmalar kendiliğinden düzenlenen peptitler üzerine yoğunlaşmıştır (Fleming ve Ulijn, 2014).

Farklı morfolojilere sahip stabil nano-materyaller, peptitlerin hidrofobik, hidrojen bağı, π - π etkileşimi ve elektrostatik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla kendiliğinden düzenlenme yoluyla oluşturulabilmektedir (Ma vd., 2020).

Yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde amfililik peptitler, amiloyid türevli peptitler ve siklik peptitlerin nanofibril, nanovezikül ve nanotüp gibi birçok farklı nano yapıya organize olabildiği görülmektedir (Jeon ve Shell, 2014).

Geleneksel kanser tedavi yöntemlerinde görülen tümör invazyonu, tümörün çevre dokulara sıçraması, çoklu ilaç direncindeki hızlı gelişim gibi olumsuzlukları aşabilmek için gen tedavi de terapötik genin hedef dokuya taşınmasını sağlayacak taşıyıcıların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Difenilalaninamid (FFA) dipeptitinin yapısında bulunan aromatik halkalar, biyokimyasal supramoleküler yapıların oluşması için gerekli enerjiyi sağlaması adına önemli rol oynamaktadır. FFA'nın basit yapısı, kimyasal olarak kolay modifiye olması, biyoyumluluk göstermesi ve farklı şartlarda düzenlenebilme yeteneği taşıyıcı sistemler olarak tercih edilmesinde ön plana çıkarmıştır (Pala vd., 2014).

Bu tez çalışmasının amacı da kötü huylu neoplazmalara genetik terapi amacıyla kanser hücrelerine interfering RNA'ların iletilmesi için, kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) tekniği ile çeşitli dipeptitlere dayalı yeni biyopolimerik nano-materyaller oluşturmak ve bunların biyoyumluluğunu, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşimini değerlendirmek ve bunların kullanım olasılığını analiz etmektir.

Bu amaçla gerçekleştirilen deneysel kısım, dipeptit temelli nano-materyal olan difenilalaninamid (FFA) NM'in kendi kendine düzenlenme tekniği ile sentezlenmesi, sentezlenen NM'in boyutlandırılması, karakterizasyonu ve biyolojik etkileşimlerinin incelenmesini kapsamaktadır.

Bu süreçte, FFA NM'lerin 100 nm ve altında boyutlara ayarlanması önemli bir adımdır. Nano-materyallerin Ca^{+2} iyonu ile dekore edilmesi, bu yapıların fonksiyonelliğini ve etkileşim kabiliyetlerini artırmak için gerçekleştirilmektedir.

Karakterizasyon çalışmaları, nano-materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini detaylı bir şekilde analiz etmeyi amaçlamaktadır. Bu amaçla, geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), kütle spektrometresi (MS), zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) ve zeta-potansiyel ölçümü analizleri kullanıldı. Özellikle, NM'lerin zeta-potansiyellerine bakılarak yüzey yük dağılımları ve stabilite durumları değerlendirildi.

Nano-materyallerin biyomoleküler etkileşimleri, insan serum albümini (HSA), immünglobulin G (IgG) ve DNA ile olan korona oluşumları üzerinden incelendi. Bu, FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerin farklı biyomoleküllerle nasıl etkileşime girdiklerini anlamak için kritik bir adımdır.

Hücrel etkileşimlerin incelenmesi, in vitro hücre kültürü ortamında gerçekleştirdi. Bu kapsamda, FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerin HeLa ve HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. MTT testleri kullanılarak HT-29 hücrelerine karşı nano-materyallerin sitotoksikite analizi yapıldı. Ayrıca, siRNA'nın FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'leri ile komplekslerinin zeta-potansiyel ölçümleri ve agaroz jel elektroforezi ile genetik materyal bağlama yetenekleri incelendi. Tümör hücrelerine karşı siRNA ile kompleks halindeki FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerinin sitotoksikite analizi de bu çalışmanın önemli bir parçasıdır.

Bu deneysel çalışmalar, dipeptit tabanlı nano-materyallerin potansiyel biyomedikal uygulamalarını anlamak için hayati öneme sahiptir ve bu materyallerin hücrelerle olan etkileşim mekanizmalarını aydınlatmaya yardımcı olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Peptit Temelli Nano-Materyaller

Peptit temelli nano-materyaller, biyomedikal uygulamalarda ve nanoteknolojide büyük bir potansiyele sahip olan ileri malzemelerdir. Bu nano-materyaller, özellikle ilaç teslimi, biyomedikal görüntüleme ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadır.

Peptit temelli nano-materyaller, kısa amino asit dizilerinden oluşan peptitlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşur. Bu peptitler, nanometre ölçeğinde yapılar oluşturmak için moleküler kendiliğinden düzenleme yeteneğine sahiptir. Bu nano-materyaller, genellikle biyouyumlu ve biyo-bozunur olmaları nedeniyle tercih edilir. Vücuda zarar vermeden doğal yollarla bozunabilirler ve toksik olmayan ürünler bırakmaktadırlar.

Peptit tabanlı nano-materyaller, hedeflenen ilaç teslimi uygulamalarında kullanılır. İlaç moleküllerini doğrudan hastalıklı dokulara yönlendirebilir ve sağlıklı dokulara zarar vermeden etkili tedavi sağlayabilirler. Doku mühendisliğinde, bu materyaller hücre büyümesi ve doku onarımı için iskeleler olarak kullanılır. Hücrelerin büyümesine ve farklılaşmasına yardımcı olabilirler. Peptit temelli nano-materyaller, kontrast ajanlar olarak da kullanılabilir. MR görüntüleme gibi tıbbi görüntüleme tekniklerinde daha net ve ayrıntılı görüntüler elde etmek için kullanılmaktadır.

Bu alanda hala çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Peptit dizilerinin tasarımı ve fonksiyonelleştirilmesi, bu materyallerin özelliklerini ve uygulamalarını genişletmekte önemli bir rol oynamaktadır.

Peptit temelli nano-materyallerin geliştirilmesi ve uygulanması, moleküler biyoloji, kimya, nanoteknoloji ve malzeme bilimi gibi disiplinler arası bir yaklaşım gerektirir. Bu malzemelerin geleceği hem teknolojik yenilikler hem de etik ve düzenleyici çerçeveler tarafından şekillendirilecektir.

2.1.1 Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesinden sorumlu etkileşimler

Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesi, kovalent olmayan ve dinamik kovalent etkileşimlerini içerebilmektedir. Bir çözücü içinde çözünen peptit, özel bir

konformasyon benimseyerek, kendiliğinden düzenlenmenin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirleyebilir. Peptitlerin kendi kendine düzenlenmeyi tercih ettikleri ikincil yapılar arasında α -sarmallar, β -tabakalar ve β -saç tokaları bulunmaktadır (Peters vd., 2016). α -sarmal, proteinlerde ana ikincil yapısal motif olarak kabul edilmektedir (Pabo vd., 2001).

Termodinamik olarak kararsızlıklarından dolayı, doğrusal peptitlerden α -sarmal yapılara sahip olanlar, orijinal ortamlarından ayrıldıklarında çözelti içinde bu konformasyonlarını kaybedebilirler. Bu nedenle, α -sarmal yapının kararlılığı, peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesini harekete geçirmek için önem arz etmektedir. Bu yapının kararlılığı için yan zincir çapraz bağlanması, hidrojen bağı, metal koordinasyonu ve tuz köprüsü oluşumu seçenekler arasında yer almaktadır (Liu vd., 2008).

Toshiki vd. (2009) tarafından sentezlenen bir peptit, iki set EK-K tuz köprüsü ile α -sarmal bir yapıya dengelendi ve kararlı nanoyapılara kendiliğinden düzenlendi. Kısa α -sarmal peptitler, kimyasal sentez ve modifikasyon kolaylığı sunar, ancak çözeltideki stabilite eksikliği nedeniyle zorluklar içerir.

Amdursky vd. (2010) tarafından bildirilen α -sarmal heptad peptitleri, peptit dizisine eklenen kodlanmamış bir α -aminoizobütirik asit kullanarak sarmal konformasyonun stabilizasyonunu sağladı. Bu çalışmalar, kısa α -sarmal peptitlerin kendiliğinden düzenlenme ve stabilizasyon konusundaki zorluklarına yenilikçi çözümler sunmaktadır. Çapraz bağlayıcılarla sınırlandırılmış peptitler, kısa sarmal peptitlerle kıyaslandığında, düşük moleküler serbest enerjileri ve yüksek stabilitelerinden dolayı peptit düzenlenmesi için daha çok tercih edilirler. Tiyoeter içeren bir yan zincire sahip bir peptit iskeletine dayanarak, Hu vd. (2016) beş amino asit içeren peptitlerden sarmal bobin nanofiberleri tasarlamıştır.

Hendricks vd. (2017) β -tabakanın aracılık ettiği peptit kendiliğinden düzenlenmesinin α -sarmalını ustaca stabilize edebileceğini ve böylece peptitin sulu nanoyapılara kendi kendine katılmasını sağlayabileceğini göstermiştir. β -tabaka aynı zamanda peptit moleküllerinde kritik bir ikincil yapısal motiftir. Hidrofilik ve hidrofobik uçlar içeren peptitlerin tipik bir temsilcisi olarak lego peptitleri verilebilir. Lego peptiti moleküler yapısından dolayı, sulu çözeltilerde hidrojen bağları yardımıyla β -tabakalı yapılar

oluşturabilir. Deiyonize su içerisinde, β -tabaka oluşumu ve alifatik uçların hidrofobik etkileşimlerden dolayı bir araya gelmesi, molekülleri nanolifler oluşturmaya zorlar. Yokoi vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada, arginin, aspartik asit ve alaninden oluşan bir peptit tasarlamıştır. Hidrofobik karaktere sahip olan alanin sulu çözelti içerisinde, sistemin sahip olduğu enerjisini düşürmek için bir araya gelirken, arginin ve aspartik asit elektrostatik etkileşimden dolayı birbirini çeker ve yapının dış katmanında yer alır. Alanin, su molekülleri ile temaslarını azaltmak amacıyla ve sonunda peptit zincirinin hidrofobik yüzeyini düzenli bir β -tabaka yapısı oluşturarak nanolif yapıya kendiliğinden düzenlenir. Oluşan nanoliflerle birlikte, peptitler β -tabakalı ikincil yapı olarak veziküller, nanotüpler veya diğer yapıları oluşturabilirler. Peptit nanotüplerin montajı, yüksek derecede sıralanmış, düzgün bir şekilde uyumlu antiparalel β -tabaka sistemi için ideal bir model sağlar (Clark vd., 1998). β -fırkete, esnek bir amino asit dizisi içeren peptit zinciri segmentini gerektiren β -dönüşümün bir türevidir. Schneider vd. (2002) tasarladığı peptitler β -fırkete yapısındadır. Bu peptitler, hidrofobik valin ve hidrofilik lizin amino asidi dizisinden oluşur. Çözeltinin pH değerlerini artırarak veya elektrostatik itmeyi korumak için çözeltinin iyon konsantrasyonunu artırarak, peptitler β -fırkete yapıları oluşturabilir ve dış yüzey olarak valin kalıntılarıyla ve ayrıca nanolifler oluşturmak için kendi kendine bir araya gelmek üzere hidrofobik etkisini kullanabilir. Monomerik peptitlerin difüzyonu, peptit yapılarına göre daha hızlıdır. Peptit monomerlerinin difüzyon kinetiğini kontrol ederek bu yapılar kontrol altına alınabilir (Wang vd., 2017).

Bu özellikten yararlanarak, sulu çözeltide bağ oluşumu veya bağ bölünmesi yoluyla peptit düzeneklerinin enzim talimatlı kendiliğinden düzenlenmesi (EISA) gerçekleşebilir. Biyolojik olarak önemli moleküllerin oluşumu ve dönüşümü genellikle enzimler tarafından katalize edilir ve bazı enzimlerin ekspresyon seviyeleri hastalıklarla ilişkilidir. Bu nedenle, EISA, hastalıkların teşhis ve tedavisi için nanomatyallerin yerinde kendiliğinden düzenlenmesini tetikleyebilir. EISA tarafından hücre ortamında üretilen peptit yapıları, biyomakromoleküler yapıları taklit edebilir. Örneğin, kısa bir peptit, naproksen ile entegre edilerek enzimatik substrat olarak kullanılabilir. Supramoleküler fosfoglikopeptit (sPGP), hücresel süreçlerde kovalent olmayan filamentlerin dinamik sürekliliği için kullanılır ve hücre davranışlarını lokal enzim aktivitesine göre kontrol edebilir (Wang vd., 2019).

Küçük moleküllerin enzimatik hidrojellemesi, üç temel adımdan oluşur: Enzim öncüyü bir hidrojenatöre dönüştürür, hidrojenatör nanofiberler halinde kendi kendine birleşir ve hidrojel matrisi oluşturur. Supramoleküler hidrojellerin oluşturulması, moleküler düzenlemeyi ve hidrojelatörlerin basit yapısını içerir (Estroff ve Hamilton, 2004). o-[bis(dimetilamino)fosfono] tirozin koruma stratejisi kullanılarak, programlanmış öncü, hücre içi ve dışı fosfataz tarafından hidrolize direnç gösterir ve lizozomdaki asit fosfataz, hidrojinin lizozomda kendi kendine montajını sağlar (Chen, 2004).

Bu süreçler, hücre içi süreçlerin ve hastalıkların tedavisinde peptit düzeneklerinin kullanılmasının potansiyelini göstermektedir.

2.1.1.1 Kovalent olmayan etkileşimler

Doğada yaygın olarak var olan kovalent olmayan etkileşimler karmaşık ve gelişmiş biyomoleküler yapıların oluşturulmasında büyük önem arz etmektedir. Bunlar arasında DNA'nın çift sarmal yapısı, proteinlerin ikincil veya daha yüksek dereceli yapıları ve hücre zarlarının fosfolipid çift katmanlı yapısı bulunmaktadır. Kovalent bağlara göre daha zayıf ve tersinir olan bu bağlar, tek başına zayıf enerji sunsalar da peptit monomerlerinin kararlı yapılar oluşturmaya katkıda bulunabilirler. Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesi süreci, kinetik ve termodinamik olarak yönlendirilen bir süreçtir (Wang vd., 2016).

Bu süreçte, peptitler arasındaki kovalent olmayan etkileşimler önemli bir rol oynar. Kovalent olmayan etkileşimler, moleküller arasında meydana gelen ve elektron paylaşımını içermeyen bağlardır. Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesinde bu etkileşimler, peptitlerin birbirlerine bağlanmasını ve stabil yapılar oluşturmalarını sağlar (Aydın ve Kesmen, 2020).

Hidrojen bağları, peptit zincirlerinin stabil üç boyutlu yapılar oluşturmada anahtar rol oynar. Van der Waals güçleri, zayıf olmalarına rağmen, peptit zincirlerinin yaklaşmasına katkıda bulunur. İyonik etkileşimler, yüklü amino asit kalıntıları arasındaki elektrostatik çekimi içerir. Hidrofobik etkileşimler, suda çözünmeyen amino asit kalıntılarının bir araya gelmesini sağlar. Ayrıca, aromatik yığılma ve

metal iyon koordinasyonu da öz-montajda rol oynayabilir. Bu etkileşimler, peptitlerin fonksiyonel ve yapısal özelliklerini şekillendirir.

Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesinde gözlemlenen başlıca kovalent olmayan etkileşim türleri şunlardır:

1. Hidrojen Bağları: Peptitler bol miktarda hidrojen bağı oluşturan bölgelere sahiptir (Steiner ve Koellner, 2001). Peptitler arasındaki en yaygın etkileşim türüdür. Bir molekülün hidrojen atomu ile başka bir molekülün elektronegatif atomu (genellikle oksijen veya azot) arasında oluşur. Bu bağlar, peptit zincirlerinin belirli şekillerde düzenlenmesine yardımcı olur (Edwards-Gayle ve Hamley, 2017). Hidrojen bağları, peptitlerin ikincil yapısını oluşturmak ve stabilize etmek için gereklidir ve peptitlerin farklı nanoyapılara montajını indükleyebilecek seçiciliğe ve yüksek yönlülüğe sahiptir. Bu nedenle, peptit düzenlenmesi için özellikle önemli bir itici güçtür (Krone vd., 2008).

2. Van der Waals Güçleri: Moleküller arasındaki geçici dipol etkileşimler sonucu meydana gelir. Bu kuvvetler zayıf olmakla birlikte, çok sayıda olduğunda peptitlerin bir arada tutulmasında önemli bir rol oynar (Rodriguez-Vazquez vd., 2014).

3. Elektrostatik etkileşimler: Kendiliğinden düzenlenmede kullanılan bir başka kovalent olmayan etkileşim türü, yükler arasındaki etkileşimdir. Peptitlerin pozitif ve negatif yüklü bölümleri arasında oluşan elektrostatik çekimdir. Bu etkileşimler, özellikle yüklü amino asitlerin bulunduğu peptitlerde önemlidir (Zhang vd., 1994). Elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağlarının ve hidrofobik etkileşimlerin kritik rollerine kıyasla, peptitlerin yapısal özgüllüklerini indüklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Richardson vd., 2015). Elektrostatik etkileşim, yönsüzdür ve hem elektrostatik çekim hem de itme içerir; bu, molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerde zayıf bağ enerjisine sahiptir. Elektrostatik etkileşimlerde iki önemli faktör olarak pH ve iyonik şiddet ön plana çıkmaktadır. Yapısında bazik veya asidik amino asitler barındıran peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesi, elektrostatik etkileşimler tarafından yönetilmektedir. Bu nedenle, peptitlerin kendiliğinden düzenlenme süreci, çözelti ortamının iyonik şiddeti veya pH'sı ile oynanarak kontrol altına alınabilir (Rehm ve Schmuck, 2010). İyonik-tamamlayıcı peptitler, kendiliğinden montajlanan moleküllerdir ve EAK16 (n-AEAEAKAKAEAEAKAK-

c) peptiti bu ailenin ilk üyesidir. EAK16'nın sulu ortamda kendine has bir düzenlenme şekli vardır: yüklü yan gruplar dışarıya, hidrofobik yan gruplar ise içeriye doğru yönelir. Bu düzenleme, nanolifler oluşturarak bir hidrojel ağı meydana getirir. İyonik-tamamlayıcı peptitler, yük dağılımlarının basit moleküler tasarımla değiştirilebilmesi özelliğine sahiptir. Bu sayede, farklı yük dağılımlarına sahip peptitler tasarlanabilir ve bu peptitler, farklı amino asit kalıntıları kullanılarak farklı özelliklerde üretilebilir (Wen vd., 2014; Tu ve Tirrell, 2004). Bu peptitler, sulu çözeltide β -tabaka yapıları oluşturur ve bu yapılar, fizyolojik koşullar altında son derece kararlıdır. Örneğin, EAK16-II tipi peptitler, yüksek sıcaklıklara ve çeşitli proteazlara karşı dirençlidir. Bu peptidlerin oluşturduğu membranlar, hücre yapışmasını destekleyen matriksler oluşturur ve çeşitli memeli hücre tipleri tarafından bağlanabilir. İyonik-tamamlayıcı peptitler, kemik, kırık, damar, kalp ve sinir sistemi gibi çeşitli dokularda hücre büyümesi ve farklılaşmasını destekleyebilir. Bu özellikleriyle, doku yenilenmesi, doku nakli ve yara iyileşmesi gibi *in vivo* çalışmalarda kullanım potansiyeline sahiptirler (Wen vd., 2014).

4. Hidrofobik Etkileşimler: Birçok çalışma, suda çözünür amfifilik polipeptit moleküllerinin rasyonel tasarımı için hidrofobik etkileşimlerin önemini göstermiştir. Amfipatik moleküller, hidrofobik kuyruklarını hidrofobik etkileşimler yoluyla agregatların iç kısmında toplama eğilimindeyken, hidrofilik başlıklar agregatların çevresinde ve su ile temas halinde açığa çıkar. Hidrofobik etkileşimler, kendiliğinden düzenlenmeyi tetikleme açısından, uygun entalpiden ziyade uygun entropi nedeniyle kararlıdır. Hidrofobik etkileşimler peptitin kendiliğinden düzenlenmesinde bağlanma enerjisinin zayıf olmasına rağmen, önemli bir rol oynar (Toksöz vd., 2010). Suda çözünmeyen (hidrofobik) peptit bölgeleri, su moleküllerinden kaçarak bir araya gelme eğilimindedir. Bu etkileşimler, peptitlerin belirli konformasyonları almasını ve stabil yapılar oluşturmalarını sağlar (Rodriguez-Vazquez vd., 2014).

5. π - π etkileşimler: Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesinde başka bir zayıf etkileşim olan π - π etkileşimleri de rol oynar. Esas olarak fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitler içeren peptit nanoyapılarında bulunur. π - π etkileşimlerinin suda çok kararlı olmasının sebebi aromatik gruplardan kaynaklı moleküllerin sınırlı çözünürlüğüdür (Zhu vd., 2010). Peptit yapı taşlarının aromatik kısımlarından kaynaklı olarak hidrofobik etkileşimler veya π - π etkileşimleri işlev görebilir.

Hidrofobik etkileşimlerde aromatik yapıların diziliminin genellikle düzensiz olduğu, π - π etkileşimlerde ise aromatik yapıların diziliminin sıralandığı görülmüştür (Toksöz vd., 2010).

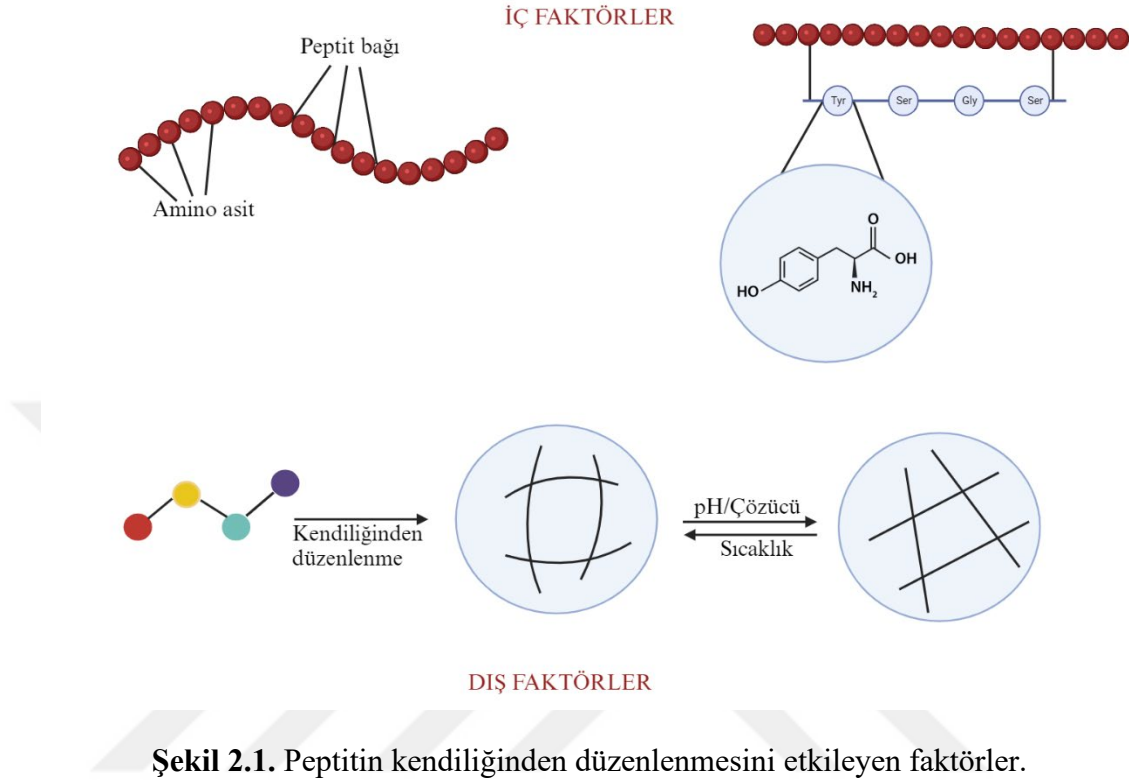
2.1.1.2 Peptit kendiliğinden düzenlenmesinde dinamik kovalent bağ

Peptitlerin kendi kendine birleşmesi, kovalent olmayan etkileşimlerin yanı sıra dinamik kovalent etkileşimlerinde içerebilmektedir. Sistein kalıntıları tarafından oluşturulan disülfid bağları ve aldehit ile amin gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan imin bağları gibi tersinir kovalent kimyalar, peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesine yardımcı olmaktadır ve bu geniş çapta araştırılmıştır. Wang vd. (2018) tarafından rapor edilen C3-glisin-sistein (Gly-Cys) dipeptit kolye taşıyan peptitler, ilginç bir sarmal fibril yapısı oluşturmuştur. Tiyol gruplarının oksidasyonu, disülfür bağları oluşturarak, bitişik yapı taşları arasında uzun sarmal liflerin solaklığını stabilize edebilir ve nanoyapıların genel stabilitesini artırabilir. Schröder vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, mekanik olarak birbirine kenetlenmiş peptitlerin sentezi yapılmış ve bu, çeşitli disülfid bağlı dinamik birbirine kenetlenmiş moleküler kütüphaneler oluşturulmuştur. Disülfür kimyasının yanı sıra, aril aldehit ve asil hidrazid işlevleriyle süslenmiş peptitler de peptit kuaterner düzenekleri oluşturmak için kullanılmıştır. Tamamlayıcı işlevlere sahip bir peptit karışımı, reaksiyona girerek ayarlanabilir halka boyutlarına sahip makro yapılar oluşturabilir. Daha da ilginç, reaksiyona giren peptitlerin oranlarının kontrolü ile karmaşık merdiven yapıları oluşturulabilir (Reuther vd., 2018). Peptit kendiliğinden düzenlenmesi, biyolojik sistemlerde, özellikle protein katlanması ve multimerik protein komplekslerinin oluşumunda önemli bir rol oynar. Ayrıca, biyomimetik malzemelerin tasarımında ve ilaç teslim sistemlerinin geliştirilmesinde de kullanılan bir mekanizmadır. Bu etkileşimlerin detaylı anlaşılması, peptit tabanlı nanoteknoloji ve biyomedikal uygulamalar için yeni kapılar açabilir.

