

**KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BİYOAKTİF ALKALEN FOSFATAZ TAKLİDİ NANO  
YAPILARIN GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ**

**KONYA**

**OCAK, 2022**



**KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOAKTİF ALKALEN FOSFATAZ TAKLİDİ NANO YAPILARIN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi G\*\*\*\*\*n G\*\*\*\*\*N**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Meram-KONYA**

**OCAK, 2022**

D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ tarafından hazırlanan “**Biyoaktif Alkalen Fosfataz Taklidi Nano Yapıların Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma, 14/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi G\*\*\*\*\*n G\*\*\*\*\*N .....  
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi

Başkan : Doç. Dr. S\*\*\*h Ö\*\*\*\*\*U .....  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Üye :Dr. Öğr. Üyesi S\*\*\*\*\*s E\*\*\*Ş Ç\*\*\*\*\*K .....  
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi

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

Dr. Öğr. Üyesi S\*\*\*\*\*s E\*\*\*Ş Ç\*\*\*\*\*K  
Anabilim Dalı Başkanı

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. S\*\*\*\*\*r B\*\*\*\*\*L  
Müdür

## ÖZET

# BIYOAKTİF ALKALEN FOSFATAZ TAKLİDİ NANO YAPILARIN GELİŞTİRİLMESİ

Y\*\*\*\*\*İ, D\*\*\*\*\*a

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi G\*\*\*\*\*n G\*\*\*\*\*N

Ocak 2022, 100 Sayfa

Enzimler canlı organizmalarda gerçekleşen kimyasal reaksiyonları milyonlarca kat hızlandıran biyo-moleküllerdir. Yüksek katalitik aktiviteleri ve substrat özgüllüklerinin çok iyi olması sebebiyle pek çok alanda kullanımları bulunmaktadır. Enzimlerin üretim koşullarının zorluğu, yüksek sıcaklık ve pH gibi farklı koşullarda bozulabilmeleri dezavantajları kullanımlarını sınırlandırabilmektedir. Bu sınırlamalardan dolayı enzimlerin biyolojik ve kimyasal aktivitelerini mimik edebilen enzim mimik yapılar önem kazanmıştır.

Alkale Fosfataz (ALP) yeni kemik oluşumu esnasında üretilen ve organik fosfatları inorganik fosfatlara çeviren hidrolaz ailesine ait bir enzimdir. ALP, osteoblast farklılaşmasını sağlayan, osteogenik biyorejenerasyon mekanizmasında görevli en kritik enzimlerden birisidir. Çalışmamızda ALP enziminin katalitik aktivitesini mimik etmek üzere birçok enzimin aktif bölgesinde bulunan histidin ve serin aminoasitleriyle fonksiyonlandırılmış fulleren nanopartikülleri geliştirilmiştir. Fullerenler (C<sub>60</sub>), küresel yüzeyleri ve fonksiyonlandırılmaya açık olmaları gibi özellikleri sayesinde enzim mimiği olarak kullanımı potansiyel vaadeden moleküllerdir. Tasarlanan ALP mimetik yapıların fosfataz benzeri katalitik aktivitenin yanında osteoprogenitör hücre olan insan osteosarkomu (SaOS-2) hücrelerinde ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde (BM-MSC) osteogenik farklılaşmayı ve biyomineralizasyonu indüklemesi amaçlanmıştır. Yapay katalistlerin ALP aktivitesi başarısını göstermek için enzim kinetiği, yüzey biyo-mineralizasyonu deneyleri gerçekleştirilmiş olup osteoblast farklılaşmasının takibi için hücre kültürü deneyleri ve gen ekspresyon analizi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alkale fosfataz, enzim taklidi yapılar, karbon hibrit yapılar, fulleren, mineralizasyon, osteoindüksiyon, osteogenik farklılaşma

## ABSTRACT

# DEVELOPMENT OF BIOACTIVE ALKALINE PHOSPHATASE MIMETIC NANO STRUCTURES

Y\*\*\*\*\*İ, D\*\*\*\*a

Master of Science Thesis, Department of Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. G\*\*\*\*\*n G\*\*\*\*\*N

January 2022, 100 Pages

Enzymes are the bio-molecules that speed up the chemical reactions occurring in living organisms millions of times. They are used in many fields due to their high catalytic activity and substrate specificity. Some properties of the enzymes like elaborate production process, rapid degradation, and instability in extreme conditions such as high temperatures and pH may limit their use. Because of these limitations, enzyme mimic structures that can mimic the biological and chemical activities of the enzymes have become important.

Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme belonging to the hydrolase family and it is produced during new bone formation to convert the organic phosphates into inorganic phosphates. ALP is one of the most critical enzymes involved in the osteoinduction mechanism that provides osteoblast differentiation. In our study, fullerene nanoparticles functionalized with histidine and serine amino acids which are found in the active site of many enzymes were used in order to mimic the catalytic activity of the ALP enzyme. Fullerenes (C<sub>60</sub>) are the molecules with potential to be used as enzyme mimics, owing to their spherical surface and convenience to be functionalized. In addition to the catalytic activity of the designed ALP mimetic structures, it is intended to induce osteogenic differentiation and biomineralization in the osteoprogenitor cell human osteosarcoma (SaOS-2) cells and bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC). To demonstrate the success of the ALP activity of the designed materials, enzyme kinetics, mineralization, cell culture experiments for monitoring osteoblast differentiation and gene expression analysis were performed.

Keywords: Alkaline phosphatase, Enzyme mimics, Carbon hybrid structures, Fullerene, Mineralization, Osteoinduction, Osteogenic differentiation

## TEŞEKKÜR

Danışmanlığı boyunca rehberliği, desteği, sabrı ve verdiği tüm maddi/manevi destek için yüksek lisans tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi G\*\*\*\*\*n G\*\*\*\*\*N'e şükranlarımı sunarım. Desteđini hayatım boyunca unutmayacağım.

Laboratuvarda deneysel çalışmalarımda altyapısını kullandığım KGTÜ, KİT-ARGEM'e (Yeni Nesil Gıda Kit ve Referans Madde Araştırma ve Geliştirme Merkezi) ve 218Z021 nolu proje ile destek aldığım TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan arkadaşlarım sevgili B\*\*\*I Ü\*\*\*\*\*Z, Z\*\*\*\*p D\*\*\*\*\*Y, H\*\*\*\*e S\*\*\*\*K ve T\*\*a H\*\*\*n U\*\*\*L'a değerli dostlukları ve laboratuvardaki güzel ortam için teşekkür ederim. Onlarla çalışmak çok güzeldi.

Son olarak her zaman yanımda olan aileme destekleri için çok teşekkür ederim.

D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ

Ocak-2022

## YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Biyoaktif Alkalen Fosfataz Taklidi Nano Yapıların Geliştirilmesi" adlı çalışmanın tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

14.01.2022

D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ

İmza

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
YEMİN METNİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1.Fulleren.....	3
2.1.1.Fullerenin Yapısı.....	3
2.1.2.Fullerenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.2.Enzimler, İzolasyon Yöntemleri ve ALP.....	7
2.2.1.Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	7
2.2.2.Enzimlerin Sınıflandırılması.....	8
2.2.3.Doğal Enzim Üretim Süreçlerinin Handikapları, Enzim Mimetik Yapılar ve Uygulama Alanları.....	14
2.2.4.Model Enzim: Alkalen fosfataz.....	23
2.2.5.Enzim Katalitik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
2.3.Biyomineraller ve Biyomineralizasyon.....	31
2.3.1.Kemik Oluşumunda Etkili Kalsiyum Mineralleri.....	32
2.3.2.Kalsiyum Fosfat Mineralizasyonu.....	34
2.4.Osteogenik Farklılaşma Yolakları.....	36
2.4.1.Runx2.....	36
2.4.2.Kolajen I.....	38
2.4.3.Osteokalsin.....	38
2.4.4.Osteopontin.....	39
2.4.5.Alkalen fosfataz.....	39
3.MATERYAL VE METOT.....	40
3.1.Karbon Hibrit Yapıların Sentezi.....	40
3.1.1.Fulleren Fonksiyonlandırılması.....	40
3.1.2.Fullerenden Fullerenol (C <sub>60</sub> OH) Sentezi.....	40
3.1.3.Fullerenol Aktivasyonu.....	41
3.1.4.Aktif Grup Fonsiyonlandırması.....	42
3.2. Sentezlenen Karbon Hibrit Yapıların Karakterizasyonu.....	44
3.2.1.TGA Analizi.....	44
3.2.2.DLS Analizi.....	44
3.2.3.FTIR Analizi.....	45
3.3. Katalitik Aktivite ve Enzim Kinetiği Analizi.....	45
3.3.1. Kinetik Hesaplamalar.....	45