2.1.2 Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen faktörler

Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen faktörler, içsel ve dış faktörler olarak kategorize edilebilir (Şekil 2.1). Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen dış faktörlerin incelenmesi, istenen peptit bazlı nanoyapıların rasyonel tasarımı için esastır. İçsel faktörler olarak amino asitlerin sayısı, dizilimi ve amino asit yan

zincirlerinin özellikleri sıralanabilir. Sıcaklık, pH, çözücü, ultrason gibi faktörler ise dış faktörler arasında yer alır. Peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen bu faktörlere müdahale ederek istenilen şekiller elde edilebilir.



Şekil 2.1. Peptitin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyen faktörler.

2.1.2.1 İçsel faktörler

Peptitlerin kendi kendine düzenlenmesini etkileyen iç faktörler, esas olarak amino asitlerin dizisini, sayısını ve hidrofilitik ile hidrofobik özelliklerini içermektedir (Cui vd., 2014). Yaygın olarak bilinen kendiliğinden düzenlenen yapılar arasında nanotüpler, nanofiberler ve nanobeltler bulunmaktadır. Kendiliğinden düzenlenme morfolojilerinin farklılıklarının ana nedeni olarak, farklı amino asit kalıntılarının yan zincirleri tarafından sağlanan elektrostatik, hidrofilitik veya hidrofobik etkileşimlerin değişmesi olarak sıralanabilir (Lee vd., 2013). Amino asit yan zincirlerinin doğası, peptitlerin kendiliğinden düzenlenme sürecinde hayati bir rol oynamaktadır. Örneğin, hidrofobik amino asitler, kendiliğinden düzenlenme hızında önemli değişikliklere yol açmaktadır (Liyanage ve Nilsson, 2016). Bu nedenle, peptit dizilerinin seçimi ve tasarımı, peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesini incelemek için çok önemlidir.

Difenilalanin ve analoglarının iyi düzenlenmiş nanotüplere kendiliğinden düzenlenebileceği çok sayıda çalışmada görülmektedir. Rechtes ve Gazit (2003)

difenilglisinin küresel nanometrik düzenekler oluşturabileceğini ortaya koymuştur. Difenilglisinin peptitinin özellikleri de difenilalanine benzer şekildedir. Yapılan TEM analizleri incelendiğinde, difenilalanin peptitlerinin nanotüpler oluşturduğunu, difenilglisin peptitlerinin ise aynı koşullar altında küresel nanometrik yapılar oluşturduğunu göstermiştir. Fenilglisinin yan zincirinde, fenilalanininkinde bulunan yan zincirdeki bir metilen grubunun eksikliği nedeniyle boru şeklindeki yapı küresel bir yapıya dönüştüğü görülmektedir (Qiu vd., 2018). Benzer hidrofobiklik ve yük özelliklerine sahip peptitlerde, amino asitlerin düzenlenme sırası, kendiliğinden düzenlenme yeteneğini ve morfolojisini etkileyebilmektedir (Meng vd., 2012). Lee vd. (2013) amino asit dizilerinin sırasının peptit kendi kendine birleşme morfolojisi üzerindeki etkisini araştırmışlardır (Lee vd., 2013; Gao ve Matsui, 2005). Farklı amino asit dizilerine sahip peptitlerin, asidik koşullar altında farklı morfolojik yapılar oluşturduğu görülmüştür. Bu bulgular, amino asit dizisi modellerinin, peptitlerin genel hidrofobikliği ve yükleri çok yakın olsa bile, kendiliğinden düzenlenme yeteneği ve morfolojisi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Yapıda bulunan amino asitlerin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri ve dizilimleri, polipeptitin kendiliğinden düzenlenme yeteneği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Başka bir çalışmada Meng vd. (2012) peptidin kendiliğinden düzenlenmesi üzerinde hidrofilik ve hidrofobik karakterli amino asitlerin türü ve sayısındaki sistematik değişikliklerin etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Peptitlerin hidrofobikliği, glisin gibi daha lipofilik bir amino asit kullanılarak artırılmıştır. Bu da kendiliğinden düzenlenen nanoyapıların morfolojisini veziküllerden tüplere ve liflere dönüştürmüştür. Bu sonuçlar ve diğer çalışmalar, nanoyapı morfolojilerinin peptit dizileri ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, peptit dizilerini değiştirerek kendiliğinden düzenlenen nanoyapıların morfolojisini ayarlamak mümkün kılmaktadır. Bu durum, yeni peptit nanomatemeryalleri tasarlamak için değerli bir yol olarak görülmektedir (Xu vd., 2009). Wang vd. (2018) A6K ve A9K peptitlerinin dinamik kendi kendine toplanmasını gözlemlemişlerdir. Nötr pH'ta, A6K başlangıçta küçük küresel çökeltiler halinde kendi kendine birleşir ve kısa nanofiberler için bir yapı taşı olarak büyük peptit nanoagregalarına kaynaşır. A9K'nın kendi kendine montaj kinetiği daha hızlıdır ve başlangıçta küçük nanoagregalar oluşturulur, ardından çapları 3-4 nm civarında ve uzunluğu 100 nm'den az olan nanoçubuklar oluşturulur (Xu vd., 2009). Kendi kendine

birleşme sırasında gözlemlenen farklılıklar, hidrofobik peptit kuyruğunun uzunluğundaki artışa ve bu artışın kritik agregasyon konsantrasyonlarını azaltırken entropi kazancını ve elektrostatik etkileşimleri artırmasına bağlanabilir.

2.1.2.2 Dışsal faktörler

Peptitin kendiliğinden düzenlenmesi, amino asitlerin doğası ve dizilimlerinin yanı sıra çevresel faktörlerden de etkilenir. Burada, esas olarak sıcaklık, pH, çözücü ve ultrasonun peptit kendi kendine montajı üzerindeki etkileri ele alınmaktadır.

a) Sıcaklık;

Hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları, sıcaklık değişikliklerinden etkilenmektedir. Sıcaklık arttığında, hidrojen bağlarının etkisi zayıflarken, hidrofobik etki artmaktadır. Bu nedenle, farklı sistemlerde peptitlerin kendi kendine toplanmasına bu iki etkileşim türü farklı şekillerde katkıda bulunmaktadır ve sıcaklık değişikliklerinin kendi kendine birleşme davranışı üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir (Tin  vd., 2011). L-EAK16'nın ikincil yapısı, sıcaklık artırılıp azaltıldıkça değişiklik göstermemektedir. Ancak D-EAK16, 25  C'de  -yaprak konformasyonu sergilerken, sıcaklık 110  C'ye yükseldiğinde   sarmalına dönüşmektedir. Sıcaklık tekrar düşürüldüğünde, ikincil yapı  -sarmal konformasyonu olarak kalmaktadır. Bu da ikincil yapı dönüşümlerinin geri dönüşümsüz olduğunu ortaya koymaktadır. Suda çözünen DAR16-IV peptiti,  -sarmal yapıya sahipken, birkaç gün boyunca 4  C'de bekletildikten sonra stabil bir  -tabaka yapısına bürünmektedir. Sıcaklık yükseltildiğinde ise  -tabaka yapısı doğrudan kararlı bir  -sarmal konformasyona dönüşmektedir. Bu kinetik süreç geri dönüşümsüzdür. Ancak, birkaç hafta 23  C'de saklandıktan sonra, yapı yeniden   sayfalık bir yapıya dönebilmektedir (Luo vd., 2008).

b) pH Değeri;

Farklı pH koşullarında, peptitlerin amino asit yan zincirleri, farklı yük eğilimleri sunmaktadır (Goldberger vd., 2011). pH değişiklikleri, amino asitlerin protonasyon derecesini değiştirebilir. Bu durum, peptitlerin elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerini etkileyerek, belirli bir morfolojiden diğerlerine geçişlerini sağlayabilir.

Asidik koşullarda (pH 3,5), peptit moleküllerinin içinde güçlü elektrostatik itme kuvveti vardır, bu da peptitin uzun nanolifler oluşturmalarını engeller. Alkali koşullarda (pH 12,5) ise, peptit molekülleri genellikle nötr karakter sergiledikleri için, β -tabakalarının oluşmasını zorlaştırır. Peptitlerin yüzey yükü, yapıda iyon çiftlerinin oluşmasıyla korunur. Güçlü elektrostatik çekim, hidrofilik amino asitlerin bir araya gelmesine ve hidrofobik Ala tabakasının suya maruz kalmasına neden olur, bu da çözünürlüğü azaltır ve çökelmeye yol açar (Li vd., 2022).

c) Çözücü;

Çözücü, peptitlerin kendi kendine montajının morfolojisine önemli bir etki yapabilmektedir ve bu, nanofiber yapının kiral ters çevrilmesine dahi neden olabilmektedir. Huang vd., 2011 difenilalanin peptidinin (L-Phe-L-Phe, FF) farklı çözücülerdeki davranışını inceledi. Elde edilen sonuçlar, difenilalaninin kendiliğinden düzenlenmesinin içi boş boru şeklindeki yapılar oluşturduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, asetonitrilin suya karıştırılmasıyla mikrotüpler ve lifler oluşmaktadır. Asetonitril oranı arttıkça, mikrotüpler kaybolmakta ve saf asetonitril çözücünde küçük boyutlu, oldukça homojen peptit nanolifler elde edilebilmektedir.

Yang vd. (2009) uzun alkil zincirlerine sahip D- ve L-alaninlerden oluşan dört dipeptit sentezledi (Li vd., 2013). Bu dipeptitlerin su ve tetrahidrofuran (THF) içerisindeki kendiliğinden düzenlenme davranışlarını incelediler. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) görüntüleri, bu dipeptitlerin bükülmüş nanoribonlar şeklinde organize olduğunu ve terminal alanin kiralitesinin nanoribonların morfolojisini kontrol ettiğini göstermektedir. Daha da ilginç olanı, iki farklı çözücünde oluşan nanoribonların morfolojilerinin zıt olmasıdır.

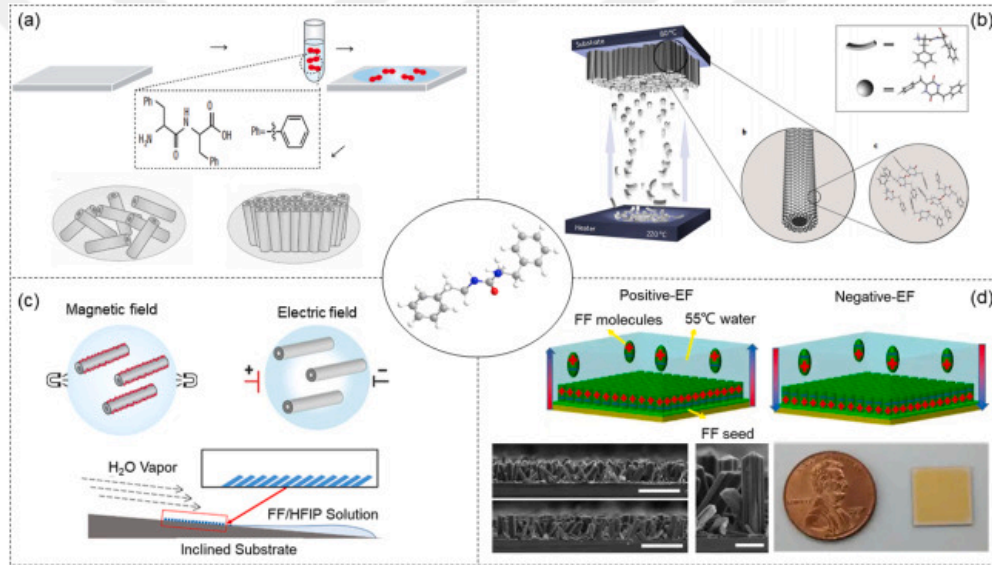
2.1.3 Difenilalanin (FF) peptidinin kendiliğinden düzenlenmesi: sentez ve özellikleri

FF peptiti, fenilalanin amino asitlerinden oluşan kısa bir dizidir ve bu yapı kendiliğinden düzenlenme yeteneğine sahiptir. Bu yetenek, peptitlerin nano ölçekte yapılar oluşturmalarını sağlamaktadır. FF peptidinin sentezi, genellikle katı faz peptit sentezi yöntemi kullanılarak basit ve etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Kendiliğinden düzenlenme sürecinde, FF peptiti hidrofobik etkileşimler ve π - π

etkileşimleri aracılığıyla nano lifler veya diğer nano yapılar oluşturabilmektedir. Bu yapılar, özellikle ilaç taşınması ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda potansiyel kullanımlara sahiptir. FF peptitinin bu özel özellikleri, nanoteknoloji ve biyomühendislikte yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesini sağlamaktadır (Bozdoğan, 2017).

2.1.3.1 Peptit nano-materyallerin sentezi

Difenilalanin, β -amiloid kendiliğinden düzenlenen peptitlerden türetilen en küçük aromatik dipeptittir ve kendi kendine birleşerek nano mimari oluşturabilmektedir. Difenilalanin (FF)'in kendiliğinden düzenlenmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 2.2) (Nguyen vd., 2016).



Şekil 2.2. Peptit Nano-materyallerin Sentezine ilişkin çeşitli metodolojiler (Nguyen vd., 2016).

Şekil 2.2 peptit nano-materyallerin sentezine ilişkin çeşitli metodolojileri göstermektedir. (a) Organik bir çözücü içinde çözünmüş dipeptit monomeri, silikonlaştırılmış cama uygulandığında dikey olarak düzenlenen bir peptit nanotüp dizisinin oluşumuna neden olmaktadır. (b) Buhar biriktirme tekniğinin şematik gösterimi yer almaktadır. (c) FF nanotüplerinin dış alanlar veya farklı kristalleşme modları aracılığıyla hizalanması kontrol edilebilmektedir. (d) Dikey FF peptit mikro çubuk dizisinin büyümesi ve kontrolü sağlanmaktadır (Nguyen vd., 2016).

a) Çözücü kontrolü;

Reches vd. (2006) FF dipeptitlerin çözelti içinde kendi kendine montajı yoluyla FF nanotüplerin keşfedilmesinden bu yana, FF tabanlı kendiliğinden düzenlenmesi ile ilgili araştırmalar ilgi çekmektedir. Homo-aromatik dipeptit motifinin, nano boyutlarda fibril ve küresel yapıların oluşabildiği gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada, HFIP içinde çözülmüş monomer yapı taşlarının yayılmasıyla elde edilen ve ılıman koşullar altında buharlaşma ile indüklenmiş nano ormanlar oluşturulmuştur. Bu model, HFIP içinde çözülmüş monomer yapı taşlarının silikonlu cam üzerine yayılmasıyla elde edilmiştir. HFIP çözücüsünün hızlı buharlaşması, aromatik parçanın geometrik olarak sınırlı birikimini ve yapının düzenli organizasyonunu teşvik edebilir (Wen vd., 2014).

b) Kimyasal ve fiziksel buhar birikimi;

Shklovsky vd. (2010) "aşağıdan yukarıya" kendi kendine montaj sürecini ve "yukarıdan aşağıya" ortak püskürtme tekniği olan fiziksel buhar biriktirme işlemini birleştirerek yeni peptit nanotüpleri (PNT'ler) geliştirdi. Bu süreç, nanoteknolojinin gelişimine katkıda bulunabilecek yeni PNT modellemelerini mümkün kılar. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, nanotüplerin genellikle eşit dağıldığını ve çaplarının 50 ile 300 nm arasında değiştiğini göstermektedir. Nanotüplerin ortalama uzunluğu, kalınlığı ve yüzey ayarlanmasıyla biriktirme parametrelerinin yoğunluğu kontrol edilebilmektedir. Bu yöntem, geniş alanlarda biyolojik elementlerin kullanımını sağlayarak benzersiz optik ve elektrokimyasal özelliklere sahip PNT'lerin elde edilmesine olanak tanır (Adler-Abramovich vd., 2006).

c) Manyetik alan kontrolü;

Abramovich vd. (2006) yoğun bir peptit nanotüp dizisinin eksenel tek yönlü büyümesiyle bir nanoorman oluşturulabileceğini ve bu nanotüplerin yatay olarak hizalandığını göstermişlerdir. Mükemmel mekanik ve kimyasal stabiliteye sahip olan peptit nanotüpler, fonksiyonel gruplarla modifiye edilebilmektedir. Kontrol edilebilir düzenlemeleri sayesinde, çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaları mümkündür, özellikle hassas sensörlerde, nanomekanik ve nanoakışkan cihazlarda etkili olabilmektedirler (Wen vd., 2014).

d) Elektriksel alan kontrolü;

FF nanotüpler, piezoelektrik bir nano jeneratör olarak kullanılabilir potansiyel bir biyo-malzemedir. Nguyen vd. (2016) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, tamamen kontrollü polarizasyon ile FF peptit mikro çubuklarının büyümesini göstermiştir. Bu mikro çubuklar, FF' in konsantre bir çözeltisi içinde büyümüştür. Bu çalışmada elektrik alanı uygulanan bir film ile kaplanmış substrat kullanılmıştır. FF peptitinin kendiliğinden düzenlenmesi sırasında, FF moleküllerinin elektrik dipolleri uygulanan elektrik alanına boyunca yerleşmiştir (Kelly vd., 2015). Bildirildiği üzere, biriken FF moleküllerinin oryantasyonu, mikro çubukların polarizasyonunu belirlemektedir. Bu sebeple, mikro çubukların polarizasyon yönü, uygulanan elektrik alanının yönüyle aynı olmaktadır.

2.1.3.2 Amid fonksiyonel grubu

Amid grupları, peptitlerin yapısal bileşenleridir ve bu materyallerin biyolojik ve fiziksel özelliklerini etkiler. Amid grupları, peptitlerin hücre yüzeyi reseptörleriyle, hücre içine giriş mekanizmalarıyla ve hücre içi hedeflerle etkileşimini belirler. Amid gruplarının kimyasal modifikasyonları, peptit temelli nano-materyallerin işlevselliğini artırabilir (Altuntaş ve Gök, 2020). Amidler, karbonil grubuna bağlı bir azot atomu içeren organik bileşiklerdir. Amidlerin reaktivitesi, karbonil grubunun elektron çekici etkisi ve azotun ortaklanmamış elektron çiftinin rezonans etkisi ile belirlenir. Amidler, karboksilik asit türevleri arasında en az reaktif olanlardır. Amidler, nükleofilik asit (açıl) yer değiştirme (süstitüsüyonu) tepkimelerine girebilirler. Bu tepkimelerde, amid grubunun yerini başka bir grup alır. Amidlerin reaktivitesi, amid grubunun yerine gelen grubun kararlılığına da bağlıdır. Amid grupları, peptitlerin yapısal bileşenleridir ve bu materyallerin biyokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerini etkiler. Amid grupları, asidik veya bazik özellik gösterebilir, ancak bu özellikler peptitlerdeki rezonans stabilizasyonu nedeniyle zayıflar. Amid gruplarının asit-baz özellikleri, peptitlerin hücre zarlarından geçiş yeteneğini, hücrel enzimlerle etkileşimini ve hedeflenen hücrelere bağlanma yeteneğini belirler. Amid gruplarının asit-baz özellikleri, pH'a duyarlı nanomateryallerin tasarımında ve uygulamalarında kullanılabilir (Kelly vd., 2015).

2.1.4 Peptit nano-materyallerin özellikleri

a) Termostabilite ve mekanik stabilite;

Esnek cihazlar için peptit nano-materyallerin istenen özellikleri arasında termostabilite ve mekanik stabilite yer almaktadır. Nano-materyallerin özelliklerini anlamak, bu malzemelerin uygulamalarını araştırmak için çok önemlidir. Önceki çalışmalar, sulu ve kuru koşullar altında peptit nanotüplerin termostabilitesini gözlemlemiştir (Adler-Abramovich vd., 2006). Peptit nanotüpler su içinde, kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda mükemmel stabilite göstermektedir. Yapılan termogravimetrik analizler, peptit nanotüplerin yüksek sıcaklıklarda dayanıklılığını ortaya koymaktadır. Peptit nanotüpler 150 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda, stabil kalabilmekte ve ısıya maruz bırakılmamış nanotüplerle aynı morfolojiyi sergilemektedirler.

Sedman vd. (2006) AFM analizleriyle ısıtmadan sonra nanotüplerin yapısal stabilitesini gözlemlemiştir. Ancak FF nanotüpler, 150 °C'de uzun süre ısıtıldığında yapısal bütünlüklerini kaybetmektedirler. Nanotüplerin morfolojisi ve boyutu sıcaklık 100 °C'nin altına düştüğünde değişmeden kalmaktadır. Ancak, 100 °C'de, nanotüpler fenilalanin salınımı nedeniyle bozulmaktadır. AFM görüntüleri incelendiğinde, sıcaklık artışıyla nanotüplerin deforme olduğunu ve enine kesitin tepesinde bir oluğun oluştuğunu ortaya koymaktadır. Ek olarak, nanotüplerin pürüzsüz dış duvar morfolojisi kaybolmakta ve nanotüp eksenine boyunca morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Nanotüpler, sıcaklık 150 °C'ye yükseldiğinde, uzamsal hacimlerini kaybetmekte ve düz bir şeride benzer bir yapı oluşturmaktadır. Sıcaklık 150 °C'ye kadar yükseldiğinde, sabit bir AFM görüntüsü oluşturulamamaktadır.

b) Yarı iletkenlik ve iletkenlik;

Nano endüstrilerde organik malzemelerin kullanımı son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Peptitler bu alanda en çok çalışılan biyo-organik moleküllerdir (Gazit, 2007). Bazı doğal proteinlerin doğal yarı iletken özelliklere sahip olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Kısa peptitlerden oluşan kendi kendine birleşen yapılar da yarı iletken özelliklere sahip olabilmektedir. Geleneksel yarı iletken malzemeler doğal sınırlamalara sahipken, geliştirilen peptit nanoyapıları, hem biyo-esinlenmiş hem de dayanıklı nano ölçekli yarı iletkenler olarak kullanılabilir. Yarı iletken özellikleri

kolayca ayarlanabilir, katkılı hale getirilebilir ve işlevselleştirilebilir (Amdursky vd., 2010).

c) Piezoelektrik;

Birçok doğal biyo-malzeme, polar bağların ve doğal asimetrinin varlığı nedeniyle zayıf piezoelektrik özelliklere sahiptir. Bu malzemeler, modern nanoteknoloji için önemli bir mihenk kabul edilmektedir. Özellikle difenilalanin (FF), benzersiz piezoelektrik özellikleri nedeniyle büyük ilgi uyandırmaktadır. FF peptitleri üzerine yapılan çalışmalar, bu malzemeleri biyouyumlu bir platforma dönüştürmeye yönelik önemli bir adım atmaktadır (Shamos ve Lavine, 1967).

FF peptitleri, güçlü piezoelektriklik dahil olmak üzere birçok ilgi çekici özelliğe sahiptir ve akıllı bir malzeme olarak büyük potansiyel taşımaktadır. Ancak, FF peptidinin antiparalel polarizasyonu ve zayıf piezoelektrik katsayıları, uygulamalarını sınırlamaktadır (Gan vd., 2013).

d) Optik özellikler;

Kendi kendine montaj işlemi sırasında, aromatik sistemlerin π -elektronlarının delokalize olması ve hidrojen bağlarının serbest protonlarının aktarılması sonucunda peptit supramoleküler yarı iletkenler, uyarma altında eksen boyunca sürekli foton yayabilir. Bu durum, peptitleri optik dalga kılavuzlarına dönüştürmektedir (Berger vd., 2015).

Peptit bazlı kuantum sınırlı nanoyapılar, kısıtlı delikler ve elektronlar arasındaki zorlanmış Coulomb etkileşimi nedeniyle, özgül absorpsiyon ve lüminesans özelliklerine sahip eksitonlar oluşturabilir (Adler-Abramovich vd., 2009).

Aromatik halkaların etkileşimi, uzamsal konjugasyon yoluyla açıklanabilir. Hidrojen atomları, hidrojen bağlarındaki verici ve alıcı gruplar arasında mekik dokuyabilir. Elektronik yapıdaki değişiklikler, enerji bandı aralığını azaltarak fotolüminesansın kırmızıya kaymasını sağlayabilir. Kristal yapıdaki moleküler rotasyon ve titreşimin sınırlandırılması, moleküller arasındaki enerji transferini engelleyebilir, böylece cihazın optoelektronik uygulamalarda kullanılmasını sağlayabilir (Kelly vd., 2015).

2.1.5 Peptit nano-materyal uygulamaları

2.1.5.1 Süper kapasitör

Peptit nanotüp (PNT)'lerin piezoelektrik, termostabilite ve elektrokimyasal özellikler gibi çeşitli uygun fiziksel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Belirtilen bu özellikler sayesinde, PNT'ler, süper kapasitörler (SC) için potansiyel elektrot malzemeleridir. Ancak, SC'ler düşük enerji yoğunluğu problemine sahiptir. Daha büyük spesifik yüzey alanlarına sahip elektrot malzemelerinin geliştirilerek bu sorun çözülebilir. Süper kapasitörlerde elektrot malzemeleri olarak karbon malzemeler yaygın kullanılmaktadır. PNT'ler ile modifiye edilmiş olan karbon elektrot, kapasitansı önemli ölçüde artırmaktadır (Adler-Abramovich vd., 2009). Peptit nanotübünün nano ölçekli hidrofilik kanalındaki ıslak yüzey alanı, kapasitansını etkileyen kritik bir faktördür. Metal oksitler, elektrokimyasal olarak aktif malzemeler olarak, elektrot üzerindeki redoks reaksiyonunu hızlandırabilir ve elektrotun enerjisini ve kapasitansını artırabilir. Peptit bazlı nanoyapıların metal oksitlerle birleştirilmesi, yüksek performanslı süper kapasitörler için yeni bir elektrot türü üretebilir. Peptit, elektrolit içinde hafifçe çözünür ve bu, döngüsel stabilite testinde cihazın kapasitansında hızlı bir azalmaya neden olur. Bir TiO_2 filmi, peptidin yüzeyine yatırıldığında, kapasitörün performansını artırabilir. Hu vd. (2018a) kendi kendine montaj FF nanotüplerin yüzeyinde TiO_2 oluşumunu incelemiş ve süper kapasitörlerde uygulanmasını araştırmıştır. Yapılan çalışmada kapasitansın %95'in üzerinde tutulduğu ve mükemmel stabilite ve kapasite sergilendiği gözlemlenmiştir.

Hu vd. (2018a) süper kapasitörler için aktif malzemeler olarak peptit düzeneklerinin enerji depolama özelliklerini araştırdı. Dört grup peptit molekülünün elektrokimyasal özellikleri düzenli olarak karşılaştırıldı. Sonuçlar, peptit malzemelerinin enerji depolama kapasitesinin peptit dizileri tarafından kontrol edilebileceğini ortaya koydu. Döngüsel voltametri, sabit akım şarjı ve deşarjı ve diğer elektrokimyasal ölçüm yöntemleri ile kiralite kaynaklı sarmal peptit malzemelerinin spesifik kapasitans özelliklerine, kararlılığa ve hıza sahip olduğu kanıtlandı (Hu vd., 2018b). Xiong vd. (2019) giyilebilir süper kapasitörlerin uygulanmasında yüksek beklentilere sahip olan yeni bir çekirdek-kabuk nano-tuğla yapısı olan peptid-Co'yu önerdi. Giyilebilir elektronik cihazlar için bu sistem daha iyi bir güç kaynağı performansı ortaya koydu. Peptitin Co ile entegrasyonu, mükemmel kararlılık ve esneklik nedeniyle ideal süper

kapasitörler sunmaktadır. Nguyen vd. (2021) polipeptit katotların ve anotların, tam polipeptit pillerdeki redoks aktivitelerini ve davranışlarını belirlemek amacıyla polipeptit bazlı bir pil üretti. Her bir peptidi bir lityum metal yarım hücreye monte ederek pilin enerji depolama özelliklerini ortaya koydular. Metal içermeyen, polipeptit bazlı bu pilin geri dönüştürülebilirliğini göstermek için bozunma ürünleri belirlendi. Polipeptit bazlı pil, 37,8 mAh şarj kapasitesine ulaşabildiği ortaya konuldu. Bu çalışmalar, peptit bazlı nano-materyallerin enerji depolama uygulamalarındaki potansiyelini göstermektedir.

2.1.5.2 Biyoalgılama

Peptitin konformasyonu dış stimülasyon altında değişebilir ve bu değişim, tanıma işlevini de etkiler. Kendiliğinden düzenlenen peptitler, biyoalgılamada önemli bir rol oynayabilir ve moleküler bir tanıma işlevine sahip olacak şekilde tasarlanabilir (Nguyen vd., 2021). PNT'ler, elektriksel özellikleri nedeniyle yükselen nano ölçekli cihazlar için umut verici çok işlevli moleküller olarak kabul edilir. PNT'ler ve biyomoleküller arasındaki spesifik etkileşimlere bağlı olarak, PNT'ler biyoalgılama uygulamalarında kullanılabilir (Gao ve Matsui, 2005). PNT, tanıma işlevini bozmadan virüs antikorlarını bağlayabilir, bu da PNT tabanlı sensörleri hem hassas hem de çok yönlü kılar. Böyle bir sensör, mikrometrik bir boşlukla ayrılmış iki elektrottan oluşabilir (Rica vd., 2008). Yemini vd. (2005) kendiliğinden düzenlenen peptit nanotüplere dayalı oldukça hassas bir amperometrik biyosensör tasarladı. Model enzim sistemleri olarak alkol dehidrogenaz (ADH) ve glikoz oksidaz (GOx) kullanılarak sensörün üstünlüğü ortaya konuldu. Peptit nanotüp elektrotun ve çıplak elektrotun hidrojen peroksit tepkileri karşılaştırıldığında, modifiye edilmiş elektrotun tepki akımı çıplak elektrotunkinden önemli ölçüde daha yüksek bulundu. GOx modifiye edilmiş peptit nanotüp elektroda sürekli olarak 0,2 mM glikoz eklenmesi sonucunda, peptit nanotüp bazlı elektrotun anotundaki akım hemen arttı ve birkaç saniye içinde kararlı bir duruma ulaştı (Wang vd., 2001). Literatürde bimetalik Pt/Pd nano-materyallere dayalı matris metaloproteinaz 2 (MMP-2) tespiti için elektrokimyasal peptit bazlı biyosensörün hazırlanması da bildirilmiştir. Pt/Pd/mhCeO₂'nin mükemmel katalitik kapasitesi sayesinde biyosensörün analitik performansı önemli ölçüde iyileştirilmiştir. MMP-2'nin doğru bir şekilde tespit edilmesi için Pt/Pd/mhCeO₂ nanomatemateryallerini kullanmak etkili bir strateji olarak

belirlenmiştir (Xu vd., 2016). Ayrıca, peptit nanotüpleri diğer biyolojik malzemelerle birleştirilerek yenilikçi hibrit malzemeler oluşturulabilir. Nanometre boyutunda peptit-polimer hibrit nanotüpler hazırlamak için Peptit nanotüpler, kullanılmıştır. Bu ve benzeri çalışmalar, peptitlerin biyoalgılamada tanıma elemanları olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bir fotoakustik boya, bir antibakteriyel ajan ve bir enzime duyarlı bağlayıcıdan oluşan yeni bir moleküler prob, bakteriyel enfeksiyonun gerçek zamanlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesine olanak tanımıştır (Li vd., 2016). *In vivo* montajın neden olduğu tümör retansiyonu da bildirilmiştir. Bellat vd. (2018) tümöral dağıtım verimliliğini optimize edebilen, şekil kontrollü tümöral dağıtım, şarj destekli penetrasyon ve enzim kaynaklı ilaç tutma kombinasyonunu kullanarak birden fazla bileşenden oluşan, kendiliğinden düzenlenen bir nanofiber öncüsü (NFP) önerdi. Cheng vd. (2018) ise kontrollü ilaç salınımı ve tümör hedefli dağıtım için ikili duyarlılık ve terapötik potansiyele sahip bir terapötik peptit nano-materyali sentezledi. Zhang vd. (2015) ise nanofiberlere kendiliğinden düzenlenen enzime duyarlı bağlayıcı olarak bir Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly (PLGVRG) peptitinden oluşan küçük bir moleküler öncü tasarladı. Düzenlenmenin neden olduğu tutma etkisi nedeniyle, foto akustik görüntüleme sinyali ve terapötik etkinliği iyileştirildi. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde ve enzim inhibitörlerinin taranmasında, spesifik peptit dizisi, hayati bir rol oynamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, peptitler hassas ve kullanışlı biyosensörlerin geliştirilmesi için ideal adaylardır. Yukarıdaki örnekler, peptit temelli nanomateriyallerin biyoalgılamasının malzeme araştırması, nanobilim ve moleküler biyoteknoloji disiplinlerini birleştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu multidisiplinler yaklaşım, yeni biyo-nanoalgılama teknolojisi alanının geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2.1.5.3 İlaç dağıtımı

Kimyasal çeşitlilikleri, biyouyumlulukları ve hedef proteinlere spesifik bağlanmaları gibi avantajlarından dolayı peptit bazlı nanoyapılar, diğer dağıtım platformlarına göre üstünlük göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde, ilaç dağıtımı gibi uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptirler. Kanser tedavisinde etkili bir yöntem olarak doksorubisin ile konjuge edilmiş peptitlerden kendiliğinden düzenlenen nano-materyaller kabul görmektedir. Rubert vd. (2014) peptit temelli nanoliflerin aljinat ile birleştirilmesi için bir yöntem önermiştir. Bu yöntemde, doksorubisin aljinat çekirdeğe

konjuge edilirken, kabuk folat reseptörünü hedeflemek için işlevselleştirildi (Rubert vd., 2014; Hartgerink vd., 2002). Bu yaklaşım, ilaç dağıtımını hedefe yönelik olarak iyileştirerek kanser tedavisinde potansiyel faydalar sağlayabilir. Nükleik asit ilaçları viral enfeksiyonlar, kanser ve AIDS tedavisinde kullanılmaktadır. siRNA'nın sentezi kolaydır ve teorik olarak herhangi bir proteini hedefleyebilir, bu nedenle siRNA ilaçları son yıllarda giderek daha fazla ilgi çekmektedir (Bumcrot vd., 2006). Ancak, RNA ilaçları kolayca bozulabilir ve hücre zarlarına nüfuz etmekte zorlanır; bu nedenle, verimli ve biyouyumlu nükleik asit dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi zorunludur (Mingozzi ve High, 2011).

Polipeptitler, canlı organizmalarda doğal olarak bulunan bir biyomolekül sınıfı olarak oldukça biyouyumlu olup, etkili nükleik asit taşıyıcıları olarak kabul edilmişlerdir ve biyotıpta uygulamaları büyük ilgi çekmiştir. Geleneksel olarak kullanılan ilaçlar, *in vivo* hızlı metabolik klerens nedeniyle zayıf etkinliğe sahipken, nano ilaçlar ilaç çözünürlüğünü, tümör pasif hedeflemesini ve kan dolaşım süresini iyileştirebilir (Antaris vd., 2016). Liang vd. (2022) tasarladıkları TCASS sisteminde küçük moleküllü peptitler, tümörlerde aşırı eksprese edilen XIAP'ı spesifik olarak tanıyor, bu da tümör hücrelerinde kaspaz-3'ün aktivasyonunu tetikliyor. Böylece moleküler eklemeyi, zenginleştirmeyi ve tümör dokularında kendiliğinden düzenlenen nanoyapıların tutulmasını sağlıyor (An vd., 2019). Anti-kanser kemoterapi ilacı olarak kullanılan taksol, klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, taksolun suda zayıf çözünürlüğü, uygulanma alanını sınırlamaktadır. Di-fenilalanin türevleri tarafından oluşturulan metal nanopartiküller kadar sert olan nanosferler, tek sarmallı DNA ve kuantum noktaları sağlamak için kullanılabilir (Adler-Abramovich vd., 2010). Moleküler hidrojeller, ilaç dağıtımını için büyük bir potansiyele sahiptir. Taksol türevinin (Tax-SA-GSSG) ester bağı, katı tümörlerin büyümesini ve metastazını engelleyebilecek bir hidrojeli oluşturmak üzere hidrolize edildiği bir çalışmada belirtilmiştir. Taksolun kemoterapi sırasındaki yan etkileri, kandaki taksol konsantrasyonunu düşüren taksol hidrojellerin lokal olarak uygulanması nedeniyle azaltılabilir (Wang vd., 2012).

2.2 Peptit Temelli Nano-Materyallerin Hücresel Etkileşimleri

Son yıllarda, nanofiber, nanopartikül ve nanotüp formundaki doku iskelelerinin kök hücre kaderi üzerindeki etkileri yoğun olarak incelenmiştir. Nanofiberler, sentetik ve

doğal polimerlerden üretilmekte ve bu materyaller arasında FDA tarafından onaylananlar da bulunmaktadır, örneğin, antikanser ilacı Taxol ile nanopartikül formunda bağlanan Abraxane™ veya kalsiyum ve fosfat nanokristallerinden oluşan NanoOss™ gibi. Bununla birlikte, kök hücre farklılaşması için bu materyallerin kombinasyonları ile oluşturulan nano-iskeleler, henüz tam olarak keşfedilmemiş bir alandır. Nanomateryallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin nano boyutlarda önemli ölçüde değiştiği genel kabul görmüş bir gerçektir. Bu sebeple, FDA onayı öncesinde nanomateryallerin güvenli kullanımları hakkında kapsamlı araştırmalar gerekmektedir (Zhao vd., 2013).

2.2.1 Nano-materyal iskelelerin yüzey karakteristikleri

Nano-materyallerin yüzey topografileri (örneğin düzenli veya rastgele desenler) ve kimyasal kompozisyonları, hücrelerin adezyon, göç, proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini etkileyebilir. Omurgalıların dokularında bulunan hücresel mikroçevrelerin yüzeyleri, çeşitli topografik desenlerle (oluklar, çıkıntılar, çukurlar) zenginleştirilmiştir (Martino vd., 2012). Bu karmaşık yapılar, nanometreden santimetreye kadar değişen boyutlarda fiberler ve levhalar gibi çeşitli yapılar içerir ve hücreler bu mikroçevrelerin topografik özelliklerine tepki verir (Kshitiz vd., 2012). Hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde kullanılan substratlar, mikro ve nanofabrikasyon teknikleriyle üretilir ve bu yaklaşımlar hücre tepkilerini non-invaziv ve biyokimyasal olmayan yollarla etkileyebilir (Martino vd., 2012). Örneğin, Wang vd. (2001) nöral progenitör hücrelerin (NPC'lerin) kollajen nanofiberlerinin düzenlenmesini tanıyabildiğini ve hizalanmış nanofiberler üzerinde rastgele oryantasyona sahip substratlara göre daha verimli büyüdüğünü göstermiştir (Wang vd., 2001; Zhu vd., 2010). Bu çalışmalar, kök hücrelerin nanomateryal oryantasyonuna göre yönlendirilebileceğini ve düzenli hizalanmış nanomateryallerin, ECM'nin düzenli fiber yapısını daha iyi taklit ederek kök hücre farklılaşması ve proliferasyonunu artırabileceğini öne sürmektedir. Bu bulgular, kök hücre kaderinin kontrolünde yüzey topografisinin ve nanomateryal kompozisyonunun önemini vurgulamaktadır (Zhao vd., 2013).

2.2.2 Dokuların yeniden doğuşu

Nanomateriyal-kök hücre etkileşimleri, kas, karaciğer, kalp ve diğer dokuların rejenerasyonunda giderek artan ilgi görmektedir. Özellikle kas dokusunda, travmatik yaralanmalar sonucu oluşan hasarların iyileşmesi için, altın nanopartiküller (AuNP) içeren PLLA iskeleler gibi nanomateriyaller kullanılmaktadır. Bu iskeleler, AuNP oranı arttıkça elektrik iletimlerini artırırken, düşük hücre proliferasyonu göstermiştir (McKeon-Fischer ve Freeman, 2011). Kitosan-PCL nanofibröz iskeleler, hizalanmış yapısı ile kas hücrelerinin organizasyonunu ve farklılaşmasını teşvik ederek, kas dokusu rejenerasyonu için etkili olmuştur (Jiang vd., 2014).

Karaciğer, çeşitli hastalıklar nedeniyle hasar görebilir ve bu hasarların iyileştirilmesi için mezenkimal kök hücreler kullanılarak hepatosit benzeri hücrelerin oluşumu artırılmıştır. Ultra-Web™ nanofiber iskelelerin kullanımıyla bu süreç desteklenmiştir (Chueng vd., 2016). Kalp-damar hastalıkları için kullanılan kök hücreler, yaralı kalp dokusunun onarımında etkili olmaktadır. Pluripotent kök hücreler, kardiyak kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler, kalp krizi sonrasında kardiyak doku rejenerasyonunu desteklemek için kullanılmaktadır. Nano-topografik olarak tanımlanmış polietilen glikol (PEG) hidrojel, CSC'lerin adezyonunu ve proliferasyonunu artırmıştır (Han vd., 2015).

Bu araştırmalar, nano-materiyallerin dokuların yeniden yapılandırılması ve iyileşmesi için sunduğu potansiyeli göstermektedir. Nano-materiyaller, özellikle kök hücrelerle birleştirildiğinde, çeşitli dokuların iyileşmesini ve rejenerasyonunu etkili bir şekilde desteklemek için kullanılabilir. Bu alanlarda yapılan araştırmalar, klinik uygulamalarda yenilikçi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkılarda bulunmaktadır.

2.3 RNA İnterferans (RNAi)

Moleküler tıpın araştırma alanlarında yer alan gen tedavisi, sorunu kaynağında çözme üzerine kurgulanmıştır. Bu tedavi yönteminde temel amaç hastalığa sebep olan kusurlu genin bloke edilerek ve hastalığı yenmesinde yardımcı olacak yeni genleri ekleyerek kusurlu yapının düzgün çalışmasını sağlamaktır. Bu sistem bu yönüyle genetik

problemleri tedavi edemeyen geleneksel ilaç tedavi yöntemlerinden ayrılmaktadır (Fire vd., 1998).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde birçok farklı gen susturma mekanizmaları denenmiştir. Doğrudan kusurlu geni hedef alan tekniklerin yanı sıra, son yıllarda mRNA'yı hedef alan teknikler öne çıkmaktadır. "Antisense stratejileri" olarak adlandırılan mRNA hedefli bu teknikler, hedeflenen proteini kodlayan mRNA'ya tersi tamamlayıcı olan bir RNA veya DNA zincirini hücrelere taşımaya dayanır (Gewirtz, 2007).

Kanser hastalıklarının tedavisi alanında yapılan çalışmalarda güçlü bir gen susturma işlemi olan RNA interferans (RNAi) ön plana çıkmaktadır. RNA interferans (RNAi), tamamlayıcı mRNA dizisinin parçalanması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. RNA interferans gen susturma mekanizması, *Caenorhabditis elegans* adlı bir solucan türünde ilk defa 1998 yılında ortaya konmuştur (Fire vd., 1998).

Terapötik uygulamalarla teknolojiye dönüşme potansiyelinden dolayı RNAi'nin keşfedilmesi bilim insanları arasında büyük heyecan oluşturmuştur. RNAi üzerinde çalışmalar derinleştikçe miRNA (mikro RNA), siRNA (kısa interferans RNA) ve shRNA (kısa saçtokası RNA) adı verilen 3 çeşit RNAi yolağı tespit edilmiştir. Bu 3 çeşit RNAi yolağının etkinliği ve etki ettiği gen farklılık göstermektedir (Dorsett ve Tuschl, 2004). Elbashir vd. (2001) siRNA ile hücrelerde gen susturma mekanizmasını açıklaması tedavilerde yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur. Yapılan bu çalışmada dsRNA'yı memeli hücrelerine aktarmayı başarmışlardır. İnsanlarda klinik olarak ilk siRNA çalışmasını Davis vd. (2010) sistemik enjeksiyon yöntemiyle siRNA yüklü nano-materyalleri kullanarak yapmışlardır. Bu çalışmalarda siRNA kullanılmasının en önemli sebebi kolay sentezlenebilir olması ve ilaç molekülleri için uygun olmasıdır (Xu ve Wang, 2015). siRNA yapıları RNA-indüklü susturma kompleksi (RISC)'nin parçasıdır. RISC, siRNA'ya tamamlayıcı olan mesajcı RNA (mRNA)'yı degrade eder (Mittal vd., 2012). Yapılan bu çalışmalar RNAi mekanizması kullanılarak siRNA yolağıyla gerçekleştirilen tedavilerinde ileri çalışmalara öncü olmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Nano-materyal sentezinde kullanılan H-Phe-Phe-NH₂ (Difenilalaninamid) Bachem (Bubendorf, İsviçre)' den, Hekzafluoro-2-propanol (HFIP) CovaChem (Illinois, ABD)' den satın alındı. Çapraz bağlama ajanı olarak kullanılan gluteraldehit (GA) ve FFA- Ca²⁺ dekorasyonunda kullanılan Kalsiyum Nitrat (Ca(NO₃)₂) Sigma-Aldrich (Darmstad, Almanya)'den temin edildi.

Nano-materyallerin boyut ayarlanması ve yıkama işlemleri sürecinde Beckman Coulter markalı Allegra 64R model soğutmalı santrifüj cihazı kullanıldı. Bandelin Sonorex marka sonikatör cihazı kullanılarak Nano-materyallerin agregasyonu engellendi. Sentezlenen Nano-materyallerin yıkama işlemi yapılırken kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, ABD) ROpureLP® ters ozmoz ünitesi kullanılarak arıtıldı.

3.2 Peptit Temelli Nano-Materyallerin (NM) Sentezi

Tez kapsamında difenilalanin amid (FFA) dipeptiti kullanılarak, peptit temelli nano-materyalin sentezi gerçekleştirildi. Boyut ayarlaması ile ilgili çalışmalar tamamlandıktan sonra bu yapılar Ca²⁺ iyonları ile dekore edilerek Ca²⁺-FFA yapıları elde edildi.

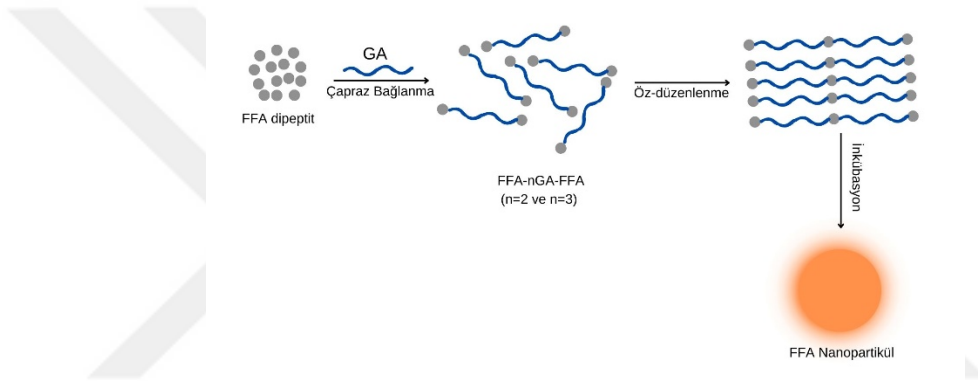
3.3 FFA Temelli Nano-Materyallerin (NM) Sentezi ve Ca²⁺ Modifikasyonu

3.3.1 FFA temelli nano-materyallerin (NM) Sentezi

Self-assembly (kendiliğinden düzenlenme) ile sentezlenen peptit ve protein bazlı nano-materyaller non-kovalent etkileşimlerle oluşurlar. Bu oluşumda hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları hâkim güçlerdir. Bu etkileşimler zayıf olduğu için ortamdaki fizyolojik değişimlerden etkilenirler. Ortam koşullarından etkilenerek şekillerini değiştirirler ve agregate olurlar. Kendiliğinden düzenlenme ile oluşan difenilalaninamid bazlı nano-materyallerde (FFA-NM) bu sebepten dolayı stabil değildirler. Bu çalışmada FFA-NM'i stabil hale getirmek için kovalent çapraz bağlanma yapılmaktadır. Çapraz bağlama ajanı olarak gluteraldehit (GA) kullanıldı.