3.3.2. Tasarlanan Enzim Mimik Yapının Yeniden Kullanılabilirlik Testi .....	46
3.4. Mineralizasyon Çalışması.....	46
3.4.1. Mineral Oluşumu ve Karakterizasyonu .....	46
3.5. Biyoaktivite Analizi.....	47
3.5.1. SaOS-2 Osteoprogenitör ve BM-MSK Hücrelerinin Kültürü.....	47
3.5.2. Biyouyumluluk .....	48
3.5.3. SaOS-2 Osteoprogenitör ve BM-MSK Hücrelerinin <i>in vitro</i> 2D Biyomineralizasyon Çalışması.....	48
3.5.4. SaOS-2 Hücreleri ve BM-MSK Hücrelerinin Yüzeyinde Kalsiyum Fosfat Birikiminin Alizarin Kırmızı Yöntemi ile Mikroskop Görüntüleme ve Kantifikasyon ile Tayini .....	49
3.5.5. BM-MSK Hücrelerinin Yüzeyindeki Osteoblast Hücre Oluşumunun Akridin Turuncusu Boyama Yöntemi İle Floresan Mikroskopta Gözlemlenmesi .....	50
3.5.6. Gen Ekspresyon Analizi ile Kantifikasyonu.....	51
3.6. İstatiksel Analiz .....	52
4. BULGULAR .....	53
4.1. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının Sentezlenme Sonrası Yapısı.....	53
4.2. Fullerenolün Termal Gravimetrik Analiz ile Karakterize Edilmesi .....	53
4.3. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının NMR Analizi.....	54
4.4. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının Elemental Analizi.....	57
4.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Grafikleri.....	57
4.6. Fulleren Konjüгатının Atomik Güç Mikroskobu Görüntüsü .....	58
4.7. Fullerene Konjüгатının Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntülenmesi ve Dinamik Işık Saçılımı Sonuçları.....	59
4.8. Katalitik Aktivite ve Enzim Kinetiği Analizi .....	61
4.8.1. Enzim Kinetiği Deneyleri .....	61
4.8.2. Tasarlanan Enzim Mimik Yapının Yeniden Kullanılabilirlik Deneyleri...	63
4.9. Mineralizasyon Deneyleri.....	64
4.9.1 Mineral Oluşumu ve Karakterizasyonu .....	64
4.10. Hücre Kültürü Deneyleri .....	67
4.10.1. Biyouyumluluk Deneyleri.....	67
4.10.2. Fullerenzim Uygulanan SaOS-2 ve BM-MSK Hücrelerinde Osteogenik Farklılaşmanın Gözlenmesi .....	69
4.10.3. Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları .....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
KAYNAKÇA .....	91
EK 1.....	99
Telif Hakkı İzinleri .....	99
ÖZGEÇMİŞ .....	100

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Fullerenin Kimyasal Yapısının Gösterimi. ....	4
Şekil 2. Oksidoredüktaz Enzim Ailesi Üyesi Laktat Dehidrojenaz Kataliz Tepkimesi .....	10
Şekil 3. Transferaz Enzim Ailesi Üyesi Aminotransferazın Kataliz Tepkimesi.....	11
Şekil 4. Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Arjinazın Kataliz Tepkimesi.....	11
Şekil 5. Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Fosfatazlar Kataliz Tepkimesi, P (monofosfat), R (organik grup).....	12
Şekil 6. Liyaz Enzim Ailesi Üyesi Aldolazın Kataliz Tepkimesi.....	12
Şekil 7. İzomeraz Enzim Ailesi Üyesi Triozfosfat İzomerazın Kataliz Tepkimesi ...	13
Şekil 8. Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Arjinazın Kataliz Tepkimesi.....	14
Şekil 9. Klorofenollerin ve Bisfenollerin degradasyonu için Bir Cys-His Dipeptid ile Cu <sup>+</sup> /Cu <sup>2+</sup> 'nin Koordinasyonu ile Tasarlanan CH-Cu Nanozimin Şematik Gösterimi	17
Şekil 10. C <sub>60</sub> [C(COOH) <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> 'ün Moleküler Yapısı. ....	19
Şekil 11.SOD Mimikleri Olarak Türetilmiş C <sub>60</sub> için Önerilen Katalitik Mekanizma	20
Şekil 12. Ser-His Tarafından DNA Hidrolizi için Önerilen Mekanizma.....	22
Şekil 13. pPA (Lauryl-VVAGH-Am) Peptid Amfifillerinin Kimyasal Yapısı. ....	22
Şekil 14. ALP Enzimi Yapısı ve Aktif Bölgelerinin Gösterimi.....	24
Şekil 15. Kemik Hücresi Başkalaşım Aşamaları. ....	26
Şekil 16. Doku Mineralizasyonunda Kemiğe Özgü Alkalen Fosfatazın (BALP) Rolü .....	27
Şekil 17. Kinetik Parametrelerin Michaelis-Menten Grafiği Üzerinde Gösterimi.....	31
Şekil 18. Fulleren Konjüгатlarının ChemDraw gösterimi .....	40
Şekil 19. Fullerenol Sentez Şeması .....	41
Şekil 20. Fullerenol Aktifleştirme Şeması .....	42
Şekil 21. Fullerene-Histidin Konjüгатı (F-His) Son Basamak .....	43
Şekil 22. Fullerene-Serin Konjüгатı (F-Ser) Son Basamak .....	43
Şekil 23. Fulleren Konjüгатlarının Yapısal Gösterimi.....	53
Şekil 24. Fullerenolün Termal Gravimetri Analizi Grafiği.....	54
Şekil 25. Aktive Edilmiş Fullerenolün <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	54
Şekil 26. F-His <sup>1</sup> H -NMR Spekturumu. ....	55
Şekil 27. F-His <sup>13</sup> C-NMR Spekturumu. ....	55
Şekil 28. F-Ser <sup>1</sup> H -NMR Spektrumu .....	56
Şekil 29. F-Ser <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu. ....	56
Şekil 30. Fonksiyonlandırılmış Fulleren Konjüгатlarının FTIR Analiz Grafiği.....	58
Şekil 31. F-His Konjüгатı ve AFM Görüntüsü .....	58
Şekil 32. F-His'nin TEM Görüntüsü ve Arka Arkaya Alınmış 3 DLS Ölçümü.....	59
Şekil 33.Fullerenolün DLS ölçümleri Sonucunda Elde Edilen Parçacık Boyutu. ....	60
Şekil 34. F-His'in DLS Ölçümleri Sonucunda Elde Edilen Parçacık Boyutu.....	60
Şekil 35. F-Ser'in DLS Ölçümleri Sonucunda Elde Edilen Parçacık Boyutu.....	60
Şekil 36. Enzim Kinetiği Hesaplamaları .....	62
Şekil 37. Yeniden Kullanılabilirlik Deneyi Sonuçları. ....	64
Şekil 38. Hücresiz Ortamda 7.Gün Yüzey Mineralizasyonu Deneyi Sonuçları. ....	65
Şekil 39.Hücresiz Ortamda TRIS çözeltisinde 7. Gün Yüzey Mineralizasyonu Deneyi Sonuçları. ....	65

Şekil 40.Hücesiz Ortamda TRIS çözeltisinde 14. Gün Yüzey Mineralizasyonu Deneyi Sonuçları.....	66
Şekil 41.Fulleren Konjüгатlarının Kaplandığı Yüzeyde Oluşan Minerallerin SEM Analiz Sonucu.....	66
Şekil 42.F-His/F-Ser Konjüгатının Kaplandığı Yüzeyde Oluşan Minerallerin SEM ve EDX Analiz Sonucu.....	67
Şekil 43.SaOS-2 Hücre Biyouyumluluk Testi Sonuçları.....	68
Şekil 44.BM-MSС Hücre Biyouyumluluk Testi Sonuçları.....	68
Şekil 45. $3 \times 10^4$ Sayıda Ekilen SaOS-2 Hücreleri Üzerine Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının $\beta$ -gliserofosfat ile Desteklenmiş ve Desteklenmemiş Standart Kültür Ortamı Gruplarında Ayrı Olacak Şekilde Elde Edilen 3.,7. ve 14. Gün Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	71
Şekil 46. $4 \times 10^4$ Sayıda Ekilen SaOS-2 Hücreleri Üzerine Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının $\beta$ -gliserofosfat ile Desteklenmiş Kültür Ortamı ile Birlikte Uygulanması Sonucu Elde Edilen 3., 7. ve 14. gün Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	72
Şekil 47. $6 \times 10^4$ Sayıda Ekilen SaOS-2 Hücreleri Üzerine Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının Normal Kültür Ortamı ve Osteogenik Kültür Ortamı Gruplarında Ayrı Olacak Şekilde Elde Edilen 3., 7. ve 14. Gün Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	73
Şekil 48. $5,5 \times 10^4$ Sayıda Ekilen SaOS-2 Hücreleri Üzerine Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının Normal kültür Ortamı ve Osteogenik Kültür Ortamı Gruplarında Ayrı Olacak Şekilde Elde Edilen 3. ve 7. Gün Yüzey Mineralizasyon Sonuçları.....	74
Şekil 49. $5,5 \times 10^4$ Sayıda Ekilen SaOS-2 Hücreleri Üzerine Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının Normal kültür Ortamı ve Osteogenik Kültür Ortamı Gruplarında Ayrı Olacak Şekilde Elde Edilen 12. ve 14. Gün Yüzey Mineralizasyon Sonuçları.....	74
Şekil 50. BM-MSС Hücreleri Üzerine Normal Kültür Ortamında Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının 7 Günlük Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	76
Şekil 51. BM-MSС Hücreleri Üzerine Osteogenik Kültür Ortamında Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının 7 Günlük Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	77
Şekil 52. BM-MSС Hücreleri Üzerine Normal Kültür Ortamında Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının 14 Günlük Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	77
Şekil 53. BM-MSС Hücreleri Üzerine Osteogenik Kültür Ortamında Uygulanan Fulleren Konjüгатlarının 14 Günlük Yüzey Mineralizasyon Görselleri.....	78
Şekil 54. Osteoblast İndüksiyonu İçin Kullanılan Fosfataz Enzim Mimik Yapılarının SaOS-2 Hücrelerindeki Gen Ekspresyon Üzerindeki Etkilerinin Analizi.....	80
Şekil 55. Fosfataz Taklidi F-His/F-Ser Enzim Mimiğinin SaOS-2 Hücrelerindeki Osteoblast İndüksiyonunda Kültür Ortamı Etkisi İçin Gen Ekspresyonu Çalışması.....	81
Şekil 56. Osteoblast İndüksiyonu İçin Kullanılan Fosfataz Enzim Mimik Yapılarının BM-MSС Hücrelerindeki Gen Ekspresyon Seviyesi Üzerindeki Etkilerinin Analizi.....	82