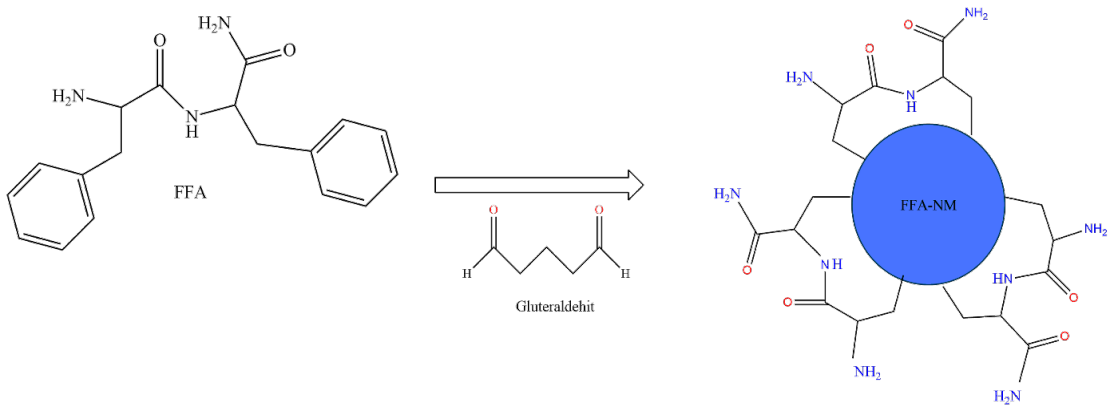
Gluteraldehit peptitin kendiliğinden düzenlenmesinde stabilizör olarak görev yapmaktadır (Mandler ve Kraus-Ophir, 2011; Perween ve Chandanshive, 2013).

Bu çalışmada difenilalaninamid peptidinin amin grubu ile gluteraldehit molekülünün aldehit grubu arasında Schiff bazı ($C=N$) oluşarak kovalent olarak çapraz bağlanmaktadır. Peptit kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) ve kovalent çapraz bağlama yöntemlerinin entegre edilmesiyle nano-materyaller fizyolojik olarak stabil hale getirilmektedir (Mandler ve Kraus-Ophir, 2011; Perween ve Chandanshive, 2013). Difenilalaninamid (FFA) nano-materyallerin çapraz bağlama ve self-assembly mekanizması Şekil 3.1’de görülmektedir.



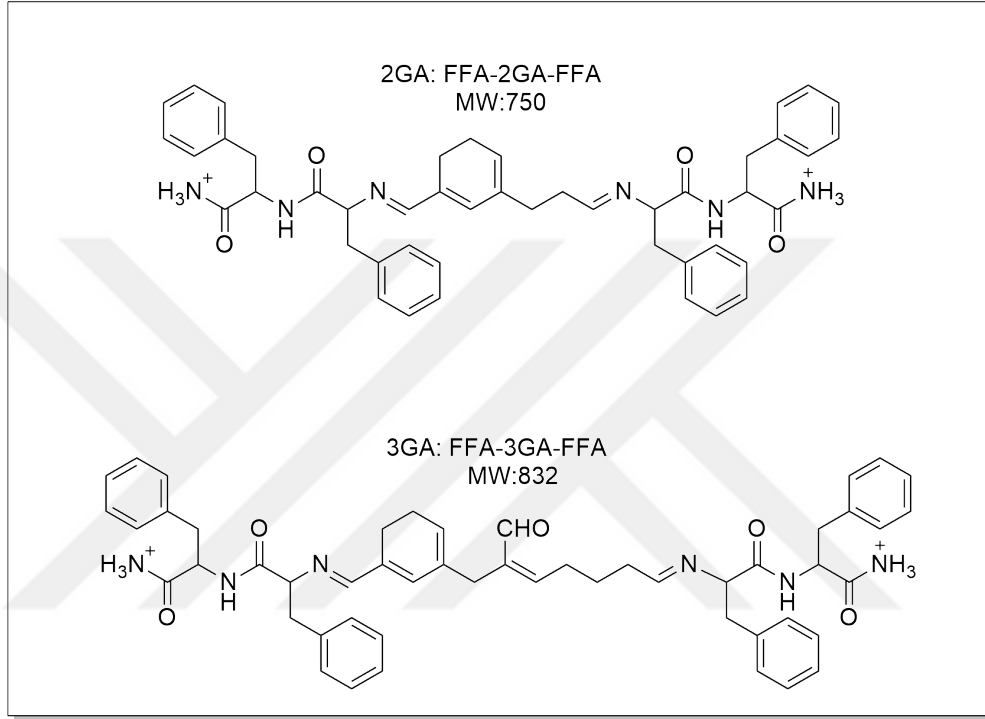
Şekil 3.1. NM çapraz bağlama ve kendiliğinden düzenlenme şeması.

Difenilalaninamid nano-materyalin (FFA-NM) olası sentez reaksiyonu Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Difenilalaninamid (FFA) dipeptit temelli nano-materyalin olası sentez reaksiyonu.

Çalışmanın ilk bölümünde çapraz bağlanma süresinin nano-materyalin boyutu üzerine olan etkisi incelendi. Nano-materyal oluşumu iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada FFA dipeptiti ile GA, Schiff bazı reaksiyonu ile çapraz bağlanmaktadır. Bu birleşme sonucunda FFA-2GA-FFA ve FFA-3GA-FFA dimerlerinin oluştuğu öngörülmektedir (Şekil 3.3) (Zhang vd., 2015). Bu dimerler nano-materyalin yapı taşıdır.



Şekil 3.3. Çapraz bağlanma sonucu oluştuğu öngörülen olası FFA-2GA-FFA ve FFA-3GA-FFA yapıları.

İkinci aşamada ise, oluşan bu yapı taşları sulu ortamda hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları ile nano-materyal oluşturmak üzere kendiliğinden düzenlenmektedir. Standart nano-materyal sentez prosedüründe FFA dipeptitleri çapraz bağlayıcı ve sulu ortama aynı anda maruz kalmakta ve çapraz bağlanan FFA'lar doğrudan kendiliğinden düzenlenme sürecine girmektedirler (Bozdoğan vd., 2017; Bozdoğan, 2018).

Gerçekleştirilen deneylerde bu iki basamak birbirinden ayrıldı. FFA dipeptiti önce çapraz bağlayıcı ile farklı sürelerde muamele edildi (15 dak., 30 dak., 1 saat, 4 saat, 12 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat), ardından oluşan dimerler sulu ortamda kendiliğinden düzenlenmeye tabi tutuldu. Böylelikle kovalent çapraz bağlanma ve kendiliğinden düzenlenme sürelerinin nano-materyalin boyutu üzerindeki etkisi araştırıldı.

Bu amaçla 8 adet temiz ve kuru vial alındı ve deney gruplarının isimleri 8 farklı bağlanma süresi dikkate alınarak etiketlendi. FFA dipeptiti 0,1 g/mL derişimde HFIP (1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol) içerisinde çözdürüldü (8 adet deney seti için toplamda 24 mg FFA/240 µL HFIP çözeltisi hazırlandı). Hazırlanan bu stok çözeltisi üzerine %25'lik GA çözeltisinden 4,8 mL ilave edildi. Çapraz bağlanma sürecinin bu aşamada başlamış olduğu kabulü ile GA'in eklendiği saat kaydedildi. Hazırlanan bu çözelti ivedilikle her vialde 630 µL olacak şekilde 8 vial bölündü. GA eklendikten 15 dakika sonra 15 dakikalık deney vialinin üzerine 2,4 mL saf su eklenerek çapraz bağlanma süreci sonlandırılıp kendiliğinden düzenlenme süreci başlatıldı. Bu sürecin tamamlanması için çözelti bir gece karanlık ortamda bekletildi. Süre sonunda oluşan nano-materyaller arta kalan HFIP ve GA'in sitotoksik etkisini elimine etmek amacıyla yüksek devirli santrifüj yardımı ile 20000 rpm de 10 dakika boyunca deiyonize su ile yıkamaya tabi tutuldu. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Oluşan nano-materyaller 3 mL saf su içinde dağıtılarak karakterizasyon çalışmaları için +4 °C'de saklandı. Bu adımlar diğer 7 örnek için de tekrarlandı.

3.3.2 FFA temelli NM'lerin Ca²⁺ iyonları ile dekore edilmesi

Dipeptit temelli FFA NM'ler, hücrel etkileşim öncesi yüzey yük dengelerini ayarlamak amacıyla biyolojik olarak uyumlu olan ve canlı yapısında yüksek miktarda bulunan Ca²⁺ iyonları ile muamele edildi. Bu amaçla, saf suda hazırlanan 500, 1000 ve 2000 ppm (0,5, 1 ve 2 mg/mL) gibi farklı derişimlerde Ca(NO₃)₂ çözeltisiyle, sentezlenen FFA-NM'ler etkileştirilerek yüzey yükleri Zeta-potansiyelleri (mV) açısından değerlendirildi.

3.4 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Karakterizasyonu

Sentezlenen nano-materyallerin karakterizasyonu çalışmalarında taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Zeta-sizer, ATR-FTIR ve LC-MS/MS cihazları kullanılmıştır. NM'lerin biyolojik moleküller ile etkileşim sürecinde korona oluşum çalışmaları UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) ile takip edildi.

3.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Sentezlenen nano-materyallerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi Taramalı Elektron Mikroskobuyla (SEM, FEI, Quanta FEG 250) gerçekleştirildi. Bu işlem için 5 µL nano-materyal dispersiyonu temiz karbon bant yüzeyine damlatılarak azot gazı altında kurutuldu ve yaklaşık 10 nm Au/Pd kaplanarak analizlere hazır hale getirildi. Daha sonra farklı büyütme oranlarında görüntüleri alındı.

3.4.2 Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile FFA Nano-materyallerin boyut ve zeta potansiyel (ZP) analizleri

Nano-materyallerin dinamik ışık saçılması analizleri Zeta-sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) cihazıyla gerçekleştirildi. Hem dinamik ışık saçılımı (DLS) hem de zeta-potansiyeli (ZP) ölçümleri için tek kullanımlık Malvern U-şekilli küvet (DTS 1060C) kullanıldı. Sonuçlar saf su ortamında (viskozite: 0,8872 cP, refraktif indeks (RI): 1,33, dielektrik sabiti: 78,5), 25°C’de ve 173° geri saçılma açısıyla kaydedildi. Nano-materyal çözeltisinin 1 mg/mL olarak örnek derişimlerinin elektroforetik mobilitesi ölçülerek bu değer Helmholtz-Smoluchowski eşitliğiyle ζ -potansiyel ve boyut değerlerine dönüştürüldü.

3.4.3 Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (ATR-FTIR) Analizleri

Sentezlenen nano-materyallerin yapı analizleri ATR-FTIR (Perkin-Elmer, Spectrum 100) spektrometre cihazıyla gerçekleştirildi. Spektrumlar 4000 cm⁻¹ ve 600 cm⁻¹ aralığında 4 cm⁻¹’lik aralıklarla kaydedildi.

3.4.4 Kütle spektrofotometre (MS) analizleri

Sentezlenen nano-materyal yapılarının kontrolü için gerçekleştirilen kütle spektrofotometresi (MS) analizleri için LC-MSMS (Thermo Scientific, TSQ Quantum Access Max) cihazı kullanıldı. Hazırlanan örneklerden 1 mL alınıp üzerine ilave edilen 5 mL metanol içerisinde dağılması sağlandı. Ardından bu çözeltiler 0,45 µm’lik filtrelerden geçirilerek analize hazır hale getirildi.

3.4.5 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri

Sentezlenen nano-materyallerin parçacık boyutlarının belirlenmesinde Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, Hitachi, HT-7700) kullanıldı. Nano-materyal dispersiyonundan küçük bir damla grid üzerine damlatılıp kurutularak analiz için örnek hazırlandı.

3.5 Nano-Materyallerin Farklı Biyomoleküller ile Etkileşimleri

Biyolojik moleküller ile etkileşim sonrası nano-materyaller (NM) üzerinde oluşan yapı korona oluşumu olarak isimlendirilmekte ve bu oluşumun NM'e sağladığı bazı avantajlar bulunmaktadır. NM'ler üzerinde oluşan korona yapıların olumlu etkilerine odaklanmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Proteinler gibi biyolojik yapılar ile inkübe edilmiş NM'ler yeni bir biyolojik kimlik kazanabilir. NM'lerin kazandıkları bu yeni kimlik onları daha olumlu immünojenik yanıt almalarına, daha verimli hedeflenmelerine ve çalışma ortamlarında NM'lerin topaklanmaya karşı daha kararlı olmalarına olanak tanıyabilir. Örneğin, Clusterin ile kaplanmış PEG nano-partikülleri (NP) ile yapılan bir çalışmada, korona oluşmuş NP'lerin makrofajlar tarafından görünürlükleri azaltılmıştır (Schöttler vd., 2016). Farklı bir çalışmada, HSA ile oluşan korona-gümüş NM'lerin topaklanma hızı, çıplak NM'lere kıyasla HSA derişimine bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Gebauer vd., 2012). Hedefleme için kullanılan antikor bağlı NM'lerin, HSA ile korona oluşturmuş yapılarının insan yumurtalık kanser hücresi üzerinde daha olumlu etkisi gözlenmiştir (Dai vd., 2015).

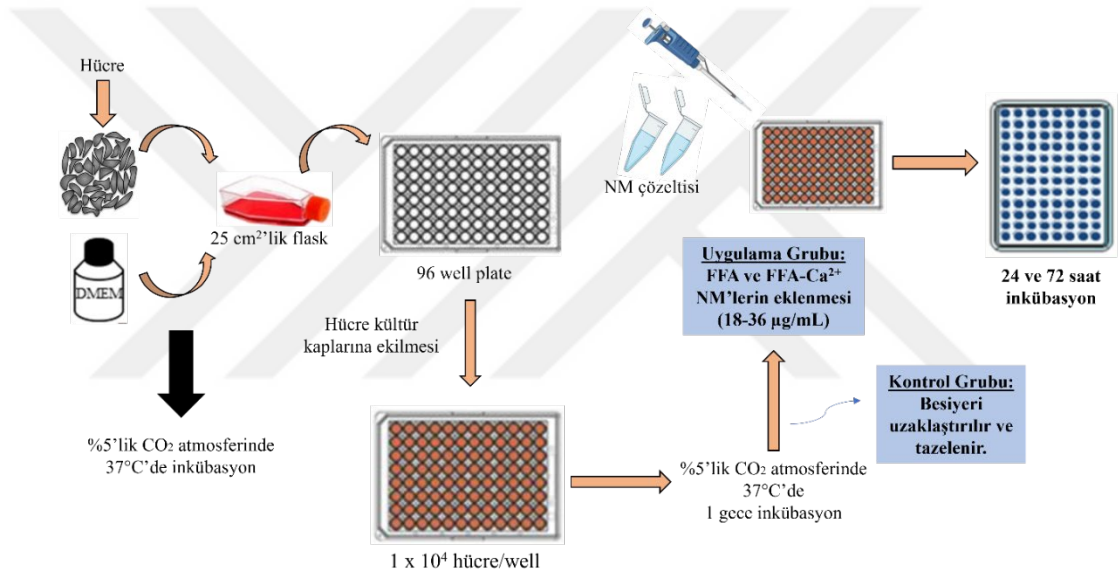
3.5.1 Dipeptit temelli nano-materyallerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri

FFA ve Ca^{2+} -FFA temelli NM'lerin insan serum albümini (HSA), immünglobulin G (IgG) ve DNA ile korona oluşturmaları incelendi. Bu amaçla iki farklı ependorf içinde 1 mg/mL derişimde olan FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'ler, pH 7,4 ve 0,01 M MOPS (3-morfolinopropan-1-sulfonik acid) tamponunda hazırlanan 35 mg/mL derişimine sahip HSA ile 2 saat boyunca bir rotatörde 20 rpm'de etkileştirilmeye bırakıldı. Ardından, 20000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip NM'lerin çökmesi sağlandı. HSA'nın NM'lerle etkileşim öncesi ve sonrası derişimleri 280 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) olarak okundu. Korona oluşum deneylerinde IgG ve DNA için de deneysel şartlar aynı olup NM'ler ile etkileşime giren IgG derişimi 7

mg/mL, DNA derişimi ise 0,035 mg/mL olarak çalışıldı. Çalışılan derişimler biyolojik moleküllerin insan kanındaki ortalama değerleri olduğu için tercih edildi. Spektrofotometrik okumalar IgG için de 280 nm de yapılmışken DNA için 260 nm’de gerçekleştirildi.

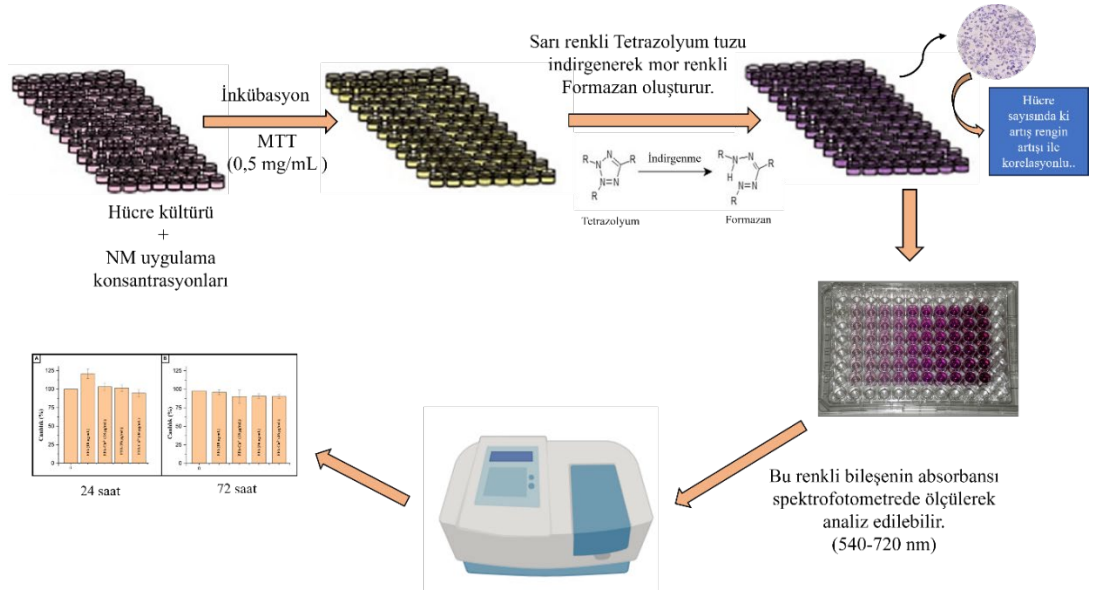
3.6 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Sitotoksosite Analizleri

Dipeptit temelli NM’lerin sitotoksik etkisini incelemek için NM’ler, HeLa (insan servikal adenokarsinom hücreleri) ve HT29 (insan kolon adenokarsinoma hücreleri) hücreleri ile etkileştirildi ve hücreler şekil 3.4’te n hazırlık işlemi şematize edilen MTT yöntemi ile incelendi.



şekil 3.4. MTT analizinin şematize n hazırlık işlemi.

MTT analizi hücre canlılığı, proliferasyonu (oğalma) ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. şekil 3.5’te şematize edilen bu kolorimetrik deney, sarı bir tetrazolyum tuzunun ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanır (Vistica vd., 1991). Canlı hücreler, MTT’yi formazana indirgeyen NAD(P)H’ye bağımlı oksidoredüktaz enzimleri içerir (Berridge ve Tan, 1993).



Şekil 3.5. Hücre canlılığını belirlemede kullanılan MTT analiz şeması.

Çözünmeyen formazan kristalleri (plakada oluşan) bir çözündürme çözeltisi kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli çözelti çok kuyulu bir spektrofotometre kullanılarak 540-720 nm’de absorpsans ölçülerek nicelendirilir. Çözelti ne kadar koyu olursa, canlı ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olur. MTT çözeltisi 0,5 mg/mL (25 mg/50 mL) derişimlerde hazırlanır.

Çalışmada, FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM’lerin HeLa ve HT29 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için hücreler 1×10^4 hücre/kuyu derişiminde mikrolakalara yerleştirildi (doku kültürü derecesinde düz tabanlı 96 kuyu). İlk olarak, her kuyucuğa modifiye DMEM (Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı) kültür ortamında 100 μL hazırlanmış hücre süspansiyonu eklendi ve 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra çeşitli derişimlerde hazırlanmış NM’ler nihai derişimler 18,0–36,0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde ortama eklendi. Hücre ve NM’ler 24 ve 72 saat inkübe edildikten sonra ölçümleri alındı.

3.7 siRNA’nın FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM’leri ile Komplekslerinin Dinamik Işık Saçılma (DLS) ve Zeta-Potansiyel Ölçümleri

Ölçümler, 25 $^{\circ}\text{C}$ ’de 30 mM HEPES (4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-etansulfonik asit)-KOH, pH 7,4, 100 mM potasyum asetat, 2 mM magnezyum asetat tampon çözeltisi kullanılarak Malvern Zeta-Sizer Nano S90 (Malvern Instruments, İngiltere) cihazıyla

gerçekleştirildi. Hazırlanan tampon çözeltisi 0,22 µm filtreden geçirildi. siRNA-NM kompleksleri, 0,5 µM siRNA ile hazırlandı.

DLS'de, 173 derecede geri saçılan ışık, kümülan yöntemi kullanılarak bir otokorelasyon fonksiyonuna uyarlanmış ve NM boyutu ortalama 3 tekrar ile (her biri 12 döngü) belirlenmiştir. Z-ortalama boyutunun ve çok sayıda fraksiyonun parçacıklarının boyutunun değerleri, işletim programından çıkarıldı ve NM derişimine karşı çizildi. İstatistiksel olarak güvenilir veri elde etmek için ZP ölçümleri en az 3 tekrarlı yapıldı, ardından ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı (Szewczyk vd., 2012).

3.8 Agaroz Jel Elektroforezi

FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'lerin genetik materyali bağlama yetenekleri, yatay agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelendi. Bcl-2 ve Mcl-1 siRNA'ları farklı derişimlerde NM'ler ile 1X siRNA tamponunda (pH 7,5) 30 dakika ve 24 saat boyunca karıştırıldı ve inkübe edildi (siRNA son derişimi 2,0 µM'dır). siRNA stok çözeltileri ile FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'ler, RNAaz ve DNAaz içermeyen suyla 1X siRNA tamponunda hazırlandı.

İnkübasyondan sonra, 20 µL'lik örnekler ve 4 µL %40 süroz, %3 agaroz jel üzerine yüklendi. Sürozun varlığı, örneklerin kuyunun altında bir tabaka oluşturmasını sağlamaktadır. Elektroforez işlemi, pH 7,8 olan 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponunda 40 V'de 50 dakika boyunca gerçekleştirildi. Elektroforez sırasında siRNA göçünün görsel olarak izlenmesi için 6x DNA yükleme boyası, RNA işaretleyici olarak kullanıldı.

Elektroforezden sonra jel boyanması için 0,5 µg/mL etidyum bromür çözeltisinde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Arka planı azaltmak için jelin su içerisinde 15 dakika boyunca çözündürme işlemi gerçekleştirildi. siRNA bantları, bir jel belgeleme ve görüntüleme sistemi olan VersaDoc üzerinde Quantity One adlı bir veri toplama ve analiz programı kullanılarak tespit edildi.

3.9 Akış Sitometri Kullanılarak HT-29 ve Hela Kanser Hücrelerine NM-siRNA Komplekslerinin İnternalizasyonu

Akış sitometri, hücrelerin ve diğer partiküllerin biyolojik ve fiziksel özelliklerini niteliksel ve niceliksel olarak belirlemek için kullanılır. Bu özellikler, hücrelerin bir veya daha fazla lazer ışınından geçirilmesiyle belirlenir (Demirel, 1995; Dunphy, 2004).

FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerin siRNA ile komplekslerinin HT-29 ve HeLa hücrelerine internalizasyon (içselleştirme) çalışmaları akış sitometrisi (Flow Cytometry) kullanılarak incelendi.

siRNA'nın FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerin yardımıyla tümör hücrelerine alınıp alınmadığını anlamak için, ntRNA siRNA ile farklı derişimlerde hazırlanan NM'ler 30 dakikalık inkübasyon sonrası HeLa (insan servikal adenokarsinoma hücreleri) ve HT-29 (insan kolon adenokarsinoma hücreleri) hücreleri ile etkileştirildi ve sonuçlar akış sitometrisi ile incelendi. Bu amaçla hücreler, 24 delikli bir plaka üzerine ekildi (mL başına 200000 hücre). Hücrelerin plaka üzerine ekimden 24 saat sonra kompleksler eklendi. Komplekslerin stok çözeltileri, 0,15 M PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponu, pH 7,4 içinde hazırlandı. (siRNA'nın nihai derişimi 100 nM). siRNA ve NM'ler, 30 dakika boyunca inkübe edildi ve bu stoktan 50 µL her bir kuyuya eklendi. Hücreler, komplekslerle 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek iki kez yıkama işleminin tabi tutuldu. Son olarak, örnekler PBS'nin küçük bir hacmine (200 µL) yeniden süspansiyon edildi. Ölçümler, BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, ABD) akış sitometresi üzerinde mavi lazerle 488 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. ntRNA ve NM içeren kompleksler pozitif kontrol olarak kullanılırken, kompleksler yerine PBS ile muamele edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca komplekslerden floresan işaretli ntRNA negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.10 Tümör Hücrelerine Karşı NM-siRNA Komplekslerinin Sitotoksikite Analizi

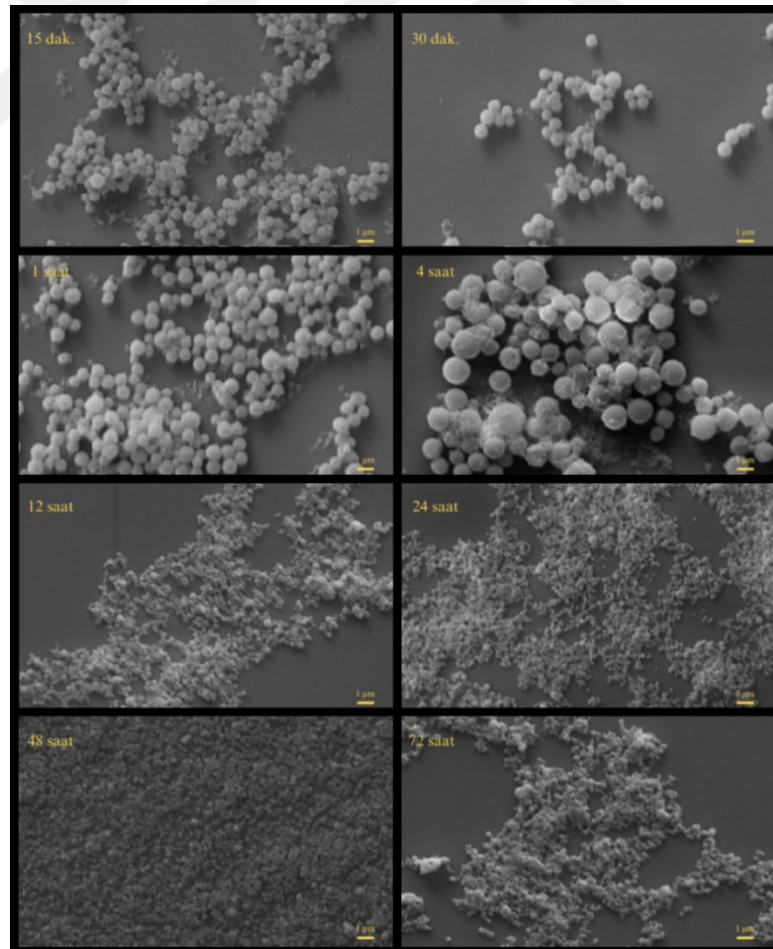
Tümör hücre hatları üzerinde siRNA'lar ile kompleks oluşturmuş FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'lerin sitotoksik etkisi incelendi. Bu amaçla FFA, Ca^{2+} -FFA-NM'lerin Mcl-1 ve Bcl-xL siRNA'ları ile oluşturulan kompleksleri HeLa ve HT29 hücre hatları ile 24 saat süre etkileştirildi. Elde edilen sonuçlar incelendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) tekniği ile hazırlanan ve boyut olarak literatüre ilk defa verilecek olan dipeptit temelli yeni nano-materyaller (FFA-NM ve Ca^{2+} -FFA-NM) sentezlendi. Sentezlenen FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyallerinin boyut ayarlaması (≤ 100 nm) ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra biyoyumluluğu (toksisite çalışmaları), proteinler ve nükleik asitlerle etkileşimi (korona oluşumu açısından) incelendi ve son olarak hücre çalışmaları için hücre internalizasyon deneyleri gerçekleştirildi.

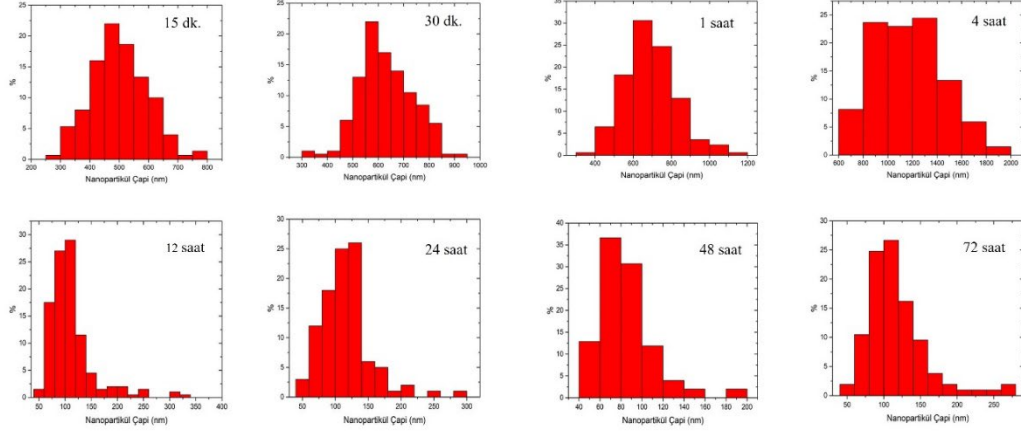
4.1 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Karakterizasyonu

Difenilalaninamid (FFA) moleküllerinin farklı sürelerde glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlanarak oluşturulan nano-materyallerin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri Şekil 4.1’de verilmektedir.



Şekil 4.1. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM’lerin SEM görüntüleri.

Elde edilen görüntülerin Image J programıyla alınan boyut-yüzdesel dağılım grafikleri Şekil 4.2’de verilmişken, partikül boyutlarının ortalama değeri de Çizelge 4.1’de verildi.



Şekil 4.2. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM’lerin boyutlarının yüzdesel dağılımı.

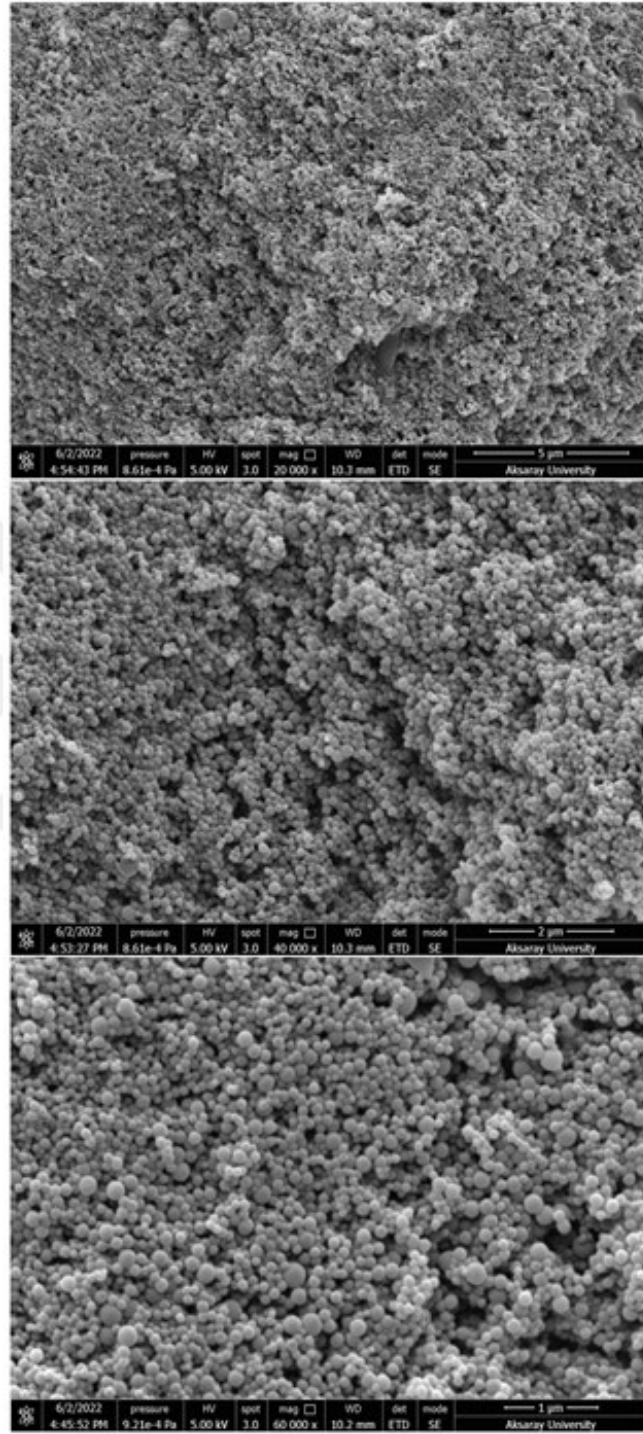
Çizelge 4.1. Farklı sürelerde çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM’lerin boyutlarının ortalama değeri.

Çapraz bağlayıcı GA ile muamele edilme süresi	Nano-Materyal Boyutu (nm)
15 Dakika	500,448
30 Dakika	631,534
1 Saat	686,920
4 Saat	1173,882
12 Saat	110,954
24 Saat	116,475
48 Saat	87,93
72 Saat	117,108

Hem SEM analizi görüntüleri hem de bu görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi ile elde edilen bulgular dipeptidin çapraz bağlayıcı ile muamelesi için ihtiyaç duyulan optimum sürenin 48 saat olduğunu ortaya koymaktadır. 48 saatlik GA muamelesi sonucunda elde edilen FFA-NM’lerin ortalama boyutu yaklaşık 87 nm civarındadır.

Belirlenen optimum süre (48 saat) üzerinden FFA nano-materyaller, sentezin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla yeniden sentezlendi ve ön santrifügasyon

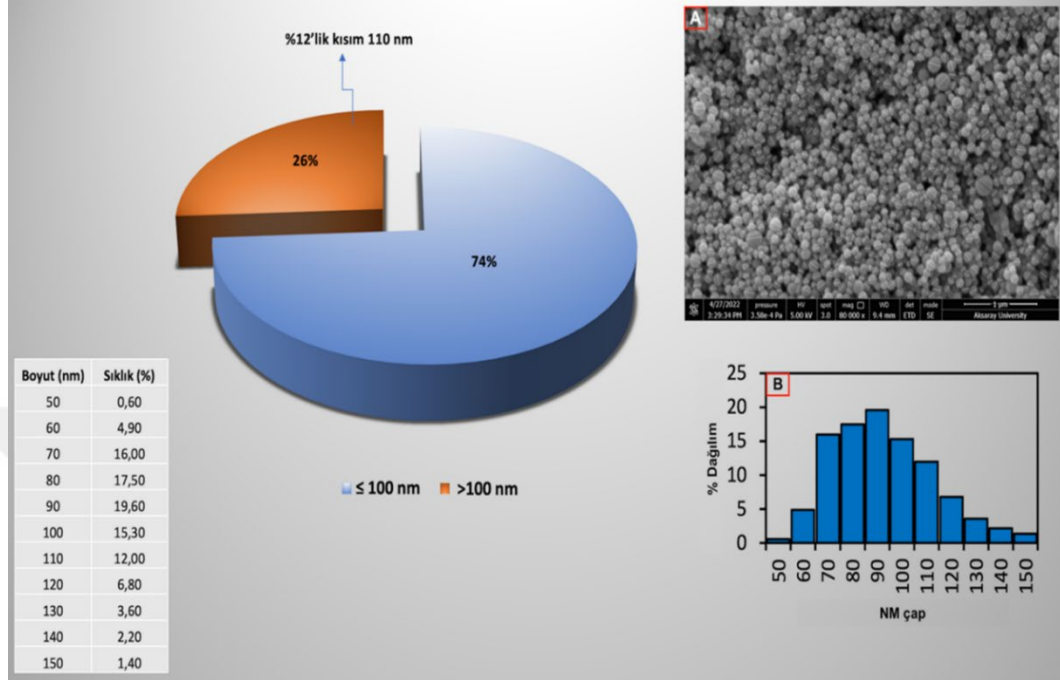
işlemlerinden sonra farklı büyütmelerde SEM analizi için hazırlandı. Elde edilen görüntüler Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.3. Belirlenen optimum sürede (48 saat) çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA NM'lerin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri.

SEM görüntüsü üzerinden Image J programıyla alınan boyut-yüzdesel dağılım değerlendirmesi sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Sentezlenen FFA-NM'lerin

%74'ünün 100 nm ve altında olduğu ve hedeflenen boyutlara ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.4). Kalan %26'lık bölümünün büyük bir kısmının ise 110 nm civarında olduğu belirlendi.

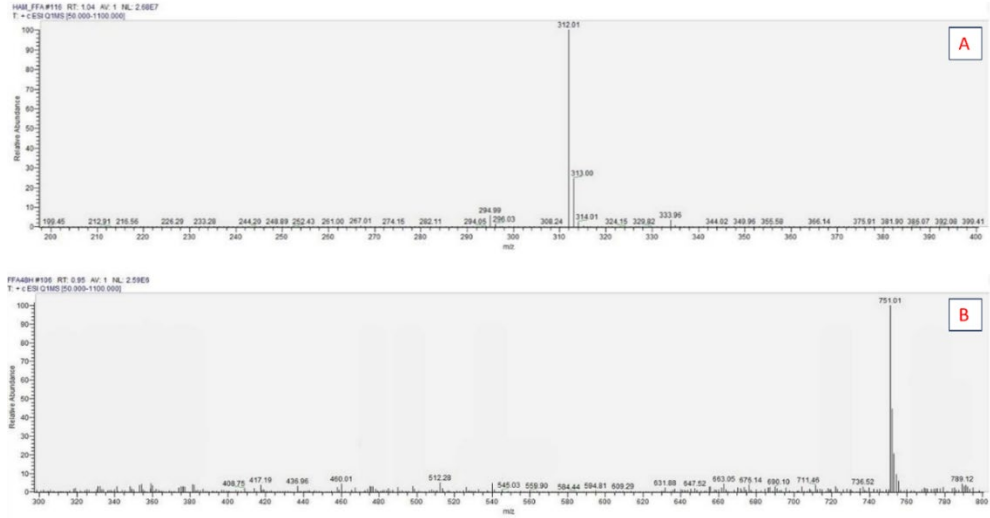


Şekil 4.4. Belirlenen optimum sürede (48 saat) çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan FFA-NM'lerin SEM görüntüsü (A) ve Image J üzerinden yapılan boyut değerlendirmesi (B).

Şekilde 4.4A'da FFA-NM'lerin SEM görüntüsü yer almaktadır. Bu görüntü üzerinde ImageJ ile yapılan boyut dağılım analizine ait grafik Şekil 4.4B'de verilmiştir. Buna göre, NM'lerin ortalama çapı $87,93 \pm 20,40$ nm'dir (ort. $\pm$ std. sap., n=1000) ve sentezlenen FFA-NM'lerin %74'ünün 100 nm ve altında olduğu görülmektedir. Raval vd. (2019)'a göre, PDI (polidispersite indeksi) değeri 0 ile 1 arasında değişebilir, PDI'leri 0,1'den az olan partiküllerin monodispers partikülleri ifade ettiği ve 0,1'den büyük değerler, polidispers parçacık boyutu dağılımlarını ifade edebilir. Elde edilen verilerden yola çıkarak, NM'lerin polidispersite indeksi (PDI) Denklem 4.1 kullanılarak hesaplanmış ve 0,054 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar NM'lerin monodispers olduğunu göstermektedir.

$$PDI = (Standart Sapma/Ortalama)^2 \quad (4.1)$$

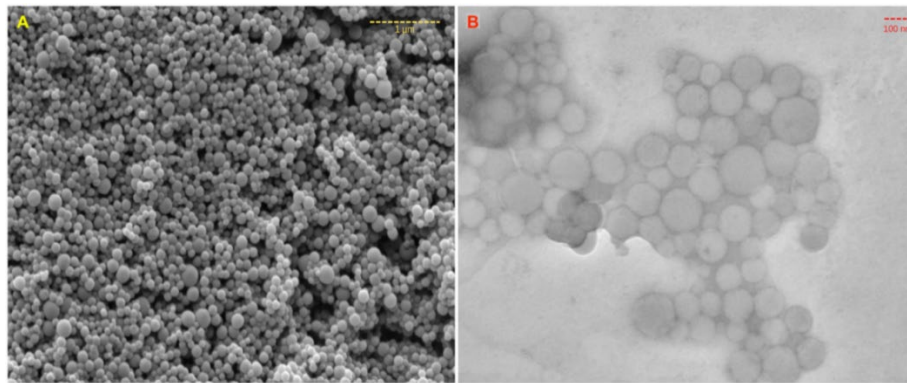
NM sentezinde kullanılan FFA dipeptit monomerlerinin ve FFA-NM'lerin kütle analiz sonuçları Şekil 4.5'te verilmektedir.



Şekil 4.5. FFA dipeptiti (A) ve FFA-NM'lerin (B) kütle spektrometresi analizi sonucu (FFA dipeptitinin molekül ağırlığı: 312,01- FFA-NM'in molekül ağırlığı: 750).

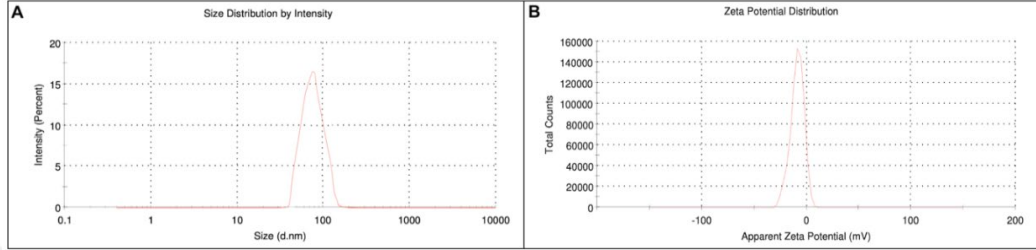
Şekil 4.5A ve 4.5B'de sırasıyla saf FFA dipeptit ve FFA-NM'lerin kütle sonuçları görülmektedir. FFA-NM'ler için LC-MSMS analizi sonucu elde edilen bulgular incelendiğinde saf FFA dipeptitlerinin çapraz bağlayıcı GA ile 48 saat etkileşimi sonucu FFA-NM yapılarının oluştuğu ve ortamda etkileşime girmemiş FFA'ların varlığına rastlanmadığı görülmektedir. Bu da nano-materyallerin 48 saatlik süre sonunda yüksek verimde elde edildiğini göstermektedir.

Ayrıca sentezlenen FFA-NM'lerin TEM analizleri de gerçekleştirildi ve SEM görüntüsü ile birlikte Şekil 4.6' da verildi. Şekil 4.6A'da 48 saatlik sürede sentezlenen FFA-NM'lerin SEM görüntüleri ve Şekil 4.6B'de ise aynı şartlarda sentezlenen NM'lerin TEM görüntüleri verilmektedir. Görüntüler incelendiğinde, SEM ve TEM sonuçlarının birbirini boyutsal açıdan desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.6. FFA NM'lerinin SEM (A) ve TEM (B) analizi görüntüleri.

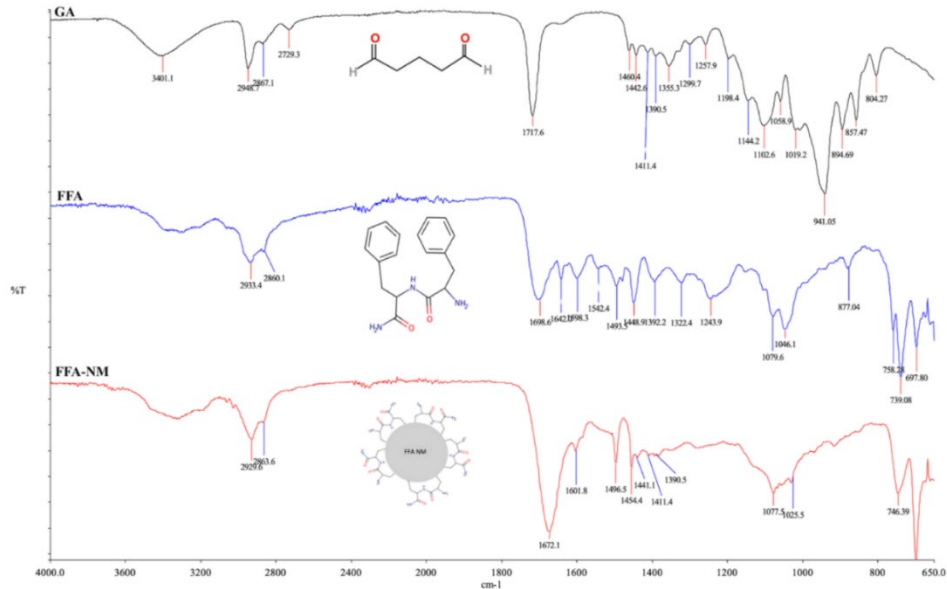
Sentezlenen FFA-NM'lerin dinamik ışık saçılması (DLS) analizleri de gerçekleştirildi. Sonuçlar saf su ortamında (viskozite: 0,8872 cP, refraktif indeks (RI): 1,33, dielektrik sabiti: 78,5), 25°C'de ve 173° geri saçılma açısıyla kaydedildi. 1 mg/mL örnek derişimdeki nano-materyal çözeltisinin elektroforetik mobilitesi ölçülerek bu değer Helmholtz-Smoluchowski eşitliğiyle ζ -potansiyel ve boyut değerlerine dönüştürüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. FFA-NM'lerin DLS sonuçları.

DLS analizi sonucu elde edilen boyut sonuçlarının, SEM ve Image J'den alınan sonuçlar arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir. Ayrıca FFA-NM'lerin zeta potansiyelleri -20,1 mV olarak ölçülmüştür. Zeta-potansiyel yorumlar, kalsiyum iyonu takılması ve korona oluşumları ile birlikte ayrıntılı olarak verilmiştir.

Sentezlenen FFA-NM'lerin FT-IR analizleri, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit ve yalın FFA monomeri ile birlikte Şekil 4.8'de verilmektedir.



Şekil 4.8. Glutaraldehit (A), FFA dipeptidi (B) ve FFA-NM (C) lerinin FT-IR analizleri.

Şekil 4.8’de verilen FT-IR sonuçlarına göre, FFA dipeptidinin IR spektrumunda (B) görülen 1598 cm^{-1} ’deki absorpsiyon primer amin grubunun NH bükülmesini gösteriyorken, GA’in spektrumundaki (A) 1717 cm^{-1} ’deki absorpsiyon ise GA’in serbest aldehit gruplarına atfedilmiştir. FFA-NM’e ait IR spektrumu incelendiğinde (C) bu iki pikinde yok olduğu dikkat çekmektedir. Bu sonuç, GA’in aldehit grubu ile FFA’nın amin gruplarının başarılı bir şekilde öngörüldüğü gibi çapraz bağlandığını doğrulamaktadır.

Ayrıca, FFA-NM spektrumundaki 2929 ve 2863 cm^{-1} ’deki güçlü absorpsiyonlar sırasıyla GA’in C-H asimetric ve simetric gerilmelerine atfedilmiştir. Bu sonuç da çapraz bağlanmanın gerçekleştiğini desteklemektedir.