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 1. Altı Ana Enzim Ailesi ve Katalizlediği Tepkimeler.....	9
Tablo 2. Biyolojik olarak önemli kalsiyum fosfat tuzları .....	33
Tablo 3. Primer Sekansları.....	51
Tablo 4. Fullerenol Türevlerinin Elemental Analizi .....	57
Tablo 5. Fullerenzim Türevlerinin DLS Boyut Dağılım Sonuçları .....	61



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

Cm	Santimetre
Dk	Dakika
$\mu$ M	Mikromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Nm	Nanometre

### Kısaltmalar

ACP	Amorf Kalsiyum Fosfat
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALP	Alkalen Fosfataz
ATP	Adenozin Üç Fosfat
BALP	Kemiğe Özgü Alkalene Fosfataz
B-Gly	Beta Gliserofosfat
BM-MSC	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücresi
BMP	Kemik Morfogenik Protein
CaCO <sub>3</sub>	Kalsiyum Karbonat
C <sub>60</sub>	Fulleren
C <sub>60</sub> C <sub>3</sub>	C3 Simetriye Sahip Fulleren
C <sub>60</sub> OH	Fullerenol
CCD	Kleido Kraniyal Displazi
CH	Cys-His Dipeptit
COL I	Kollajen-I
DCM	Diklorometan
DMEM	Dublecco Modifiye Besiyeri Ortamı
DMF	Dimetilformamid
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

DLS	Dinamik Işıık Saçılımı
E	Serbest Enzim
EC	Enzim Komisyon Numarası
ECM	Hücre Dışı Matris
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işıını Analizi
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNP	Ferro Manyetik Nanopartiküller
FBS	Fetal Sığıır Serumu
F-His	Fulleren Histidin Konjüğüatı
F-Ser	Fulleren Serin Konjüğüatı
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometre
His	Histidin Aminoasit
HRP	Peroksidaz
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MV	Matriks Vezikülleri
NAD	Nikotin Adenin Dinükleotidi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OCP	Okta Kalsiyum Fosfat
PBS	Fosfat Tampon Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pi	İnorganik Fosfat
pNp	Para-nitrofenolat
pNPP	Para- nitrofenil Fosfat
PPA	Peptid Nanoyapılar
PPi	İnorganik Piro Fosfat
PTB1B	Protein Tirozin Fosfataz 1B
RNA	Ribo Nükleik Asit
Runx2	Runt İlişkili Transkripsiyon Faktörü
S	Substrat
SaOS-2	Primer Osteogenik Sarkoma Hücresi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

Ser	Serin Aminoasit
SH-SY5Y	Nöroblastoma Hücreleri
SiO <sub>2</sub>	Silikon Dioksit
SOD	Süper Oksit Dismutaz
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	Termal Gravimetrik Analiz
TNSALP	Dokuya Özgü Olmayan Alkalen Fosfataz
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole Ve Görünür Işık Absorpsiyon Spektroskopisi
WNT	Kanatsız Protein
VSMC	Vasküler Düz Kas Hücresi

# 1.GİRİŞ

Çok fonksiyonlu biyokatalist olan enzimler, yüksek substrat spesifisiteleri ve biyolojik reaksiyonlar için katalitik verimleri nedeniyle tıp, tarım, kimya endüstrisi ve gıda gibi birçok alanda önemli uygulamalara sahiptir. Ancak, farklı sıcaklık ve pH koşullarında enzimlerin düşük kararlılığı, kullanım başarısını sınırlandırmaktadır. Doğal enzimlerin bahsi geçen sınırlandırmaları, enzimlerin pratik uygulamaları için büyük ölçüde engel teşkil edebilmektedir (Gao ve Yan, 2016). Bu nedenle, çok fonksiyonlu ve verimli yapay enzimlerin geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda, enzimlerin yapılarını ve katalitik aktivitelerini mimik etmek amacı ile sıklıkla siklodekstrinler, porfirinler, polimerler ve supramoleküller enzim mimetik yapılar olarak kullanılmıştır.

Peroksidaz benzeri katalitik aktiviteye sahip ferromanyetik nanopartiküller, ( $Fe_3O_4$  MNP) nanozim olarak tanımlanacak olan bu tasarımların ilk örneği olmuştur (Gao, Zhuang, Nie, Zhang, Zhang, Gu vd., 2007). Bir diğer çalışmada, bu inorganik nanoparçacıkların tipik peroksidaz substratlarını hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile oksidasyonunu katalizlemek için bir enzim gibi çalışabileceği gösterilmiştir. Örneğin,  $Fe_3O_4$  MNP' lerinin immünoanaliz (Gao vd., 2007) ve kolorimetrik analizde (Wei ve Wang, 2008) peroksidaz (HRP) mimiği olarak kullanımları bulunmaktadır. Nanomateryal bazlı yapay enzimleri temsil eden “nanozim” terimi, Wei ve Wang tarafından tanımlanmıştır (Wei ve Wang, 2013). Organik nanoparçacıklar (basit hazırlık, yüksek stabilite, kolay yüzey modifikasyonu ve düşük maliyet) gibi avantajlara sahip olduklarından, nanozim kavramı, analitik kimya ve nanotıp gibi birçok alanda kullanım potansiyeline sahiptir (Wang, Wei, Zhang, Wang , ve Dong, 2018).

Alkalin fosfatazlar, hücre zarının dış tabakası üzerinde bulunan bir grup izoenzimdir ve hücre dışı alanda bulunan organik fosfat esterlerin hidrolizini katalize ederler. Histidin grubu bu enzimin önemli bir kofaktörüdür ve enzimatik aktivitede önemli rol oynamaktadır (Lowe, Sanvictores , ve John, 2017). ALP enzimi katalitik aktivitesinin yanında biyo-mineralizasyon ve osteoblast farklılaşmasını indüklemeye gibi kritik metabolik faaliyetlerde rol oynar. Bu önemli özelliklerinden ötürü biyorejeneratif uygulamalarda kullanılmak üzere çalışmamızda model enzim olarak ALP enzimini kullanmayı tercih ettik.

Tasarlanan ALP enzim mimik yapı ile;

- Multifonksiyonel özelliklere sahip, yüzeyine aminoasit konumlandırılması yapılabilen, proteinler gibi kendiliğinden toplanarak aktif formlara dönüşebilen,
- Alkalin Fosfataz enziminin katalitik aktivitesini mimik edebilen,
- Gösterdikleri aktivite sayesinde yüzey mineralizasyonu indüklemeye yeteneğine sahip olabilen ve
- Osteoblast farklılaşmasını biyomineralizasyon ve gen ifadesi bazında indükleyebilen enzim mimik yapılar geliştirmek, bu yapıların osteoindüktif ve osteokondaktif etkilerini göstermek hedeflenmiştir.

Bu hedeflerin gerçekleştirilmesi halinde ALP enziminin hem kimyasal fonksiyonunu hem de biyolojik fonksiyonu mimik etmek üzere fonksiyonlandırılmış fulleren molekülleri ile biyomimetik katalist geliştirmek, geliştirilen enzim mimetik yapılarla osteoprogenitör SaOS-2 ve BM-MSK hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını sağlamak ve tasarlanan enzim mimetik yapının katalitik olarak aktivite gösterdiğini kanıtlamak amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda daha önce fulleren taklidi geliştirilmemiş enzimin kimyasal/biyolojik yapısının mimik edilmesiyle yeni bir katalist geliştirilmiş olacak, yeni yapılacak katalist çalışmalarına ve biyorejeneratif çalışmalarda kullanılacak moleküllerin tasarlanmasında öncülük edebilecektir.