Peptit zincirde yer alan amin ve karbonil grupları arasındaki hidrojen bağları ile peptit zincirlerinin katlanarak proteinlerin sekonder yapılarını oluşturduğu bilinmektedir. Proteinlerin IR spektrumlarındaki amin ve karbonil bölgeleri (Amid A, amid B ve amid I-VII bantları) proteinlerin yapıları ve konformasyonları hakkında bilgi vermektedir (Bozkurt vd., 2012). FFA dipeptidi ve FFA-NM’e ait spektrumlar incelendiğinde, FFA-NM spektrumunda görülen 1672 ve 1601 cm^{-1} ’deki absorpsiyonlar sırasıyla C=O gerilmesine ve NH₂ bükülmesini göstermektedir. Bu iki pik FFA-NM’e ait amid I bandını oluşturmaktadır. FFA dipeptidine ait spektrumda ise 1698 ve 1642 cm^{-1} ’deki absorpsiyonlar C=O gerilmesine 1598 cm^{-1} ’deki absorpsiyon ise NH₂ bükülmesine aittir ve bu üç pik FFA’ya ait amid I bandını oluşturmaktadır. FFA dipeptidinde görülen 1542 cm^{-1} ’deki absorpsiyon N-H bükülmesine aittir ve FFA’ya ait amid II bandını oluşturmaktadır (Barth, 2007). 1500 ve 1600 cm^{-1} (amid II) arasındaki absorpsiyonlar β -turn, 1600 ve 1700 cm^{-1} (amide I) arasındaki absorpsiyonlar β -sheet sekonder yapıları işaret etmektedir (Haris ve Severcan, 1999). GA ile çapraz bağlanma ve partikül oluşumu sonrası FFA-NM spektrumunda amid II bandındaki 1542 cm^{-1} ’deki absorpsiyonun tamamen ortadan kalkması ve 1672 cm^{-1} ’de güçlü bir pikin ortaya çıkması FFA dipeptidinin β -turn konformasyondan β -sheet konformasyona yapısal geçiş yaptığını göstermektedir. FFA-NM’in amid I bandındaki 1672 ve 1601 cm^{-1} ’deki pikler sırasıyla antiparalel ve paralel β -sheet sekonder konformasyonların varlığını göstermektedir (Elfrink vd., 2008). 1672 cm^{-1} ’deki pikin daha güçlü olması yapıda antiparalel β -sheet düzenlenmenin daha baskın olduğunu

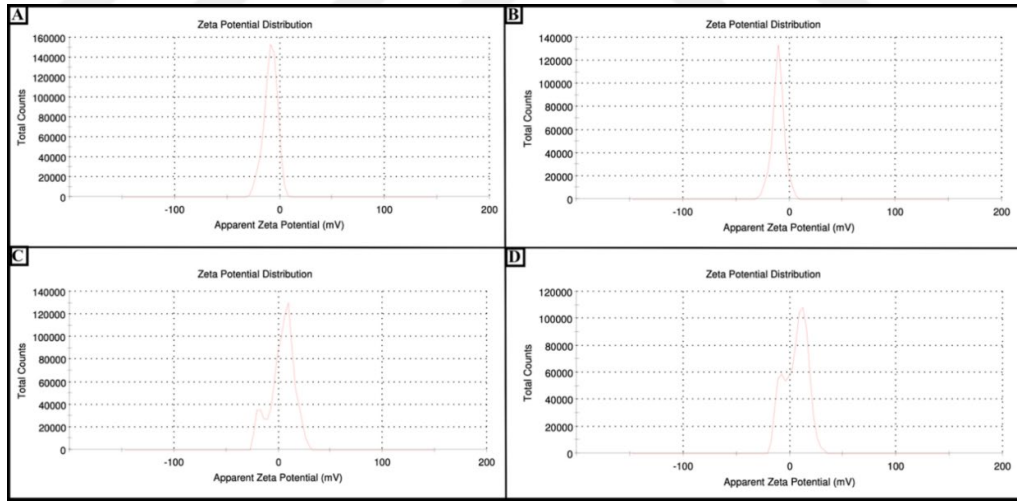
göstermektedir. 650 ve 750 cm^{-1} 'deki absorpsiyonlar fenil halkasındaki aromatik C-H bükülmesine atfedilmiştir.

4.2 FFA Temelli NM'lerin Ca^{2+} İyonları ile Dekore Edilmesi

Hücre etkileşim çalışmalarında, hücre yüzeyinin negatif yüklü olmasından dolayı, genelde nanoyapıların yüzey yüklerinin pozitif olması istenir. Yalın FFA-NM'lerin yüzey yükleri -20,1 mV olarak ölçülmüş ve yüzey yüklerini ayarlamak için FFA-NM'ler kalsiyum iyonları ile etkileştirilmiştir. Bu amaçla NM'ler saf suda hazırlanan 500, 1000 ve 2000 ppm (0,5, 1 ve 2 mg/mL) gibi farklı derişimlerde $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisiyle muamele edilmiş ve elde edilen Zeta potansiyelleri (mV) Çizelge 4.2. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.2. Ca^{2+} iyonları ile dekore edilmiş FFA Temelli NM'lerin Zeta potansiyel değerleri.

	FFA	Ca^{2+} -FFA (500 ppm Ca^{2+})	Ca^{2+} -FFA (1000 ppm Ca^{2+})	Ca^{2+} -FFA (2000 ppm Ca^{2+})
Zeta (mV)	-20,1	-10,5	+6,6	+9,3

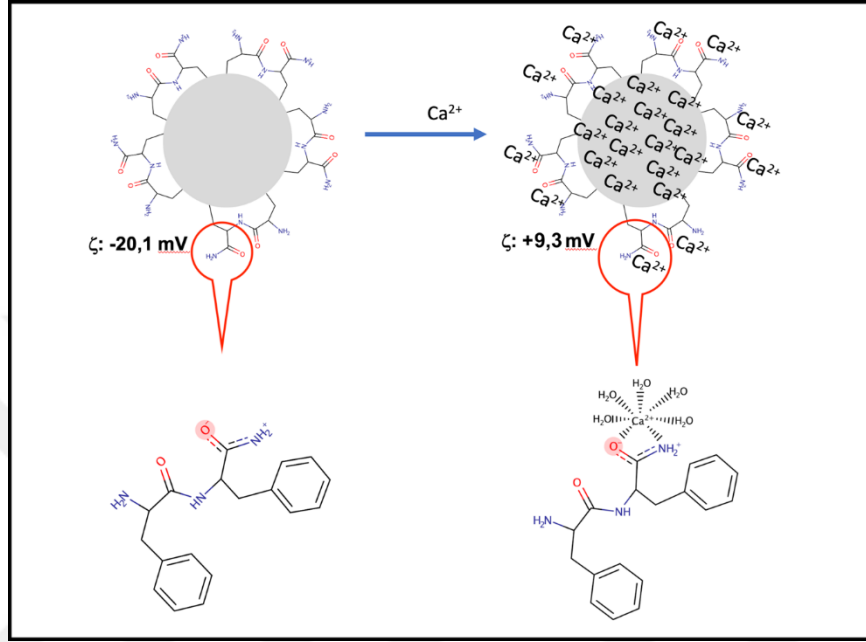


Şekil 4.9. FFA NM'lerin farklı $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ derişimlerinde alınmış Zeta-potansiyelleri: (A) Yalın FFA, ζ : -20,1 mV; (B) 500 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : -10,5 mV; (C) 1000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +6,6 mV; (D) 2000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +9,3 mV.

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi yalın FFA-NM'lerin yüzey yükleri -20,1 mV iken, etkileştiği Ca^{2+} iyon derişiminin artmasıyla yüzey yük potansiyeli eksi yükten pozitif yüke kaymaktadır. 2000 ppm'lik derişimden sonra Zeta-potansiyelde ciddi bir

değişim olmadığından bu derişimde elde edilen NM'ler korona testleri ve hücre çalışmaları için kullanılmıştır.

Ayrıca, FFA NM'ler ve Ca^{2+} iyonları arasındaki olası etkileşim için bir model Şekil 4.10'da verilmektedir.



Şekil 4.10. FFA-NM'ler ve Ca^{2+} iyonları arasındaki olası etkileşim modeli.

Şekil 4.10 incelendiğinde FFA yapısı yüksüz görüldüğü halde -amid grubunda oluşan olası rezonans yapısından dolayı, oksijen üzerinde oluşan güçlü negatif yük nano-materyal üzerinde kendini göstermektedir (Bozdoğan vd., 2017). Ortama ilave edilen Ca^{2+} iyonlarıyla birlikte yüzeydeki negatif yük dengelenip, pozitif kaymaktadır.

4.3 Dipeptit Temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile Etkileşimleri

FFA ve Ca^{2+} -FFA temelli NM'lerin korona deneyleri için çalışılan HSA, IgG ve DNA biyomoleküllerinin çalışma derişimleri ve korona miktarları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. FFA temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri.

C_{HSA} (mg/mL)	FFA-NM-HSA (g/g)	Ca^{2+} -FFA-NM-HSA (g/g)
35	16,78	17,75
C_{IgG} (mg/mL)	FFA-NM-IgG (g/g)	Ca^{2+} -FFA-NM-IgG (g/g)
7	12,84	12,55
C_{DNA} (mg/mL)	FFA-NM-DNA (mg/g)	Ca^{2+} -FFA-NM-DNA
0,035	14,73	17,48

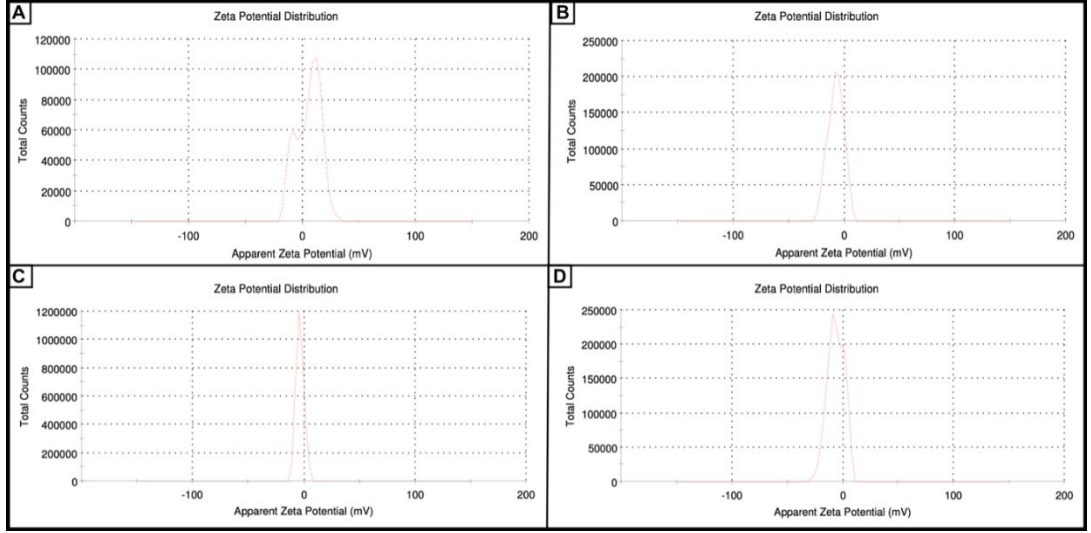
Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, HSA, IgG ve DNA biyomoleküllerinin FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'ine değişen miktarlarda tutunduğu görülmektedir (g/g veya mg/g oranları 1 g NM'e tutunan biyomolekül miktarını vermektedir). Biyomoleküllerin izoelektrik noktaları (pI), derişimleri, boyutu, etkileşime girdikleri materyalin yüzey yükü ve boyutu gibi parametreler korona oluşumunda etkin rol oynar. Bu çalışmada kullanılan biyomoleküllerden HSA 66.5 kDa ve IgG 150 kDa molekül ağırlığına sahiptir ($1\text{kDa} \approx 1,6 \times 10^{-21} \text{ g}$). Ayrıca molekül boyutları sırasıyla HSA 8-13 nm iken IgG 10-15 nm'dir (Kiselev vd., 2001; Kopp vd., 2017).

Burada, protein boyutunun yüzey korona oluşumunda etkin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle NM'lere IgG'nin HSA'dan daha düşük oranda bağlanması, IgG'nin boyut olarak daha büyük olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, IgG'nin HSA'ya oranla daha düşük bir derişimde olması da yüzey korona oluşumuna etki etmiş olabilir (Adolph Fick, 1995). DNA'nın ise NM'lere düşük düzeyde tutunmasının nedeninin ortamdaki derişiminin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Adolph Fick, 1995). DNA'nın Ca^{+2} iyonları ile dekore edilmiş ve pozitif yük kazanmış NM'lere daha fazla bağlanması ise negatif yüklü DNA'nın elektrostatik etkileşimi ile açıklanabilir.

Ca^{2+} -FFA-NM'lerin korona oluşturmuş yapılarının Zeta-potansiyel değerleri ve grafikleri sırasıyla Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

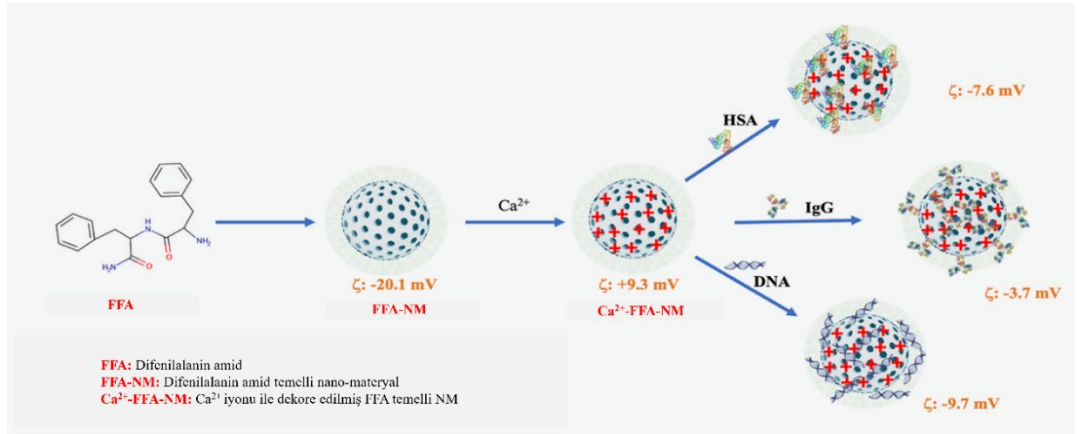
Çizelge 4.4. Korona oluşturmuş Ca^{2+} -FFA-NM'lerin Zeta-potansiyel değerleri.

	Ca^{2+} -FFA (2000 ppm)	Ca^{2+} -FFA-HSA	Ca^{2+} -FFA-IgG	Ca^{2+} -FFA-DNA
Zeta (mV)	+9,3	-7,6	-3,7	-9,7



Şekil 4.11. Korona oluşturmuş Ca^{2+} -FFA-NM'lerin farklı Zeta potansiyelleri: (A) 2000 ppm- Ca^{2+} -FFA, ζ : +9,3 mV; (B) Ca^{2+} -FFA-HSA, ζ : -7,6 mV; (C) Ca^{2+} -FFA-IgG, ζ : -3,7 mV; (D) Ca^{2+} -FFA-DNA, ζ : -9,7 mV.

DNA nükleotid zinciri güçlü bir polielektrolittir (Tapia vd., 2010). Bu nedenle derişimi her ne kadar düşük olsa da zeta değerini değıştirmede güçlü rol oynar. Bu çalışmada da Ca^{2+} -FFA-NM'nin DNA ile oluşturduğu korona yapısının, yalın FFA-NM'e göre zeta değerindeki büyük değışimin DNA'nın güçlü polielektrolit yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. HSA ve IgG molekülleri ise hem büyük hem de zayıf negatif proteinler olduklarından dolayı korona oluşum miktarı fazla olmasına rağmen yüzey yükünü değıştirmede DNA kadar etkin olamamışlardır.



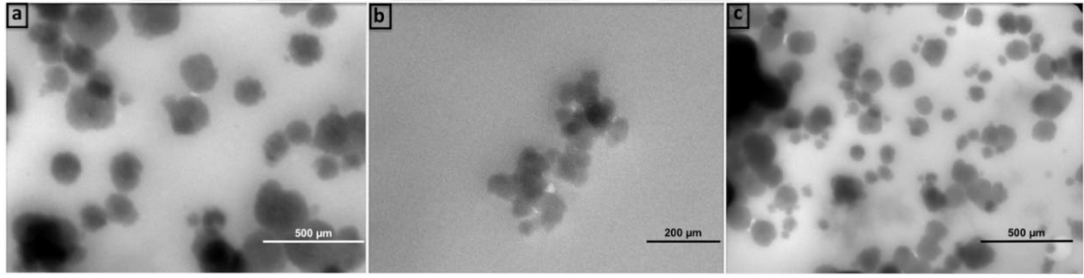
Şekil 4.12. Ca^{2+} iyonu ile dekore edilmiş FFA-NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri sonucu oluşan korona yapılarının şematize gösterimi.

Şekil 4.12'de Ca^{2+} -FFA-NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile olası korona oluşum yapıları şematize edilmiştir. Sonuç olarak Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi 2000 ppm- Ca^{2+} ile

dekore edilmiş FFA-NM'lerin zeta-potansiyelleri +9,3 mV'a çıkmışken, HSA, IgG ve DNA ile etkileşen NM'lerin yüzey yükleri sırasıyla -7,6, -3,7 ve -9,7 mV değerlerini almıştır. Bu da NM'lerin fizyolojik bir ortamda korona oluşturdıklarını ortaya koymaktadır.

4.3.1 Ca²⁺-FFA temelli NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile oluşturduğu korona yapıların TEM analizleri

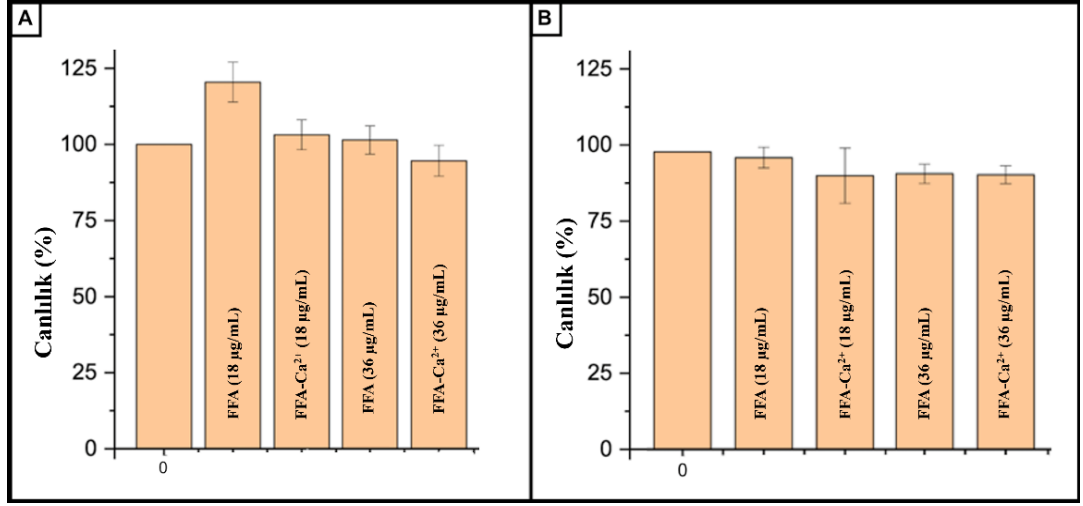
Ca²⁺-FFA-NM'lerin korona yapılarına TEM analizi yapılmış olup Şekil 4.13'te verilmiştir. TEM analizi sonuçları incelendiğinde, NM boyutlarında kayda değer bir değişim görülmemekle birlikte, NM'lerin yapısında herhangi bir bozunma da görülmemiştir. TEM analizi sonuçları, biyomoleküllerle etkileşimden sonra da yapının stabil kaldığını ortaya koymaktadır. Kopp vd. (2017)'e göre yapıdaki bu stabilite hücrel etkileşim çalışmalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır.



Şekil 4.13. Ca²⁺-FFA-NM'lerin HSA (a), IgG (b) ve DNA (c) ile etkileşim sonrası oluşan korona yapılarının TEM görüntüleri.

4.4 Dipeptit Temelli Nano-Materyallerin Sitotoksikite Analizleri

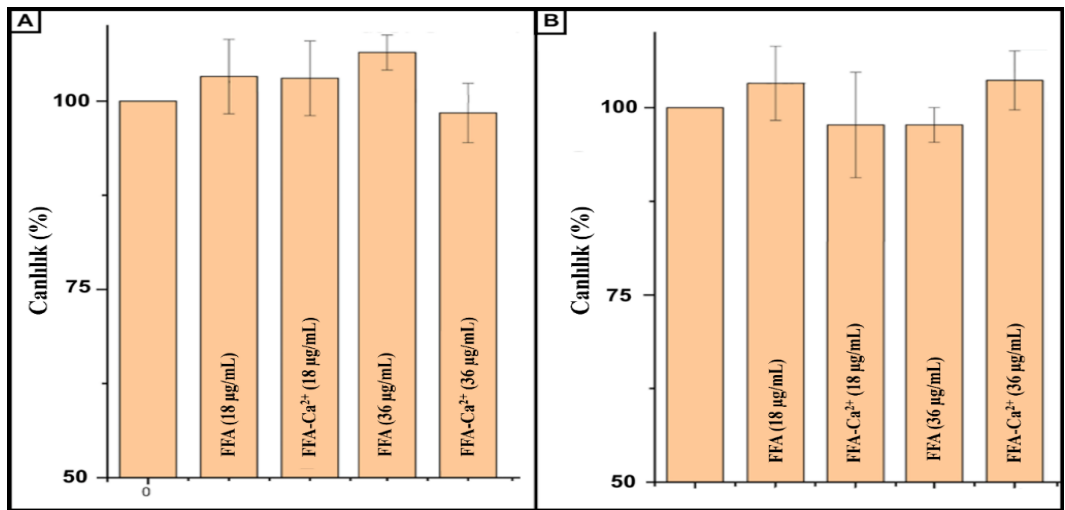
FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'lerin HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için 24 ve 72 saatlik sürelerde etkileşime bırakıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'te verildi.



Şekil 4.14. 24 saat (A) ve 72 saat (B) boyunca 18 µg/mL-36 µg/mL derişimlerinde FFA ve Ca²⁺-FFA nano-materyalleri ile inkübasyon sonrası canlı HeLa hücrelerinin yüzdesi (Hücre kültürü ortamı: DMEM; İnkübasyon:37⁰C).

FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'ler ile etkileşen kanser HeLa hücre canlılığının 24 saatlik inkübasyondan sonra, NM'lerin varlığında HeLa hücre canlılığında hafif bir artış gözlenirken (Şekil 4.14A); 72 saatlik inkübasyondan sırasında genel olarak %8-10 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.14B). Yapılan test, NM'lerin derişimlerdeki değişikliğin sitotoksositeye etki etmediğini ortaya koydu.

Ayrıca FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'lerin HT29 hücre hattı üzerinde de 24 ve 72 saatlik sürelerde etkileşim sonucu sitotoksik etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'te verildi.



Şekil 4.15. 24 saat (A) ve 72 saat (B) boyunca 18 µg/mL-36 µg/mL derişimlerinde Ca²⁺-FFA-NM'leri ile inkübasyon sonrası canlı HT29 hücrelerinin yüzdesi (Hücre kültürü ortamı: DMEM; İnkübasyon sıcaklığı:37⁰C).

FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'leri, 18 $\mu\text{g/mL}$ ve 36 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde belirtilen hücre hattıyla 24 ve 72 saat süre ile inkübe edildi. HT-29 hücrelerinin nano-materyallerle inkübasyonu durumunda, 24 saat sonra hücre canlılığında kayda değer bir azalma gözlenmezken (Şekil 4.15A), hücrelerin nano-materyallerle inkübasyon süresinin 72 saate kadar uzatılması, hücre canlılığı parametresinin %2 ila %4 arasında azalmasına neden oldu (Şekil 4.15B).

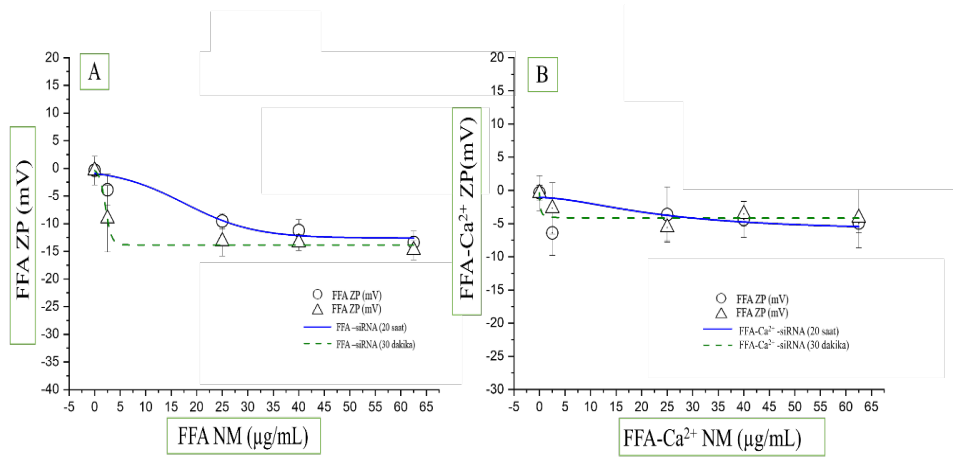
Sonuç olarak, nano-materyallerin HeLa ve HT29 hücrelerinin üzerine eklenmesiyle 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin canlılığında önemli bir değişim olmamış yani NM'lerin toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Aksine bazı hücre hatlarında hücre canlılığının arttığı görülmüştür ve bu durum, NM'lerin biyolojik kökenli oluşundan hücrenin bu malzemeyi besin olarak algıladığı şeklinde yorumlanmıştır.

4.5 siRNA-NM Komplekslerinin DLS ve Zeta-Potansiyel Ölçümleri

siRNA'nın farklı derişimlerinde (0-62,5 $\mu\text{g/mL}$ aralığında) FFA ve Ca^{2+} -FFA-NM'leri ile 30 dak ve 20 sa inkübasyon sonucu oluşturduğu komplekslerin zeta-potansiyel değerleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.5'te 1X siRNA tamponunda (pH 7,4) incelenen NM'lerin zeta-potansiyel değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. 1X siRNA tamponunda (pH 7,4) incelenen nano-materyallerin zeta-potansiyel değerleri.

NM (1X siRNA tampon, pH 7,5)	ZP (mV)
FFA (0-62,5 $\mu\text{g/mL}$)	-9,29±2,53
Ca^{2+} -FFA (0-62,5 $\mu\text{g/mL}$)	-3,51±3,38

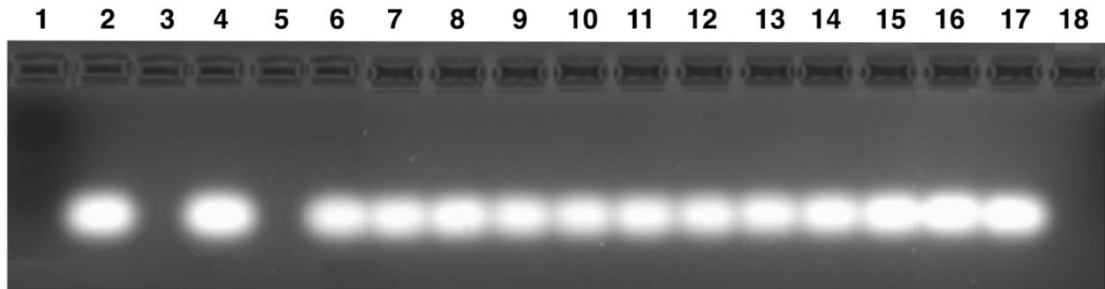


Şekil 4.16. FFA (A), Ca²⁺-FFA (B) NM'lerin değişen derişimlerine karşı 30 dakika ve 20 saatlik inkübasyon süresinde NM-siRNA arasındaki etkileşime bağlı olarak zeta-potansiyeldeki değişim (1X siRNA tamponu 0,5 µM siRNA, pH 7,4; inkübasyon süresi: 30 dakika ve 20 saat; inkübasyon sıcaklığı: 25°C).

Şekil 4.16 incelendiğinde FFA (A) ve Ca²⁺-FFA (B) NM'lerin tüm derişimlerinde siRNA ile etkileşim sonrası zeta-potansiyelde düşüş gözlemlendi. İnkübasyon süresindeki değişimin, ciddi bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü. Ayrıca bu düşüşün artan NM derişiminden etkilenmediği görüldü. Elde edilen sonuçlar, FFA ve Ca²⁺-FFA NM'leri ile inkübasyon ortamında siRNA arasında bir kompleksleşme olduğunu ve stabilitenin de korunduğunu göstermektedir.

4.6 Agaroz Jel Elektroföresi

Nano-materyallerin siRNA örneklerine (Bcl-xL ve Mcl-1) bağlanma yetenekleri yatay agaroz jel elektroföresi ile incelendi. Bu amaçla FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'leri siRNA'lar ile inkübe edildi. Elde edilen elektroföregramlar Şekil 4.17'de verildi. Her bir elektroföregram bandının karşılığı Çizelge 4.6'da belirtildi.



Şekil 4.17. Farklı derişimlerdeki FFA ve Ca²⁺-FFA nano-materyallerine sahip siRNA'nın elektroföregramı (2 µM siRNA; 1X siRNA tamponu, pH, 7,4; NM'lerin siRNA ile inkübasyon süresi: 25°C'de 30 dakikadır.).

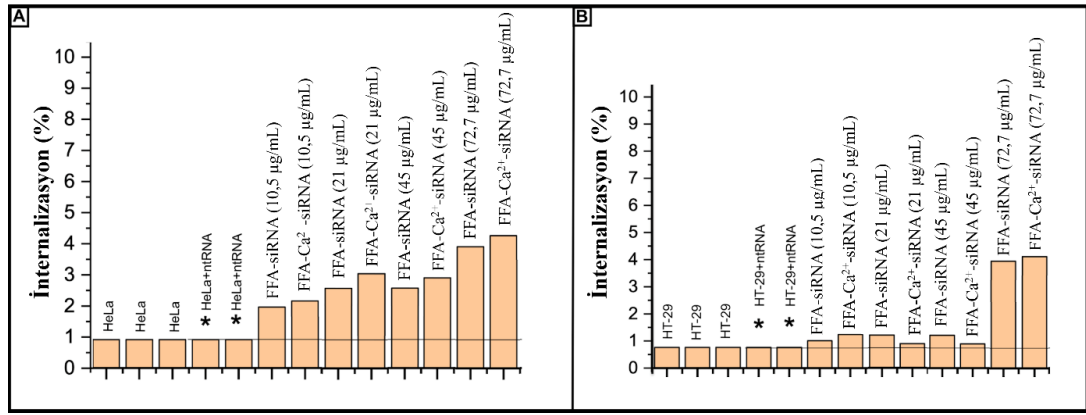
Çizelge 4.6. Farklı derişimlerdeki FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyallerine sahip siRNA'nın elektroforegram karşılığı (İnkübasyon süresi: 30 dakika).

1	siRNA buffer+6x DNA loading Dye
2	siRNA (Mcl-1)
3	FFA (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
4	siRNA (Mcl-1) + FFA (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
5	FFA- Ca^{2+} (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
6	Ca^{2+} -FFA (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
7	siRNA (Mcl-1) + FFA (62,5 $\mu\text{g/mL}$)
8	siRNA (Mcl-1) + Ca^{2+} -FFA (62,5 $\mu\text{g/mL}$)
9	siRNA (Mcl-1) + FFA (25,0 $\mu\text{g/mL}$)
10	siRNA (Mcl-1) + Ca^{2+} -FFA (25,0 $\mu\text{g/mL}$)
11	siRNA (Bcl-xL)
12	siRNA (Bcl-xL) + FFA (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
13	siRNA (Bcl-xL) + Ca^{2+} -FFA (200,0 $\mu\text{g/mL}$)
14	siRNA (Bcl-xL) + FFA (62,5 $\mu\text{g/mL}$)
15	siRNA (Bcl-xL) + Ca^{2+} -FFA (62,5 $\mu\text{g/mL}$)
16	siRNA (Bcl-xL) + FFA (25,0 $\mu\text{g/mL}$)
17	siRNA (Bcl-xL) + Ca^{2+} -FFA (25,0 $\mu\text{g/mL}$)
18	siRNA buffer+6x DNA loading Dye

Elde edilen sonuçlar, FFA ve Ca^{2+} -FFA nano-materyallerin siRNA örnekleri ile etkileşiminin bu genetik molekülün elektroforetik hareketliliğini engellemediğini göstermektedir.

4.7 Akış Sitometri Kullanılarak HT-29 ve Hela Kanser Hücrelerine NM-siRNA Komplekslerinin İnternalizasyonu

NM-siRNA komplekslerinin farklı derişimlerinin HeLa ve HT29 hücre hatları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda internalizasyon derecesi üzerine etkisi Şekil 4.18'de verilmiştir.

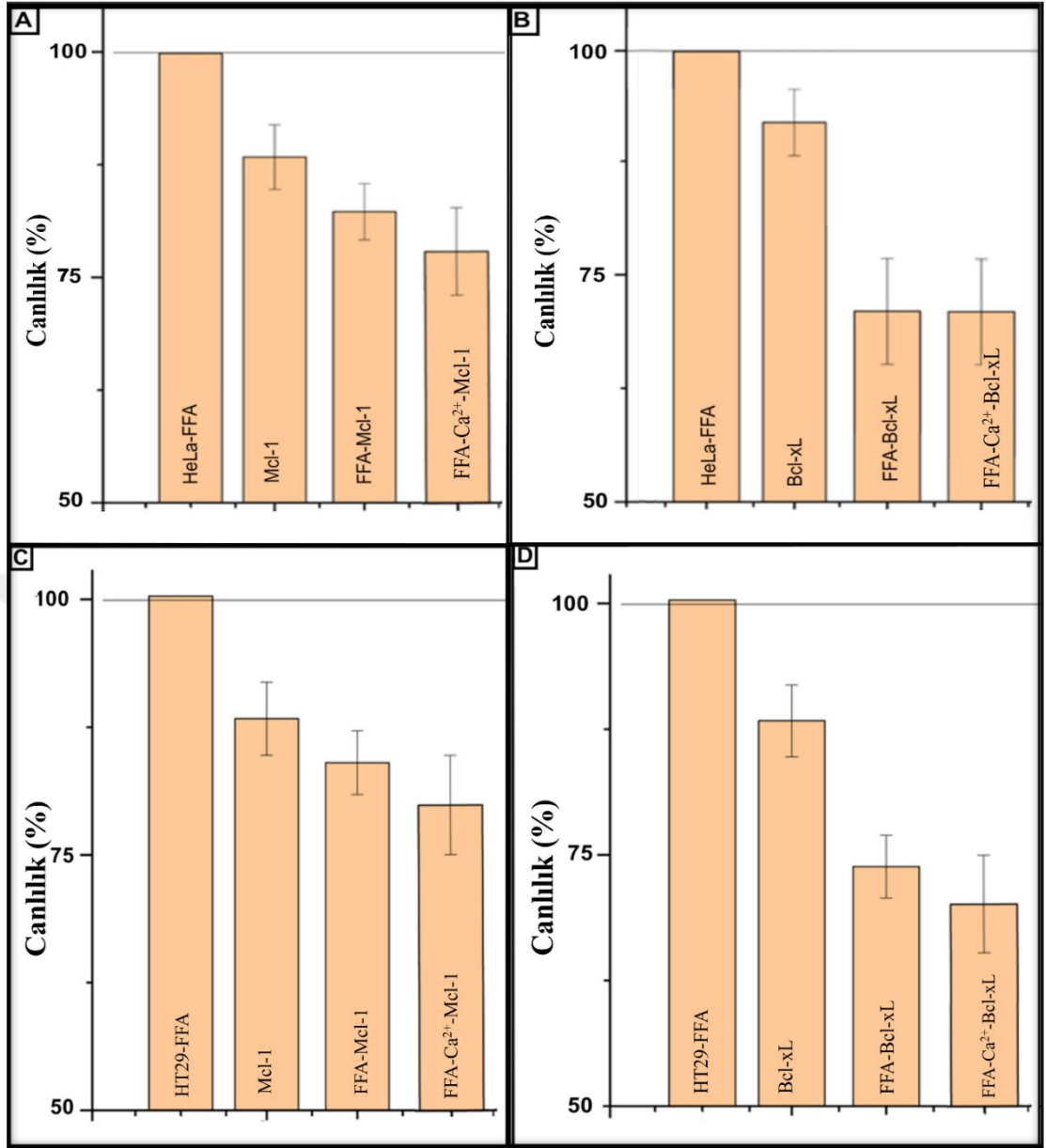


Şekil 4.18. Farklı derişimlerdeki FFA, Ca²⁺-FFA-NM'lerin ntRNA ve siRNA komplekslerinin HeLa(A) ve HT29(B) hücrelerine internalizasyonu (Hücre etkileşim süresi; 37⁰C'de 24 saat).

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi sabit hücre derişimine karşı değişen NM komplekslerinin hücre internalizasyonu HeLa hücrelerinde HT29 hücrelerine göre nispeten yüksek görünse de genel olarak ortalama %2-4 arasındadır. Ca²⁺'lu komplekslerin hücre internalizasyonunda yalın komplekslere göre çok yüksek oranda olmasa da bir artış olduğu görülmektedir. Ayrıca grafik incelendiğinde NM'lerin siRNA molekülleri ile olan komplekslerinin HeLa ve HT29 hücrelerine internalizasyonu, yalın siRNA moleküllerine kıyasla kolaylaştırdığı görülmektedir. siRNA'nın üzerindeki, hücre internalizasyonunu zorlaştıran negatif yükün, NM'ler ile oluşturduğu komplekslerde şiddetinin düşmesinden dolayı hücresel alımı artırdığı düşünülmektedir. Katyonik nano-materyallerin siRNA'nın hücre internalizasyonunu kolaylaştırdığı söylenebilir (Morille vd., 2008; Adesine ve Akala, 2015).

4.8 Tümör Hücrelerine Karşı NM-siRNA Komplekslerinin Sitotoksikite Analizi

siRNA'lar ile kompleks oluşturmuş NM'lerin sitotoksik etkisini incelemek için, HeLa ve HT29 hücre hatları ile FFA ve Ca²⁺-FFA-NM'lerin siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) kompleksleri 24 saat süre ile etkileştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL)'lar ile muamele edilmiş ve edilmemiş FFA ve Ca²⁺-FFA- NM'lerin HeLa (A-B) ve HT29 (C-D) tümör hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi: NM derişimi: 0,88 µg/mL; İnkübasyon süresi: 24 saat; Sıcaklık: 37°C.

Şekil 4.19'da görüleceği gibi, Mcl-1 ve Bcl-xL siRNA'lar ile kompleks halindeki NM'ler, 24 saatlik inkübasyondan sonra HeLa ve HT29 tümör hücrelerinin canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Şekil 4.17'deki hücre internalizasyon çalışmalarının sonuçlarıyla birlikte ele alındığında Ca²⁺ takılı NM'lerin bazı derişimlerde yalın NM'lere kıyasla daha düşük bir internalizasyon derecesine sahip olmasına rağmen Şekil 4.19'de görüldüğü gibi yüksek bir hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu durum iki şekilde açıklanabilir: (1) Ca²⁺ takılı NM'lerin yüzeyine

susturucu ektili siRNA'ların daha etkin bağlanması, (2) Ca^{2+} takılı NM'lerin hücreye girmesi ile birlikte hücre Ca^{2+} iyon dengesinin değişimi ve bu durumun da apoptozisi tetiklemesi. Bu olası sonuç ile ilgili literatürde de pek çok çalışma mevcuttur (Orrenius ve Nicotera, 1994; Guo vd., 2009; Sukumaran vd., 2021).

Tümör hücrelerinin NM olmaksızın siRNA'lar (Bcl-xL, Mcl-1) ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığında %8–20 aralığında bir düşüş olurken, bu azalma yalın ve Ca^{2+} iyonları takılı NM'lerin siRNA'lar ile oluşturduğu komplekslerin varlığında sırasıyla %15–28 ve %19–36 olarak gerçekleşmiştir. Ortamda Ca^{2+} iyonlarının varlığı tümör hücre ölümlerinde yaklaşık olarak %4-8'lik bir fark oluşturmuştur. Sonuç olarak, Ca^{2+} iyonlarının bu tür çalışmalarda siRNA taşıyıcı yapıların gerek yüzey yükünü dengelemede ve gerekse tümör hücrelerinin canlılığının azaltılmasında etkili olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

FFA dipeptitinin GA ile çapraz bağlandığı FT-IR sonuçları ile belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında, dipeptitin -amin grubuna ve GA'nın serbest aldehit grubuna ait piklerin, NM sentezi ile yok olduğu ve ön görüldüğü şekilde çapraz bağlanmanın gerçekleştiği ortaya konmuştur.

Kırk sekiz saatlik optimum sürede sentezlenen FFA NM'lerinin ortalama boyutu 87,93 nm olup, hedeflenen şekilde NM'lerin %74' ünün 100 nm ve altında olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca PDI değeri 0,054 olarak hesaplanmıştır. 0,1' den küçük olan bu değer yapının monodispers olduğunu göstermiştir (Raval vd., 2019).

FFA NM'lerin yüzey yükleri -20,1 mV iken Ca^{2+} ile dekore edilen FFA NM'lerinin yüzey yükü +9,3 mV ölçülmüştür. Yalın FFA NM' indeki -amid grupları üzerindeki olası rezonans yapıdan kaynaklı negatif yükün, Ca^{2+} iyonlarının ortama eklenmesiyle önce dengelenip ardından pozitifliğe kaydığı görülmüştür (Bozdoğan vd., 2017). Nanomateriyaller elektrostatik etkileşimler sayesinde hücre zarına yüksek ilgi gösterebilir (Bernfield vd., 1999). Hücre zarları büyük negatif yüklere sahiptir. Bu büyük negatif yük sayesinde negatif yüklü nanoyapıların hücreye girişini engelleyebilir (Honary ve Zahir, 2013). Pozitif yüklü nanoyapılar, nötr veya negatif yüklü yapılara göre tercihen tümörlü hücreler tarafından alınır ve daha uzun süre tutulur (Cafaggi vd., 2007; Yang vd., 2009).

Korona oluşumunda hem NM'lerin, boyutu, şekli, sahip olduğu yükü, yüzey modifikasyonları, hidrofilik veya hidrofobik karakterde olması hem de biyo-nano arayüzündeki hidrodinamik, elektrostatik veya sterik kuvvetler etkili olabilmektedir (Nel vd., 2009). Yapılan korona çalışmalarıyla farklı biyomoleküllerin (HSA, IgG ve DNA) değişen miktarlarda NM'lere tutunduğu ortaya konulmuştur.

FFA ve Ca^{2+} -FFA NM'lerin sitotoksik etkileri incelendiğinde herhangi bir toksik etki görülmediği gibi NM'ler biyoyumlu ve aminoasit temelli olduklarından dolayı hücreler için besin kaynağı olarak hücre canlılığında artış sağladığı görülmüştür.

FFA ve Ca^{2+} -FFA NM'lerin farklı derişimlerinin siRNA (Bcl-xL ve Mcl-1)'lara bağlanabilirlikleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında etkileşimin gerçekleştiği görülmüştür.

Farklı derişimlerdeki FFA ve Ca^{2+} -FFA NM'lerin siRNA ile oluşturdukları komplekslerin HeLa ve HT29 kanser hücrelerine 24 saatlik inkübasyon sonucuna bakıldığında bu hücrelere internalize oldukları görülmüştür.

Ca^{2+} ile katyonize edilmiş FFA-NM'lerin siRNA komplekslerinin düşük internalizasyona rağmen en yüksek oranda hücre ölümüne sebep olduğu ortaya konulmuştur. Bu da Ca^{2+} -FFA-NM'lerin siRNA'ların yüzey yükünü değiştirerek hücrelere girişini kolaylaştırdığı ve hücre içindeki Ca^{2+} dengesini değiştirerek apoptozisi tetiklediği şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte Ca^{2+} iyonunun FFA-NM'i gibi yüzey yükü negatif olan yapıların yüzey yükünü ayarlama ve internalizasyon çalışmalarında etkin bir ajan olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında FFA ve Ca^{2+} -FFA NM'leri sentezlenmiş ve susturucu rolündeki siRNA'lara takılarak hücre internalizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun neticesinde HeLa ve HT29 hücre hatlarında sebep olduğu ölümler, bu NM'lerin kanser tedavisinde kullanımı için umut verici olduğunu göstermiştir. Ayrıca halihazırda kanser tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlar yerine bu çalışmada kullanılan dipeptit temelli nano-materyalin biyo-uyumlu olması da gelecekteki çalışmalar için daha fazla tercih edilmesine sebep olacağı düşünülmektedir. Daha ileri çalışmalarda hazırlanan NM'lere susturucu siRNA'larla birlikte hedefleyici bir ajan ve hedef kanser tedavisinde etkin rol oynayacak ilaçlar takılarak kanserle daha etkin mücadele gerçekleştirme potansiyelinden dolayı gelecek adına umut vadetmektedir.

KAYNAKLAR

- Adesina, S. K. ve Akala, E. O., 2015. Nanotechnology approaches for the delivery of exogenous siRNA for HIV therapy, *Molecular Pharmaceutics*, 12, 12, 4175–4187.
- Adler-Abramovich, L., Aronov, D., Gazit, E. ve Rosenman, G., 2009. Patterned arrays of ordered peptide nanostructures, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 3, 1701-1708.
- Adler-Abramovich, L., Kol, N., Yanai, I., Barlam, D., Shneck, R. Z., Gazit, E. ve Rouso, I., 2010. Self-assembled organic nanostructures with metallic-like stiffness, *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 51, 9939-9942.
- Adler-Abramovich, L., Reches, M., Sedman, V.L, Allen, S. ve Gazit, E., 2006. Thermal and chemical stability of diphenylalanine peptide nanotubes: implications for nanotechnological applications, *Langmuir*, 22, 3, 1313-1320.
- Adolph, F., 1995. On liquid diffusion, *Journal of Membrane Science*, 100,33-38.
- Altuntaş, V. ve Gök, M., 2020. Protein-Protein Etkileşimi Tespit Yöntemleri, *Veri Tabanları ve Veri Güvenilirliği*, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 19, 722-733.
- Amdursky, N., Molotskii, M., Gazit, E. ve Rosenman, G., 2010. Elementary building blocks of self-assembled peptide nanotubes, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 44, 15632-15636.
- An, H. W., Li, L. L., Wang, Y., Wang, Z. Q., Hou, D. Y., Lin, Y. X., Qiao, S. L., Wang, M. D., Yang, C., Cong, Y., Ma, Y., Zhao, X. X., Cai, Q., Chen, W. T., Lu, C. Q., Xu, W. H., Wang, H. ve Zhao Y. L., 2019. A tumour-selective cascade activatable self-detained system for drug delivery and cancer imaging, *Nature Communications*, 10, 4861.
- Antaris, A. L., Chen, H., Cheng, K., Sun, Y., Hong, G. S., Qu, C. R., Diao, S., Deng, Z. X., Hu, X. M., Zhang, B., Zhang, X. D., Yaghi, O. K., Alamparambil, Z. R., Hong, X. C., Cheng, Z. ve Dai, H. J., 2016. A small-molecule dye for NIR-II imaging, *Nature Materials*, 15, 2, 235-242.
- Aydın, Ş. ve Kesmen, Z., 2020. Kendiliğinden Montajlı Peptidler ve Kullanım Alanları, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3,3, 361-385.
- Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767, 9, 1073–1101.
- Bellat, V., Ting, R., Southard, T. L., Vandat, L., Molina, H., Fernandez, J., Aras, O., Stokol, T. ve Law, B., 2018. Functional peptide nanofibers with unique tumor targeting and enzyme-induced local retention properties, *Advanced Functional Materials*, 28, 44, 1803969.