## 2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1.Fulleren

Karbon, doğada çok miktarda (Dong, Miao, Hai, Yuan , ve Liang, 2015) bulunan ve nanomalzeme araştırmalarında sıklıkla kullanılan elementlerden biridir. Karbon tabanlı nanomalzeme alanındaki çalışmalar, 1985 yılında Robert F. Curl, Harold W. Kroto ve Richard E. Smalley tarafından grafit ve elmastan sonra üçüncü karbon allotropu olan fulleren ailesinin ilk örneklerinden olan yüksek kararlılığa sahip C<sub>60</sub>'ın senteziyle hız kazanmıştır (Kroto, Heath, O'Brien, Curl , ve Smalley, 1985). 1960'larda Buckminster Fuller tarafından tasarlanan jeodezik kubbeler, fulleren C<sub>60</sub>'ın yapısının oluşturulmasında ilham verdiği için, buckminster fullerene olarak adlandırıldı. Bu keşfin ardından 1990'da Max Planck Nükleer Fizik Enstitüsü'nden Wolfgang Kratschmer ve Arizona Üniversitesi'nden Donald Huffman grupları tarafından çok miktarda fulleren üretimi mümkün kılınmıştır (Krätschmer, Lamb, Fostiropoulos , ve Huffman, 1990). Son olarak, bir karbon allotropu olan fullerenin keşfi 1996 Nobel Kimya Ödülünün alınmasına sebep olmuştur (Goodarzi, Da Ros, Conde, Sefat , ve Mozafari, 2017).

#### 2.1.1. Fullerenin Yapısı

Fullerenler kapalı, içi boş bir kafesin yüzeyi üzerinde konumlandırılmış çift sayıda karbon atomuna sahip çok yüzlü karbon yapılarıdır. İçeriğindeki her atom, üç komşu üçgene trigonal olarak bağlıdır ve dört değerlik elektronunun üçü sp<sup>2</sup>-bağlanmasında yer alır. Kalan p elektronları, molekülün dış ve iç yüzeylerini kaplayan π-moleküler orbitallerinde delokalize edilmişlerdir (Margadonna ve Prassides, 2001).

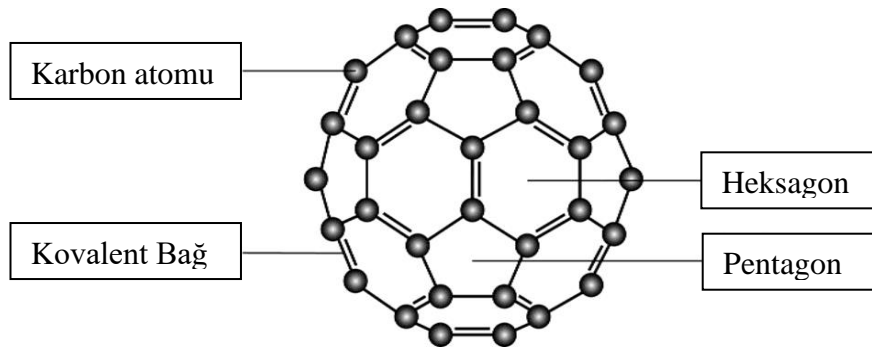
Fullerenin sp<sup>2</sup> hibritleşmesi gösteren karbonlardan oluşan eşsiz yapısı farklı boyutlarda yüksek simetrik özellikte bir kafes yapısının oluşmasını sağlar. En yaygın kullanılan fulleren yapıları C<sub>60</sub> ve C<sub>70</sub> dir. C<sub>60</sub>, 12 beşgen oluşturan C5 – C5 tekli

bağlara sahip 20 karbon atomundan ve 20 altıgen oluşturan C5– C6 çift bağlara sahip 40 karbon atomundan oluşur (Kroto, Heath, O'Brien, Curl , ve Smalley, 1985).

Çokgenin her köşesinde bir karbon atomu vardır ve çokgenin tüm kenarı boyunca bir bağ vardır. Bu bağ iki bağ uzunluğuna sahiptir ve ortalama bağ uzunluğu 1,4 Å kadardır. C<sub>60</sub> süper aromatik yapıda değildir. Elektron eksikliği özelliğine sahip olan bir alkendir. Elektron bakımından zengin türlerle reaksiyona girer. Beşgen ve altıgen halkaların sayısına bağlı olarak sonsuz sayıda fulleren oluşturulabilir (Yadav, 2018).

Fulleren molekülünün kristalografik özelliklerinden, yapısında bulundurduğu 30 adet iki kat eksen, 20 adet üç kat eksen ve 12 adet beş kat eksen dahil simetrik elemanlar yapıyı, Altın Ortalama kuralı tarafından kontrol edilen en simetrik molekül haline getirmiştir (Yadav ve Kumar, 2008). Katı fazda yüzey merkezli kübik kafesleri olan C<sub>60</sub>, yapısındaki kafesin tahribatının 1000°C' den yüksek sıcaklıklarda gerçekleşecek ölçüde kararlı bir yapıda olmasını sağlamaktadır.

Fullereni karakterize etmek için Raman spektroskopisi, Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) gibi spektroskopik yöntemler kullanılabilir (Taylor, Hare, Abdul-Sada , ve Kroto, 1990).



**Şekil 1.** Fullerenin Kimyasal Yapısının Gösterimi ('Experimental Dermatology' Dergisi izni ile (Rondags, Yuen, Jonkman , ve Horváth, 2017) şekil kullanılmıştır.).

### 2.1.2. Fullerenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

C<sub>60</sub> molekülünün çapı  $0.710 \pm 0.007$  nm'dir.  $\pi$  elektron bulutunun dış ve iç çapları sırasıyla 0.340 nm ve 0.350 nm olarak tahmin edilebilir ve atom başına bağ enerjisi 7.40 eV'dir (Injac, Prijatelj , ve Strukelj, 2013).

Fullerenlerin benzersiz enerji seviyeleri, yüksek elektron afinite enerjisi değeri ile bağlantılıdır (Kamanina, 2018). Bu elektrokimyasallar özellikleri sebebiyle güneş pili gibi alanlarda da kullanımı bulunmaktadır (Zhang, Inganäs, Zhou , ve Vandewal, 2016).

C<sub>60</sub>, altı elektrona kadar geri dönüşümlü olarak indirgenebilir. Bu da bir elektron alıcısı olarak işlev görerek çok sayıda verici-alıcı sisteminin sentezine yol açmasını sağlamaktadır. C<sub>60</sub>'ın kolaylıkla indirgenebilmesi, bir elektron alıcısı olarak kapsamlı çalışmasına yol açarken, aynı zamanda zorda olsa oksitlenebileceği anlamına gelmektedir (Bracher ve Schuster, 2002). C<sub>60</sub> farklı özellikleri arasında, görünür ışığa maruz kaldığında oksijen türleri üretim yeteneğine sahiptir ve bu özelliği onu fotodinamik terapiler için uygun bir aday yapmaktadır (Chen, Ma, Liu , ve Chen, 2012).

Saf fullerenler, siyah kristallerdir ve hidrofobik moleküller olmalarından dolayı suda son derece zayıf çözünürlüğe sahiplerdir (Injac, Prijatelj , ve Strukelj, 2013). Çözündüğünde ise agregatlar oluşturabilir ve hem bireysel fulleren hem de fulleren kümeleri içeren stabil kolloid çözeltileri oluşturabilir (Prylutsky, Petrenko, Ivankov, Kyzyma, Bulavin, Litsis vd., 2014). Fullerenin çözeltilerdeki ilginç davranışı, sert moleküler yapısına konformasyonel ve çözücüye bağlı değişikliklerin etki edemediği benzersiz bir çözücü-çözünen etkileşimi sağlar (Ruoff, Tse, Malhotra , ve Lorents, 1993). Fullerenin çözünürlüğü, hidrofobik bir yapıya sahip olmasından dolayı toluen, kloroform ve benzen gibi organik çözücülerde yüksek (Kadish ve Ruoff, 2000), polar çözücülerde ise düşüktür. Bu da biyolojik uygulamalardaki kullanımını sınırlandırabilmektedir (Goodarzi, Da Ros, Conde, Sefat , ve Mozafari, 2017).

Nükleofilik ve elektrofilik ilavelerin, siklo katılmaların ve radikal ilavelerin kombinasyonları kullanarak, herhangi bir organik bileşik sınıfını bir fulleren iskeletine kovalent olarak bağlamak mümkündür. C<sub>60</sub>'ın bu yapısal ve elektronik özellikleri, çok çeşitli biyolojik olarak aktif suda çözünür fullerenlerin oluşmasını sağlayan farklı kimyasal dönüşümlerin gerçekleştirilmesi için imkân sağlar (Injac, Prijatelj , ve Strukelj, 2013).