- Berger, O., Adler-Abramovich, L., Levy-Sakin, M., Grunwald, A., Liebes-Peer, Y., Bachar, M., Buzhansky, L., Mossou, E., Forsyth, V.T., Schwartz, T., Ebenstein, Y., Frolov F., Shimon, L.J.W., Patolsky, F. ve Gazit, E., 2015. Light-emitting self-assembled peptide nucleic acids exhibit both stacking interactions and Watson-Crick base pairing, *Nature Nanotechnology*, 10, 4, 353-360.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. ve Zako, M., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annual Review of Biochemistry*, 68, 1, 729–777.
- Berridge, M. V. ve Tan, A. S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 2, 474–482.
- Bozdoğan, B., 2017. Kanser tedavisinde gen taşıyıcı olarak kendiliğinden düzenlenen peptit nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2017.
- Bozdoğan, B., Akbal, Ö., Çelik, E., Türk, M. ve Denkbaş, E. B., 2017. Novel layer-by-layer self-assembled peptide nanocarriers for siRNA delivery, *RSC Advances*, 7, 75, 47592–47601.
- Bozkurt, O., Severcan, F., Bayari, S. H., Severcan, M., Krafft, C. ve Popp, J., 2012. Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study, *Journal of Biomedical Optics*, 17, 7, 76023.
- Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. ve Sah, D. W. Y., 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs, *Nature Chemical Biology*, 2, 12, 711-719.
- Cafaggi, S., Russo, E., Stefani, R., Leardi, R., Caviglioli, G., Parodi, B., Bignardi, G., De Toter, D., Aiello, C. ve Viale, M., 2007. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex, *Journal of Controlled Release*, 121, 1-2, 110–123.
- Chen, P., 2005. Self-assembly of ionic-complementary peptides: a physicochemical viewpoint, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 261, 3-24.
- Cheng, K. M., Ding, Y. P., Zhao, Y., Ye, S. F., Zhao, X., Zhang, Y. L., Ji, T. J., Wu, H. H., Wang, B., Anderson, G. J., Ren, L. ve Nie, G. J., 2018. Sequentially responsive therapeutic peptide assembling nanoparticles for dual-targeted cancer immunotherapy, *Nano Letters*, 18, 5, 3250-3258.
- Chuang, S. T. D., Yang, L., Zhang, Y. ve Lee K. B., 2016. Multidimensional nanomaterials for the control of stem cell fate, *Nano Convergence*, 3, 1, 23.

- Clark, T. D., Buriak, J. M., Kobayashi, K., Isler, M. P., McRee, D. E. ve Ghadiri, M. R., 1998. Cylindrical β -sheet peptide assemblies, *Journal of the American Chemical Society*, 120, 35, 8949-8962.
- Cui, H., Cheetham, A. G., Pashuck, E. T. ve Stupp, S. I., 2014. Amino acid sequence in constitutionally isomeric tetrapeptide amphiphiles dictates architecture of onedimensional nanostructures, *Journal of the American Chemical Society*, 136, 35, 12461–12468.
- Dai, Q., Yan, Y., Guo, J., Björnmalm, M., Cui, J., Sun, H. ve Caruso, F., 2015. Targeting ability of affibody-functionalized particles is enhanced by albumin but inhibited by serum coronas, *ACS Macro Letters*, 4,11, 1259-1263.
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. ve Ribas, A., 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature*, 464, 7291, 1067-1070.
- Demirel, D., 1995. Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri, *Türk Patoloji Dergisi*, 11,2.
- Dikici, E., Önal, A. B., Gök, T., Acet, Ö. ve Odabaşı, M., 2023. Self-Assembled Short Peptide Nanostructures:Dipeptides, *Manas Journal of Engineering*, 11, 1, 83-91.
- Dorsett, Y. ve Tuschl T., 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics, *Nat Rev Drug Discov.*, 3, 4, 318-329.
- Dunphy, C. H., 2004. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 128, 9, 1004-1022.
- Edwards-Gayle, C. J. C. ve Hamley I. W., 2017. Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15, 5867.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. ve Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411, 6836, 494–498.
- Elfrink, K., Ollesch, J., Stöhr, J., Willbold, D., Riesner, D. ve Gerwert, K., 2008. Structural changes of membrane-anchored native PrPC, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105,31, 10815-10819.
- Estroff, L. A. ve Hamilton, A. D., 2004. Water gelation by small organic molecules, *Chemical Reviews*, 104, 3, 1201-1217.
- Fire, A., Xu S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. ve Mello, C. C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 6669, 806–811.

- Fleming, S. ve Ulijn, R. V., 2014. Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles, *Chemical Society Reviews*, 43, 23, 8150-8177.
- Fosgerau, K. ve Hoffmann, T., 2015, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug discovery today*, 20, 1, 122-128.
- Gan, Z. X., Wu, X. L., Zhu, X. B. ve Shen, J. C., 2013. Light-induced ferroelectricity in bioinspired self-assembled diphenylalanine nanotubes/microtubes, *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 7, 2055-2059.
- Gao, X. ve Matsui, H., 2005. Peptide-based nanotubes and their applications in bionanotechnology, *Advanced Materials*, 17, 17, 2037-2050.
- Gazit, E., 2007. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization, *Chemical Society Reviews*, 36, 8, 1263-1269.
- Gebauer, J. S., Malissek, M., Simon, S., Knauer, S. K., Maskos, M., Stauber, R. H., Peukert, W. ve Treuel, L., 2012. Impact of the nanoparticle–protein corona on colloidal stability and protein structure, *Langmuir*, 28, 25, 9673-9679.
- Gewirtz, A. M., 2007. On Future's Doorstep: RNA Interference and The Pharmacopeia of Tomorrow, *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 12, 3612- 3614.
- Goldberger, J. E., Berns, E. J., Bitton, R., Newcomb, C. J. ve Stupp, S. I., 2011. Electrostatic control of bioactivity, *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 28, 6292-6295.
- Guo, J., Lao, Y. ve Chang, D. C., 2009. Calcium and apoptosis, *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 597–622.
- Han, J., Park, J. ve Kim, B. S., 2015. Integration of mesenchymal stem cells with nanobiomaterials for the repair of myocardial infarction, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 95, 15-28.
- Hancock, R. E. ve Sahl, H. G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature biotechnology*, 24, 12, 1551-1557.
- Haris, P. I. ve Severcan, F., 1999. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 1-4, 207–221.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E. ve Stupp, S. I., 2002. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 8, 5133-5138.
- Hendricks, M. P., Sato, K., Palmer, L. C. ve Stupp, S. I., 2017. Supramolecular assembly of peptide amphiphiles, *Accounts of Chemical Research*, 50, 10, 2440–2448.

- Honary, S. ve Zahir, F., 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 2, 265-273.
- Hu, K., Geng, H., Zhang, Q. Z., Liu, Q. S., Xie, M. S., Sun, C. J., Li, W. J., Lin, H. C., Jiang, F., Wang, T., Wu, Y. D. ve Li, Z. G., 2016. An in-tether chiral center modulates the helicity, cell permeability, and target binding affinity of a peptide, *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 28, 8013-8017.
- Hu, K., Jiang, Y., Xiong, W., Li, H., Zhang, P. Y., Yin, F., Zhang, Q., Geng, H., Jiang, F., Li, Z. ve Wang, X., 2018b. Tuning peptide self-assembly by an in-tether chiral center, *Science Advances*, 4, 5, 5907.
- Hu, K., Zheng, C., Miao, X. ve Wang, L., 2018a. A peptide-based supercapacitor and its performance improvement via TiO₂ coating, *Journal of Materials Chemistry*, 6, 17, 8047-8052.
- Huang, R., Su, R., Qi, W., Zhao, J. ve He, Z., 2011a. Hierarchical, interface-induced self-assembly of diphenylalanine: formation of peptide nanofibers and microvesicles, *Nanotechnology*, 22, 24, 245609.
- Huang, R., Wei, Q., Su, R., Zhao, J. ve He, Z., 2011b. Solvent and surface controlled self-assembly of diphenylalanine peptide: from microtubes to nanofibers, *Soft Matter*, 7, 14, 6418.
- Hyman, P., 2012. Chapter 3- Bacteriophages and Nanostructured Materials, in *Advances in Applied Microbiology*, S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey, Academic Press, Volume 78, 55-73.
- Jeon, J. ve Shell, M. S., 2014. Self-assembly of cyclo-diphenylalanine peptides in vacuum, *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, 24, 6644–6652.
- Jiang, T., Deng, M., James, R., Nair, L. S. ve Laurencin, C. T., 2014. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering, *Acta Biomaterialia*, 10, 4, 1632-1645.
- Kelly, C. M., Northey, T., Ryan, K., Brooks, B. R., Kholkin, A. L., Rodriguez, B. J. ve Buchete, N. V., 2015. Conformational dynamics and aggregation behavior of piezoelectric diphenylalanine peptides in an external electric field, *Biophysical chemistry*, 196, 16-24.
- Kiselev, M. A., Iu A. G., Dobretsov, G. E. ve Komarova, M. N., 2001. Size of a human serum albumin molecule in solution, *Biofizika*, 46, 3, 423-427.
- Kopp, M., Kollenda, S. ve Eppele, M., 2017. Nanoparticle–protein interactions: therapeutic approaches and supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 50, 6, 1383-1390.

- Krone, M. G., Hua, L., Soto, P., Zhou, R. H., Berne, B. J. ve Shea, J. E., 2008. Role of water in mediating the assembly of Alzheimer amyloid- β A β 16-22 protofilaments, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 33, 11066-11072.
- Kshitiz, P. J. S., Kim, P., Helen, W., Engler, A. J., Levchenko, A. ve Kim, D., 2012. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments, *Integrative Biology*, 4, 9, 1008-1018.
- Lee, N. R., Bowerman, C. J. ve Nilsson, B. L., 2013. Effects of varied sequence pattern on the self-assembly of amphipathic peptides, *Biomacromolecules*, 14, 9, 3267-3277.
- Lee, Y. S., 2008. Self-Assembly, In *Self-Assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach*, John Wiley and Sons: Hoboken, 1-19.
- Li, L. L., Ma, H. L., Qi, G. B., Zhang, D., Yu, F. Q., Hu, Z. Y. ve Wang, H., 2016. Pathological-condition-driven construction of supramolecular nanoassemblies for bacterial infection detection, *Advanced Materials*, 28,2, 254-262.
- Li, T., Lu, X. M., Zhang, M. R., Hu, K. ve Li, Z., 2022. Peptide-based nanomaterials: Self-assembly, properties and applications, *Bioactive Materials*, 11, 268–282.
- Li, Y., Li, B., Fu, Y., Lin, S. ve Yang, Y., 2013. Solvent-induced handedness inversion of dipeptide sodium salts derived from alanine, *Langmuir*, 29, 31, 9721-9726.
- Liang, X., Zhang, Y., Zhou, J., Bu, Z., Liu, J. ve Zhang, K., 2022. Tumor microenvironment-triggered intratumoral in situ construction of theranostic supramolecular self-assembly, *Coordination Chemistry Reviews*, 473, 214824.
- Liu, J., Wang, D., Zheng, Q., Lu, M. ve Arora, P. S., 2008. Atomic structure of a short α -helix stabilized by a main chain hydrogen-bond surrogate, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 13, 4334-4337.
- Liyanage, W. ve Nilsson, B. L., 2016. Substituent effects on the self-assembly/coassembly and hydrogelation of phenylalanine derivatives, *Langmuir*, 32, 3, 787-799.
- Luo, Z., Zhao, X., Zhang, S. ve Hilal, L., 2008. Structural dynamic of a self-assembling peptide d-EAK16 made of only d-amino acids, *PloS One*, 3, 5, e2364.
- Ma, X., Xing, R., Yuan, C., Ogino, K. ve Yan, X., 2020. Tumor therapy based on self-assembling peptides nanotechnology, *View*, 1, 20200020.
- Mandler, D. ve Kraus-Ophir, S. 2011. Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing. *Journal of Solid-State Electrochemistry*, 15, 7-8, 1535.
- Martino, S., D'Angelo, F., Armentano, I., Kenny, J. M. ve Orlacchio, A., 2012. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine, *Biotechnology Advances*, 30, 1, 338–351.

- McKeon-Fischer, K. D. ve Freeman, J. W., 2011. Characterization of electrospun poly (L- 46 lactide) and gold nanoparticle composite scaffolds for skeletal muscle tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 7, 560-568.
- Meng, Q., Kou, Y., Xin, M., Liang, Y. ve Liu, K., 2012. Tunable self-assembled peptide amphiphile nanostructures, *Langmuir*, 28, 11, 5017-5022.
- Mingozi, F. ve High, K. A., 2011. Gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges, *Nature Reviews Genetics*, 12, 5, 341-355.
- Mittal, P., Yadav, R. ve Devi, R., 2012. Phenomenal RNA Interference: From Mechanism to Application, *Crop Plant*, 4, 61-76.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A. ve Benoit, J. P., 2008. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer, *Biomaterials*, 29, 24-25, 3477-3496.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. ve Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8, 7, 543-557.
- Nguyen, T. P., Easley, A. D., Kang, N. A., Khan, S., Lim, S. M., Rezenom, Y. H., Wang, S. Y., Tran, D. K., Fan, J. W., Letteri, R. A., He, X., Su, L., Yu, C. H., Lutkenhaus, J. L. ve Wooley, K. L., 2021. Polypeptide organic radical batteries, *Nature*, 593, 7857, 61.
- Orrenius, S. ve Nicotera, P., 1994. The calcium ion and cell death. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 43, 1-11.
- Pabo, C. O., Peisach, E. ve Grant, R. A., 2001. Design and selection of novel Cys (2) His (2) zinc finger proteins, *Annual Review of Biochemistry*, 70, 313.
- Pala, B. B., Vural, T., Kuralay, F., Çırak, T., Bolat, G., Abacı, S. ve Denkbaş, E. B., 2014. Disposable pencil graphite electrode modified with peptide nanotubes for Vitamin B 12 analysis, *Applied Surface Science*, 303, 37-45.
- Perween, S., Chandanshive, B., Kotamarthi, H. C. ve Khushalani D., 2013. Single amino acid based self-assembled structure. *Soft Matter*, 9, 42, 10141-10145.
- Peters, C., Hoop, M., Pané, S., Nelson, B.J. ve Hierold, C., 2016. Degradable Magnetic Composites for Minimally Invasive Interventions: Device Fabrication, Targeted Drug Delivery and Cytotoxicity Tests, *Advanced Materials*, 28, 533-538.
- Qiu, F., Chen, Y. Z., Tang, C. K., Zhou, Q. H., Wang, C., Shi, Y. K. ve Zhao, X. J., 2008. De Novo design of a bolaamphiphilic peptide with only natural amino acids, *Macromolecular Bioscience*, 8, 11, 1053-1059.

- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B. ve Tekade, R. K., 2019. Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development, In Basic Fundamentals of Drug Delivery, Tekade, R.K., 369-400, Academic Press, Elsevier Inc., Amsterdam, Hollanda.
- Reches, M. ve Gazit, E., 2003. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes, *Science*, 300, 5619, 625-627.
- Reches, M. ve Gazit, E., 2006. Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes, *Nature Nanotechnology*, 1, 3, 195-200.
- Rehm, T. H. ve Schmuck, C., 2010. Ion-pair induced self-assembly in aqueous solvents, *Chemical Society Reviews*, 39, 10, 3597-3611.
- Reuther, J. F., Dees, J. L., Kolesnichenko, I. V., Hernandez, E. T., Ukraintsev, D. V., Guduru, R., Whiteley, M. ve Anslyn, E. V., 2018. Dynamic covalent chemistry enables formation of antimicrobial peptide quaternary assemblies in a completely abiotic manner, *Nature Chemistry*, 10, 1, 45-50.
- Rica, R., Mendoza, E., Lechuga, L. M. ve Matsui, H., 2008. Label-free pathogen detection with sensor chips assembled from peptide nanotubes, *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 50, 9752-9755.
- Richardson, J. J., Bjornmalm, M. ve Caruso, F., 2015. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms, *Science*, 348, 6233, 12.
- Rodriguez-Vazquez, N., Lionel, O. H., Arcadio, G., Gonzalez-Freire, E., Fuertes, A., Panciera, M., Juan, M. P., Outeiral, J., Montenegro, J., Garcia-Fandino, R., Amorin, M. ve Juan, R. G., 2014. Membrane-targeted self-assembling cyclic peptide nanotubes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14, 23, 2647-2661.
- Rubert, M., Fang-Li, Y., Aslan, H., Yu, Y., Howard, K. A., Dong, MD., Besenbacher, F. ve Chen, M., 2014 Inflammatory response of RAW 264.7 cells to ultraporous interweaving PCL-PEO electrospun microfibers, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8, 249-249.
- Schneider, J. P., Pochan, D. J., Ozbas, B., Rajagopal, K., Pakstis, L. ve Kretsinger, J., 2002. Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 50, 15030-15037.
- Schöttler, S., Becker, G., Winzen, S., Steinbach, T., Mohr, K., Landfester, K., Mailänder, V. ve Wurm, F. R., 2016. Protein adsorption is required for stealth effect of poly (ethylene glycol)-and poly (phosphoester)-coated nanocarriers. *Nature Nanotechnology*, 11, 4, 372–377.
- Schröder, H. V., Zhang, Y. ve Link, A. J., 2021. Dynamic covalent self-assembly of mechanically interlocked molecules solely made from peptides, *Nature Chemistry*, 13, 850–857.

- Sedman, V. L., Adler-Abramovich, L., Allen, S., Gazit, E. ve Tendler, S. J. B., 2006. Direct observation of the release of phenylalanine from diphenylalanine nanotubes, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 21, 6903-6908.
- Shamos, M. H. ve Lavine, L. S., 1967. Piezoelectricity as a fundamental property of biological tissues, *Nature*, 213, 5073, 267-269.
- Shklovsky, J., Beker, P., Amdursky, N., Gazit, E. ve Rosenman, G., 2010, Bioinspired peptide nanotubes: Deposition technology and physical properties, *Materials Science and Engineering: B*, 169, 1-3, 62-66.
- Steiner, T. ve Koellner, G., 2001. Hydrogen bonds with π -acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures, *Journal of Molecular Biology*, 303, 3, 535-557.
- Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L. R., Selvaraj, S. ve Singh, B. B., 2021. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis, *Cells*, 10, 8, 2125.
- Szewczyk, M., Drzewinska, J., Dzmitruk, V., Shcharbin, D., Klajnert, B., Appelhans, D. ve Bryszewska, M., 2012. Stability of dendriplexes formed by anti-HIV genetic material and poly (propylene imine) dendrimers in the presence of glucosaminoglycans, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, 50, 14525-14532.
- Tapia, M. J., Montserín, M., Valente, A. J. M., Burrows, H. D. ve Mallavia R., 2010. Binding of polynucleotides to conjugated polyelectrolytes and its applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 158, 1-2, 94-107.
- Tiné, M. R., Alderighi, M., Duce, C., Ghezzi, L. ve Solaro, R., 2011. Effect of temperature on self-assembly of an ionic tetrapeptide, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 103,1, 75-80.
- Toksöz, S., Acar, H. ve Güler, M. O., 2010. Self-assembled one-dimensional soft nanostructures, *Soft Matter*, 6, 23, 5839-5849.
- Toshiki, S., Tsuyoshi, T. ve Mihara, H., 2009. Affinity-Based Screening of Peptides Recognizing Assembly States of Self-Assembling Peptide Nanomaterials, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 40, 14434–14441.
- Tu, R. S. ve Tirrell M., 2004. Bottom-up design of biomimetic assemblies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 11, 1537–1563.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. ve Boyd, M. R., 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Research*, 51, 10, 2515–2520.
- Wang, H. M., Feng, Z. Q. Q. ve Xu, B., 2019. Instructed assembly as context-dependent signaling for the death and morphogenesis of cells, *Angewandte Chemie International Edition*, 58,17, 5567-5571.

- Wang, H. M., Shi, J. F., Feng, Z. Q. Q., Zhou, R., Wang, S. Y., Rodal, A. A., Xu, B., 2017. An in situ dynamic continuum of supramolecular phosphoglycopeptides enables formation of 3D cell spheroids, *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 51, 16297-16301.
- Wang, H. M., Wei, J., Yang, C. B., Zhao, H. Y., Li, D. X., Yin, Z. N. ve Yang, Z. M., 2012. The inhibition of tumor growth and metastasis by self-assembled nanofibers of taxol, *Biomaterials*, 33, 24, 5848-5853.
- Wang, J., Chatrathi, P. M. ve Tian, B., 2001. Microseparation Chips for Performing Multienzymatic Dehydrogenase/Oxidase Assays: Simultaneous Electrochemical Measurement of Ethanol and Glucose, *Analytical Chemistry*, 73, 6, 1296-1300.
- Wang, J., Chen, L. Q., Wu, J. D., Li, W., Liu, K., Masuda, T. ve Zhang A., 2018. Supramolecular assembly of C3-peptides into helical fibers stabilized through dynamic covalent chemistry, *Chemistry: An Asian Journal*, 13, 23, 3647-3652.
- Wang, J., Liu, K., Xing, R. R. ve Yan, X. H., 2016. Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics, *Chemical Society Reviews*, 45, 20, 5589–5604.
- Wen, Y., Roudebush, S. L., Buckholtz, G. A., Goehring, T. R., Giannoukakis, N., Gawalt, E. S. ve Meng, W. S., 2014. Coassembly of amphiphilic peptide EAK16-II with histidinylated analogues and implications for functionalization of beta-sheet fibrils *in vivo*, *Biomaterials*, 35, 19, 5196–5205.
- Xiong, W., Hu, K. Li, Z., Jiang, Y., Li, Z., Li, Z. ve Wang, X., 2019. A wearable system based on core-shell structured peptide-Co9S8 supercapacitor and triboelectric nanogenerator, *Nano Energy*, 66, 104149.
- Xu, C. ve Wang, J., 2015. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 1, 1–12.
- Xu, H., Wang, J., Han, S., Wang, J. ve Jian, R. L., 2009. Hydrophobic-region-induced transitions in self-assembled peptide nanostructures, *Langmuir*, 25, 7, 4115-4123.
- Xu, W., Jing, P., Yi, H., Xue, S. ve Yuan, R., 2016. Bimetallic Pt/Pd encapsulated mesoporous-hollow CeO₂ nanospheres for signal amplification toward electrochemical peptide-based biosensing for matrix metalloproteinase 2, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 230, 345-352.
- Yang, R., Yang, S. G., Shim, W. S., Cui, F., Cheng, G., Kim, I. W., Kim, D. D., Chung, S. J. ve Shim, C. K., 2009. Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified PLGA nanoparticles via transient formation of microaggregates, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 3, 970–984.
- Yemini, M., Reches, M., Gazit, E. ve Rishpon, J., 2005. Peptide nanotube-modified electrodes for enzymebiosensor applications, *Analytical Chemistry*, 77, 16, 5155-5159.

- Yokoi, H., Kinoshita, T. ve Zhang, S., 2005. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scazffold, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 24, 8414-8419.
- Zhang, D., Qi, G. B., Zhao, Y. X., Qiao, S. L., Yang, C. ve Wang, H., 2015. In situ formation of nanofibers from purpurin18-peptide conjugates and the assembly induced retention effect in tumor sites, *Advanced Materials*, 27, 40, 6125-6130.
- Zhang, H., Fei, J., Yan, X., Wang, A. ve Li, J., 2015. Enzyme-responsive release of doxorubicin from monodisperse dipeptide-based nanocarriers for highly efficient cancer treatment *in vitro*, *Advanced Functional Materials*, 25, 8, 1193-1204.
- Zhang, S., Lockshin, C., Cook, R. ve Rich, A., 1994. Unusually stable beta-sheet formation in an ionic self-complementary oligopeptide, *Biopolymers*, 34, 5, 663–672.
- Zhao, C., Tan, A., Pastorin, G. ve Ho, H. K., 2013. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering, *Biotechnology Advances*, 31, 5, 654–668.
- Zhu, P. L., Yan, X. H., Su, Y., Yang, Y. ve Li, J. B., 2010. Solvent-induced structural transition of self-assembled dipeptide: from organogels to microcrystals, *Chemistry: A European Journal*, 16, 10, 3176-3183.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Emrah DİKİCİ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
2005-2009

Yüksek Lisans : Erzurum Binali Yıldırım Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı,
2009-2012

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Mesleki Deneyim

1. Aksaray Üniversitesi, Güzelyurt MYO, Gıda İşleme Bölümü, Akademik Uzman
2. Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Akademik Uzman
3. Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Öğretim Görevlisi
4. Uniwersytet Łódzki, POLONYA, Erasmus+KA103 Personel Eğitim Alma Hareketliliği

Ödüller

1. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2022-1 (%100 Desteklenme)
2. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2023-1 (%100 Desteklenme)
3. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2023-2 (%100 Desteklenme)

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Dikici, E., Acet, B.Ö., Gök, T., Acet, Ö. ve Odabasi, M., 2023. Self-Assembled Short Peptide Nanostructures: Dipeptides, MANAS Journal of Engineering, 11, 1, 83-91. <https://doi.org/10.51354/mjen.1282790>

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. **Dikici, E.**, Gök, T., Shcharbin, D., Odabaşı, M., 2023. Preparation of Dipeptide-Based Nanoparticles and Their Cellular Interactions, Sözlü Sunum, 5.EBAT Kongresi (Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress), Antalya

Projeler

1. COST, Peptid Biyopolimerik Nanomalzemeler: Sentezi, İşlevselleştirilmesi, Karakterizasyonu ve Kanser Hücrelerine Girebilen Sistemler Olarak Değerlendirilmesi, Bursiyer (Proje No: 220N178, Tamamlandı, 15.06.2021-15.06.2023)