Fullerenin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için iki fazlı koloidal çözeltiler hazırlamak, fulleren türevlerini ve fulleren polimerlerini sentezlemek gibi (Arbogast, Darmanyan, Foote, Diederich, Whetten, Rubin vd., 1991; Jafvert ve Kulkarni, 2008)

yöntemler geliştirilmiştir. Fullerenin hidrofobikliği biyolojik sistemlerde bir miktar uyumluluk sağlamasına rağmen, malzemelerin hidrofilikliği daha büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle fullerenlerin sudaki çözünürlüklerini arttırmak için bazı çalışmalar yapılmıştır (Astefanei, Núñez, Galceran, Kok , ve Schoenmakers, 2015; Deguchi, Alargova , ve Tsujii, 2001). Bunlardan biri, fullerenlerin toluen veya benzen gibi organik bir çözülden, organik çözücünün çıkarılmasının ardından ultrason uygulaması ile sulu bir faza aktarılması ile ilgilidir (Avdeev, Khokhryakov, Tropin, Andrievsky, Klochkov, Derevyanchenko vd., 2004). Bu yöntemde sulu çözüldelerdeki fullerenin dağılım mekanizması iki şekilde açıklanabilir:

(i) C<sub>60</sub> ve su molekülleri arasında H bağı ve yük transferi yoluyla su tabakasının oluşumu, sudaki fullereni stabilize eder (Andrievsky, Klochkov, Bordyuh , ve Dovbeshko, 2002; Prylutsky vd., 2014) ve

(ii) Ultrason uygulaması ile fulleren kafeslerinde hidroksiller ve karbonlar arasında kovalent bir bağı oluşturulur. Bu da fullerenol kısımlarının oluşumu ile fulleren molekülünün çözünürlüğünü artmasına sebep olur (Labille, Masion, Ziarelli, Rose, Brant, Villiéras vd., 2009; Prylutsky vd., 2014).

Fulleren'in suda çözünürlüğünü arttırmak için sürfaktanlar (Deguchi, Alargova , ve Tsujii, 2001) ve  $\gamma$ -siklodekstrin (Makha, Purich, Raston , ve Sobolev, 2006) gibi suda çözünür supramoleküler yapılara katılması vb. uygulamalar da yapılabilmektedir.

Bahsedilen yöntemlere ek olarak fullerenin aminoasitler, karboksilik asitler, polihidroksil grupları veya amfilik polimerler gibi hidrofilik maddeler ile kimyasal modifikasyonu, biyolojik sistemlerde fullerenlerin hidrofilikliğini arttırmak için kullanılmaktadır (Biju, 2014; Sun, Lawson, Huang, Wright , ve Moton, 1999).

Fullerenler çeşitli uygulamalarla biyolojik ortamda çözünür hale getirildikten sonra, antiviral aktivite, antioksidan aktivite, tıbbi materyalleri kapsülleme ve yapı iskelelerinde bir ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasını içeren biyomedikal uygulamalar gibi alanlarda kullanılabilir hale gelmektedir (Anilkumar, Lu, Cao, G Luo, Liu, Sahu vd., 2011; Bosi, Da Ros, Spalluto , ve Prato, 2003).

## 2.2.Enzimler, İzolasyon Yöntemleri ve ALP

### 2.2.1.Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Canlı hücrelerde meydana gelen hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenir ve kontrol edilir. Kataliz, en düşük aktivasyon enerjisi ile kimyasal reaksiyonunu hızlandıran, bu reaksiyonun başlamasını sağlayan işlemidir. Katalizler, birçok endüstrinin başarılı gelişimini, doğal kaynakların verimli kullanımını ve ayrıca sonraki işlemlerin karmaşıklıklarının azaltılmasını sağlar. Son yıllarda kataliz, farklı endüstrilerdeki çeşitli ürünlerin seri üretiminin temeli haline gelmiştir. Enzimler, çok sayıda biyomoleküler yapının sentezini katalizleyen ve enerji açısından verimli, çevreye zararsız kimyasal ajanların iyi bilinen modelleri olan doğal katalizörlerdir. Biyokatalizörler bir reaksiyonun hızını artırır, ancak termodinamik özelliklerini etkilemez. Bir biyokatalizörün en önemli avantajı, yüksek stereo seçiciliği, bölgesel seçiciliği ve kimyasal seçiciliğidir. Bu tür yüksek seçicilik, koruyucu grupların azaltılmasını veya hiç kullanılmamasını, en aza indirgenmiş yan reaksiyonları, daha kolay ayırma ve daha az çevresel problemler gibi çeşitli faydalar sağladığı için endüstriyel sentez için önemlidir. Yüksek katalitik verimlilik ve hafif çalışma koşulları gibi diğer avantajlar da ticari uygulamalar için önemlidir (Jaeger, 2004; Liszka, Clark, Schneider , ve Clark, 2012).

Enzimin doğal formu genellikle büyük ölçekli kullanım gereksinimlerini karşılamaz; bu nedenle fiziko kimyasal özelliklerin düzenlenmesi endüstriyel ölçekte ürün geliştirmenin önemli bir parçası olmaktadır (Fendri, Louati, Sellami, Gargouri, Smichi, Zarai vd., 2012; Nakano, Yagi, Miyahara, Kaminura, Kawatsura , ve Itoh, 2011). Enzimlerin biyoyumlu, saf moleküller olması onları tıp, kimya endüstrisi, gıda işleme, tarım ve enerji alanında kullanılacak temel moleküllerden biri yapar (Kirk, Borchert , ve Fuglsang, 2002; Tao ve Xu, 2009). Ancak yüksek basınç, sıcaklık, pH, organik çözücülerin varlığı ve oksidatif faktörler içeren endüstrinin ekstrem çalışma koşulları, enzimlerin hızlı bir şekilde inaktive olmasına sebep olabilir (Hildén, Hakala , ve Lundell, 2009; Luetz, Giver , ve Lalonde, 2008). Bu nedenle biyokatalizörün başarılı bir şekilde uygulanması, zorlu çalışma koşulları altında sürecin performansını ve maliyet etkinliğini artırabilecek ve yüksek aktivite,

özgüllük, stabiliteye sahip uygun bir katalitik sistem gerektirir. Bu tür kararlı bir katalizörün araştırılması, protein mühendisliği, rekombinant DNA teknolojileri ve en son nanoteknoloji dahil olmak üzere farklı yaklaşımlarla yüksek aktivite ve spesifikliğe sahip çeşitli enzimlerin araştırılmasını ve optimizasyonunu gerektirmiştir.

### **2.2.2.Enzimlerin Sınıflandırılması**

Enzimler genellikle etki ettikleri substratların isimlerinin sonuna -az eki getirilerek adlandırılır. Örneğin, amilaz, üreaz ve tirozinaz, sırasıyla nişasta, üre ve tirozin içeren reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Enzimler ayrıca kataliz ettikleri reaksiyonların çeşitlerine göre de adlandırılır. Örneğin dehidrojenazlar ve dekarboksilazlar, sırasıyla farklı substratlardan hidrojen ve karboksil çıkarılmasını katalize eder (Blanco ve Blanco, 2017).

Önceki literatür çalışmalarında kullanılan enzimlerin adlandırılmasında yararlı olmayan çok sayıda isim kullanılmasından dolayı rasyonel bir isimlendirme ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Örneğin, eski sarı enzim ile yeni sarı enzim arasındaki farkı ve diyaforazın veya bu nedenle DT-diyaforazın katalize ettiğini yalnızca doğrudan konu ile çalışanların bilmesi mümkündür. Benzer şekilde, rodenese (tiyosülfat sülfür transferaz: EC 2.8.1.1) tarafından katalize edilen reaksiyon, enzimin isimlendirmesiyle nasıl bir reaksiyon katalizlediğinin anlaşılması güçtür. Ve bir peptidazı (EC 3.4.21.73) tanımlamak için ürokinaz adının kullanılması, kinaz terimi genellikle ATP' den başka bir substrata fosfat aktaran enzimler için kullanıldığından kafa karıştırıcı olmaktadır (Boyce ve Tipton, 2001).

Malcolm Dixon ve Edwin Webb, 1958'de yukarıda bahsedilenler gibi enzimlerin isimlendirmesinin karışık durumuna bir düzen getirmeye çalışırken, enzimleri yapılarına göre değil, katalize ettikleri reaksiyonlara göre sınıflandırarak, terminolojinin diğer dallarında kullanılan farklı bir adım attılar. Bu sistem, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ile Ortak Adlandırma Komitesi aracılığıyla enzimlerin Enzim Adlandırma listesine dahil edilmiş ve geliştirilmiştir (Boyce ve Tipton, 2001).

İsimlerin farklı kriterlere göre kullanımının ortaya çıkardığı karışıklık, kurulan bu sınıflandırma sistemiyle, her bir enzime açıklayıcı bir ad ve kesin tanımlanmasına izin veren bir numara atamasıyla çözüme ulaştı. Bu sınıflandırmada, katalize edilen reaksiyon tipine göre altı ana enzim sınıfı dikkate alınır. Her sınıf, alt sınıflara ve alt sınıfların alt sınıflarına ayrılır. Enzimi tanımlamak için kullanılan sayısal kod şu dört bileşenden oluşur: ilk sayı ana enzim sınıfına karşılık gelir, ikincisi alt sınıfa karşılık gelir, üçüncüsü alt sınıfın alt sınıfını gösterir (bu numaralar reaksiyona dahil olan atom gruplarının doğası dikkate alınarak verilir) ve dördüncü alt sınıftaki enzim sıra numarasını temsil eder (Blanco ve Blanco, 2017). Tablo 1’de altı ana enzim ailesinin katalizledikleri tepkimeler genel olarak verilmiştir.

**Tablo 1.** Altı Ana Enzim Ailesi ve Katalizlediği Tepkimeler (Blanco ve Blanco, 2017).

Enzim Komite Numarası	Katalizlediği Tepkime	
EC1 Oksidoredüktazlar	$X_{red} + Y_{ox} \leftrightarrow X_{ox} + Y_{red}$	Redoks Tepkimeleri
EC2 Transferazlar	$X-Y + Z \rightarrow X + Y-Z$	Fonksiyonel Grupların Taşınımı
EC3 Hidrolazlar	$X-Y + H_2O \rightarrow X-H + Y-OH$	Hidroliz Tepkimeleri
EC4 Liyazlar	$X-Y \leftrightarrow X+Y$	Grupların Ayrılması (Çift bağ oluşumu)
EC5 İzomerazlar	$X-Y-Z \leftrightarrow X-Z-Y$	İzomerleşme Tepkimeleri
EC6 Ligazlar	$X+Y +ATP \rightarrow X-Y +ADP +P_i$	Bir Üçlü Fosfat Grubunun Ayrılmasıyla

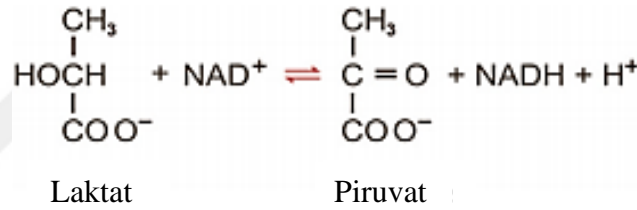
### 2.2.2.1. EC1 Oksidoredüktazlar

Bu sınıf, oksidasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimleri içerir. Bir grubun oksidasyonuna diğerinin indirgenmesi eşlik etmesi gerektiğinden, oksidoredüktazlar olarak gruplandırılırlar (Boyce ve Tipton, 2001). Koenzimlerle ilişkilidirler, dehidrojenazlar, oksidazlar, peroksidazlar ve oksijenazları içerirler.

Dehidrojenazlar, substrat olarak hidrojen donörlerini ve alıcı olarak bir koenzimi kullanır. Değiştirdikleri substratın adı ve ardından dehidrojenaz kelimesi ile belirtilirler. Daha az sıklıkla, ters reaksiyon düşünüldüğünde, bunlara redüktaz denir.

Oksidazlar, hidrojen alıcısının moleküler oksijen (O<sub>2</sub>) olduğu reaksiyonları katalize eden enzimlerdir, oksijen atomları oksitlenmiş üründe görünmez. Peroksidazlar, bir substratı oksitlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanan enzimlerdir, peroksiti H<sub>2</sub>O'ya dönüştürürler. Oksijenazlar, substrata oksijen katarlar. Dioksijenazlar ve monooksijenazlar olarak ayırt edilebilirler. Dioksijenazlar, her iki O<sub>2</sub> atomunun da substrata yerleştirildiği reaksiyonları katalize eder. Monooksijenazlar, substratta O<sub>2</sub>'den sadece bir atom içerir, diğeri ise H<sub>2</sub>O oluşturmak için indirgenir. Bu gruptaki diğer enzimler, iki substratı aynı anda oksitleyen karışık işlevli oksidazlardır (Blanco ve Blanco, 2017).

Oksidoredüktazın bir örneği, laktat dehidrojenazdır. Sistematik adı l-laktattır: NAD oksidoredüktaz; önerilen diğer adı laktat dehidrojenazdır ve enzim komisyon numarası 1.1.1.27'dir. Bu enzim, laktatın piruvata oksidasyonunun yanı sıra reaksiyonun ters halini de (piruvatın laktata indirgenmesi) katalize eder. Enzim, nikotin amid adenin dinükleotidi (NAD) koenzim olarak kullanır (Blanco ve Blanco, 2017). Kataliz tepkimesi şudur:

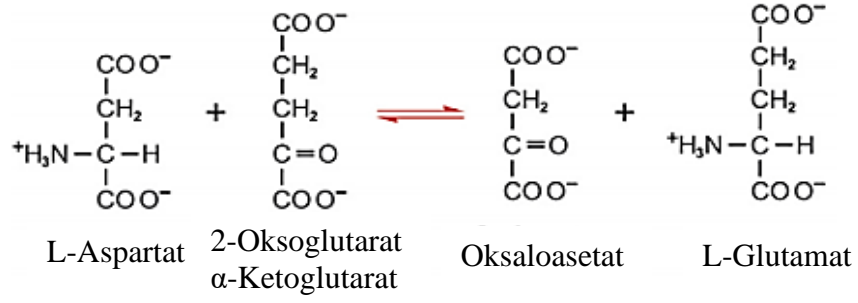


**Şekil 2.** Oksidoredüktaz Enzim Ailesi Üyesi Laktat Dehidrojenazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

### 2.2.2.2. EC2 Transferazlar

Transferazlar, bir verici substrattan bir alıcı bileşiğe amin, karboksil, karbonil, metil, asil, glikosil ve fosforil gibi bir grup atomun transferini katalize eden enzimlerdir.

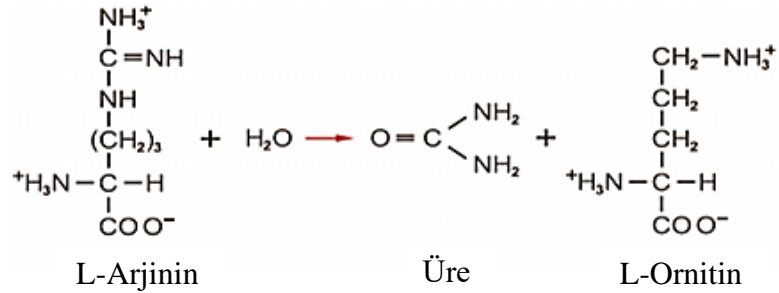
Örneğin; enzim ailesinin bir üyesi l-aspartatı içerir: 2-oksoglutarat amino transferaz, veya aspartat amino transferaz EC2 enzim ailesinin bir üyesidir. (enzim komisyon numarası, 2.6.1.1.). Bu enzim aşağıda gösterilen kataliz tepkimesiyle bir amin grubunun bir bileşikten diğerine transferini katalizleyen tepkimeyi gerçekleştirir (Blanco ve Blanco, 2017).



**Şekil 3.** Transferaz Enzim Ailesi Üyesi Aminotransferazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

### 2.2.2.3. EC3 Hidrolazlar

Hidrolazlar, fosforik anhidrit bağları dahil olmak üzere C—O, C—N, C—C, C—S ve O—P ve diğer bazı bağlar gibi ester bağlarının hidrolitik olarak kırılmasını katalize eden enzimlerdir. Örneğin, asetil kolin estera ve ribonükleaz bu gruba aittir; sırasıyla asetilkolinde asetat ve kolin arasındaki ester bağı ve RNA'daki nükleotidler arasındaki bağları hidrolize ederler. Başka bir örnek, üre oluşturmak için arginin hidrolizini katalize eden arginaz veya l-arginin amidino hidrolazdır (enzim komisyon numarası, 3.5.3.1) (Blanco ve Blanco, 2017).



**Şekil 4.** Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Arjinazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

EC 3.1 enzim ailesi ester bağları üzerinde etki gösteren bir gruptur. Substratın doğası, üç örnekte gösterildiği gibi büyük ölçüde farklılık gösterebilir. Bunlar karboksilik ester hidrolaz, tiolesterhidrolaz ve fosfohidrolaz (fosfataz)lardır. Yani bizim çalışmamızda nanozim olarak tasarladığımız model enzimimiz Alkalen Fosfataz, hidrolazların alt enzim ailesi olan esterazların alt grubunda yer alan bir

enzimdir. Aşağıdaki şekilde hidrolazların çalışma mekanizması gösterilmektedir (Blanco ve Blanco, 2017).



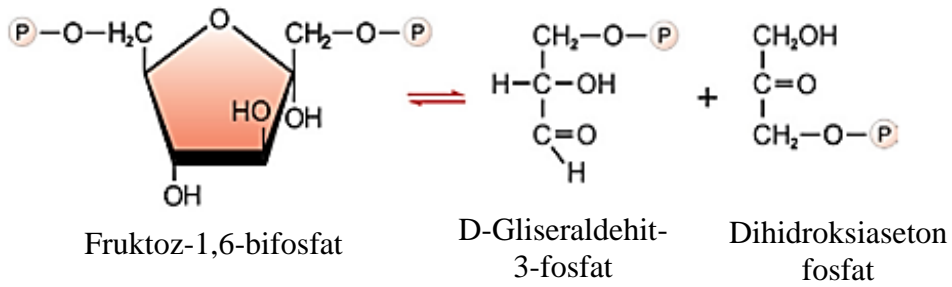
**Şekil 5.** Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Fosfatazların Kataliz Tepkimesi, P (monofosfat), R (organik grup) (Blanco ve Blanco, 2017).

#### 2.2.2.4. EC4 Liyazlar

Liyazlar, hidrolizden farklı bir işlemle bir substrattaki C—C, C—S ve C—N bağlarının (peptit bağları hariç) bölünmesini katalize eder. Bazıları alt tabakadan grupları çıkarır ve çift bağlar oluşturur, diğerleri ise çift bağlara gruplar ekler.

Katalizledikleri reaksiyonlar sonucunda CO<sub>2</sub>, su veya aldehiti üreten türleri de karboksilazları, dehidratazları, aldolazları olarak adlandırılırlar.

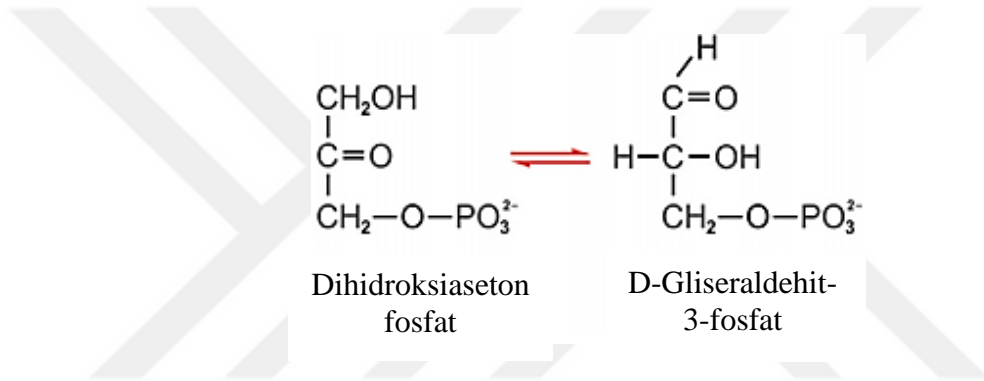
Ters reaksiyon (bir grubun eklenmesi) gerçekleştirildiğinde, bu enzimlerin sentez işlevini vurgulamak için sentaz olarak adlandırılır. Sentazlar, reaksiyonlarında ATP gibi bir enerji kaynağı gerektirmez. Bir liyaz örneği, fruktoz-1,6-'yi parçalayan aldolazdır (enzim komisyon numarası, 4.1.2.13). Aldolazın sistematik adı fruktoz1,6-bifosfattır (Blanco ve Blanco, 2017).



**Şekil 6.** Liyaz Enzim Ailesi Üyesi Aldolazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

### 2.2.2.5. EC5 İzomerazlar

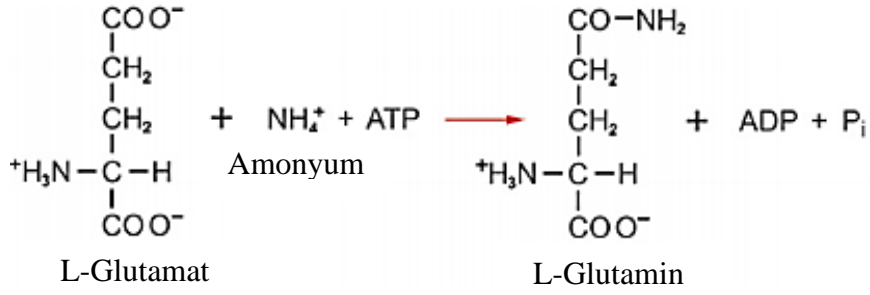
İzomerazlar, bir molekülün optik, geometrik veya konumsal yapıdaki izomerlerine dönüştürülmesini katalizler. İlgili izomerizmin tipine göre rasemazlar, epimerazlar, cis–trans-izomerazlar, izomerazlar, totomerazlar, mutazlar veya sikloizomerazlar olarak adlandırılabilirler. Bu enzim grubu içinde, glikoz-6-fosfat'ın fruktoz-6-fosfata dönüşümünü katalize eden fosfoglucoizomeraz bulunur. Başka bir izomeraz, aşağıdaki reaksiyonu katalize eden triozfosfatizomeraz veya D-gliseraldehit-3-fosfat ketolizomerazdır (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 7. İzomeraz Enzim Ailesi Üyesi Triozfosfat İzomerazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

### 2.2.2.6. EC6 Ligazlar

Ligazlar, ATP veya benzer bir nükleosit trifosfattaki bir difosfat bağının eşzamanlı hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını (ligasyonunu) katalize eder. Ortaya çıkan reaksiyonlar C–C, C–S, C–O veya C–N bağlarını oluşturur. Bu enzim gruplarının örneklerinden biri, reaksiyonu katalize eden glutamin sentetazdır. Glutamin oluşturmak için glutamik asit ve amonyak kullanır. Sentez için gerekli enerji ATP'nin hidrolizi ile sağlanır.



**Şekil 8.** Hidrolaz Enzim Ailesi Üyesi Arjinazın Kataliz Tepkimesi (Blanco ve Blanco, 2017).

### 2.2.3. Doğal Enzim Üretim Süreçlerinin Handikapları, Enzim Mimetik Yapılar ve Uygulama Alanları

Enzimler, canlı organizmaların metabolizmasını ayarlayabilen, genetik bilgi aktarabilen, yaşam aktivitelerini sürdüren ve kimyasal reaksiyonları katalize edebilen, biyokatalitik fonksiyonlu bir tür biyo-makro moleküllerdir. Enzimlerin biyouyumlu, biyolojik reaksiyonlar için mükemmel katalitik aktiviteye sahip olmaları, yüksek substrat özgüllükleri nedeniyle saf moleküller olması onları biyosensör, tıp, çevre koruma, kimya endüstrisi, gıda işleme, tarım, enerji ve diğer alanlarda kullanılabilir temel moleküllerden biri yapar (Kirk, Borchert , ve Fuglsang, 2002; Tao ve Xu, 2009).

Genellikle doğal enzimlerinde üretiminde zayıf stabilite, zaman alıcı ve maliyetli hazırlık, aşırı pH ve sıcaklık altında aktivite kaybı gibi olumsuz durumlar oluşmaktadır. Enzimlerin biyosentezi ve sentez yöntemlerinin uygulaması esnasında enzimlerin saflaştırma ve işleme işlemlerindeki çaba ve iş yükünün fazlalığı, üretimdeki maliyetin yüksek oluşu, düşük stabilite yani; yüksek basınç, sıcaklık, pH, organik çözücülerin varlığı ve oksidatif faktörler içeren endüstrinin ekstrem çalışma koşullarında enzimlerin hızlı bir şekilde inaktive olması, saflaştırılmış enzimlerin üretimleri sonucunda elde edilen biyoaktivitelerindeki partiden partiye oluşan büyük farklılıkların oluşması gibi parametreler doğal enzimlerin yaygın olarak kullanımını engellemektedir. Büyük ölçekli çalışmalarda biyokatalizörlerin uyumluluğunu artırmak için bu doğal malzemelerin zorlu koşullarda aktivitesini kaybetmeden stabil kalmasını sağlamak gerekir. Bu yüzden bu tür kararlı bir katalizörün tasarlanması, protein mühendisliği, rekombinant DNA teknolojileri, nanoteknoloji gibi alanların ortak hedefi haline gelmiştir (Kirk, Borchert , ve Fuglsang, 2002; Tao ve Xu, 2009).

Bu tür yapıların tasarımı için pratik uygulamaların doğal kimyasalları tam kimyasal sentez veya yarı sentetik yöntemlerle değiştirmek için kararlı ve düşük maliyetli, model enzimlerin aktif bölgeleri ve biyolojik rolleri dikkate alınarak tasarlanan yapay enzim benzeri yapıların geliştirilmesi, kolay üretilebilir, yüksek stabiliteli ve yüksek aktiviteli katalitik malzemelerin geliştirilmesi için çok önemlidir (Wei ve Wang, 2013).

Nanoteknolojide kullanılan çeşitli nanotaşıyıcıların geliştirilmesi, klasik yöntemlerin dışında çözümler üretilmesine olanak sağlar. Nanobiyokataliz alanındaki daha önceki gelişmeler genellikle basit adsorpsiyon ve kovalent bağlanma gibi geleneksel yaklaşımları kullanarak farklı nanoyapılı materyaller üzerinde enzimlerin immobilizasyonu temeli üzerine yapılmıştır. Nano yüzey ölçümleri ve nano yüzeylerdeki non-kovalent/kovalent modifikasyonlar, enzim substrat reaksiyonlarının meydana gelmesi için geniş bir yüzey alanı sağlar bu da serbest enzime kıyasla birim kütle başına artan enzim aktivitesi ile enzim yüklemesinin artışı sağlanmıştır (Dev, Srivastava , ve Karmakar, 2018).

İlk olarak Ronald Breslow tarafından tanımlanan yapay enzim mimikler, doğal enzimlerin yapısını ve işlevini mimik etmek üzere tasarlanmış yapay malzemelerdir (Breslow ve Overman, 1970). Son yıllarda, enzim mimikler alanında büyük ilerleme kaydedilmiştir (Wu, Wang, Wang, Lou, Li, Zhu vd., 2019; Xiong, Huang, Lin, Liu , ve Lin, 2019). Siklodekstrinler, porfirinler ve biyolojik moleküller gibi bir dizi enzim mimik olarak ve çeşitli alanlarda doğal enzimlerin yerine kullanılmıştır (Wang, Hu , ve Wei, 2016; Wei ve Wang, 2013). Doğal enzimlerle karşılaştırıldığında, geleneksel enzim mimikler basit yapı, düşük moleküler ağırlık ve yüksek stabilite (özellikle yüksek sıcaklıkta) gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, düşük katalitik aktiviteleri ve zayıf seçiciliği negatif özellikleri arasındadır.

Scrimin, Pasquato vd., azacrown ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin nükleaz benzeri bir işleve sahip olduğunu ve nükleik asitlerin fosfodiester bağlarını kırılmasını katalize edebildiğini bulmuşlardır (Manea, Houillon, Pasquato , ve Scrimin, 2004). İlk olarak, önemli ribonükleaz aktivitesine sahip tiyol korumalı altın nanoklusterin tek tabakasını tanımlamak için "nanozim" kavramı öne sürülmüştür. 2007 yılında Yan vd. ilk kez manyetik demir tetroksit nanopartiküllerinin peroksidaz

benzeri özellikler sergilediğini bildirmiştir (Gao vd., 2007). Bu keşif, hızla bir araştırma noktası haline gelen nanozimlere olan ilginin artmasını sağlamıştır.

HuiWei ve ErkangWang ayrıca nanozim kavramını “enzimatik özelliklere sahip nanomalzemeler” olarak tanımladılar. Yeni nesil yapay mimetik enzimler olarak nanozimler, doğal enzimlerden ve geleneksel yapay enzimlerden daha kararlı ve ekonomiktir. Şimdiye kadar, çeşitli nanozimler bildirilmiştir ve bu nano yapılar, biyosensörler, çevresel iyileştirme, hastalıkların tedavisi gibi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang, Hu , ve Wei, 2016; Wei ve Wang, 2013).

Nano enzimler, nanomalzemelerin ve katalizörlerin ikili özellikleri göz önüne alındığında nanomalzemenin boyutları ve katalitik tiplerine göre sınıflandırılabilir. İlk olarak, nanomalzemenin boyutlarına göre sınıflandırılabilir. Bir nano malzemenin üç boyutu nano ölçekte 0D, 1D, 2D ve 3D olarak adlandırılmaktadır. İkinci olarak da enzimatik reaksiyon türlerine göre, peroksidaz nanozim, katalaz nanozim, oksidaz nanozim, nitrat redüktaz nanozim, nükleaz nanozim gibi mimetik doğal enzimlerine göre adlandırılabilir.

Nanozimler, organik bileşiklerden inorganik nanomalzemelere genişleyerek nanomalzemelerin uygulama aralığını zenginleştirmişlerdir. Fakat nanozimlerin katalitik özgülüğü, substrat seçiciliği artırılarak ve çok fonksiyonlu hale getirilerek farklı uygulamalarda kullanım için geliştirilmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Hou, Jiang, Sun, Zhang, Huang, Liu vd., 2019).

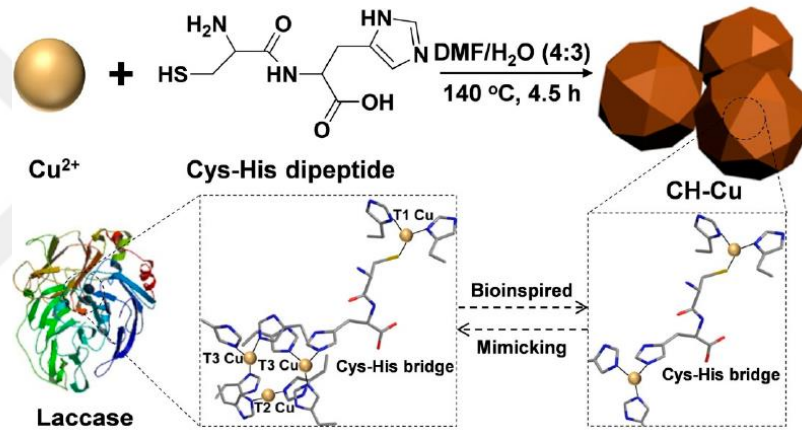
Literatürde verilen birçok fonksiyonlu yapay enzim çalışmasında biyoremediasyona yönelik araştırmalar mevcuttur. Organik kirleticiler, özellikle yüksek toksisiteye sahip olanlar, eko-çevre sistemi ve insan sağlığı üzerinde ciddi etkiler göstermiştir (Hu, Zhang, Zeng, Chen, Wan, Guo vd., 2016). Şimdiye kadar, kimyasal oksidasyon, fiziksel adsorpsiyon ve biyolojik bozunma dahil olmak üzere organik kirleticileri ayrıştırmak için çeşitli yöntemler önerilmiştir.

Biyolojik bozunma, yüksek verimli ve çevre dostu olma özelliklerine sahiptir. Ancak biyolojik bozunma için kullanılan doğal enzimlerin pahalı ve kararsız olmaları gibi negatif özelliklerinden dolayı organik kirleticileri ayrıştırmak için yeni malzemeler ve yöntemler geliştirilmektedir. Enzim mimikler bu alanda kullanım için ideal bir bozunma ajanı olarak kullanılabilir. Şimdiye kadar, rapor edilen enzim mimikler kullanılarak bozunmaya uğratılan organik molekülleri arasında fenol, bisfenol A,

metil mavisi, sülfametoksin, 4-klorofenol, norfloksasin, ksilenol turuncusu, sülfatazöl, rodamin B, metilen mavisi ve kongo kırmızısı bulunmaktadır.

Wang vd., klorofenoller ve bisfenoller gibi kirleticilerin parçalanması için bir Cys-His dipeptit ile  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  koordinasyonuna dayalı yeni bir CH-Cu nanozim geliştirmiştir (Şekil 9) (Wang, Huang, Qi, Su, Binks, ve He, 2019).

Oluşturulan CH-Cu nanozimler, lakkaz aktivitesini mimik edebilmekte ve lakkaz ile karşılaştırılabilir mükemmel bir katalitik aktivite, geri dönüştürülebilirlik ve substrat evrenselliği sergileyebilmektedir. Metal iyonları kompleksleme reaksiyonu için metal ligandlar olarak anahtar peptitlerin kullanılması, doğal bir enzimin aktif bölgesinin yapısını mimik edebilen yeni nanozimlerin tasarımı ve sentezi için yeni bir kavram ve yöntem olarak kullanılabilir (Wang vd., 2019).



**Şekil 9.** Klorofenollerin ve bisfenollerin degradasyonu için bir Cys-His dipeptid ile  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ 'nin koordinasyonu ile tasarlanan yeni CH-Cu nanozimin şematik gösterimi ('MDPI, Catalysis' Dergisi izni ile (Hou vd., 2019) şekil kullanılmıştır.).

Bu sürece rağmen, nanozimlerin geri kazanımı oldukça zordur. Çünkü nanozimlere ligandların bağlanması aktif bölgeleri bloke edebilir ve bunların katalitik aktivitesini etkileyebilir (Liu ve Liu, 2017). Bu sorunu çözmek için, manyetik nanopartiküller ile bir nanozim geliştirmeye çalışılmıştır. Bu düşüncenin, ayırma ve geri dönüşümün yanı sıra katalitik aktivitenin sürdürülmesi için yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Yapay katalistler olarak kullanılan ve hala geliştirilmekte olan enzim mimiklerin arasında fulleren türevli enzim mimik yapılar da önemli bir yere sahiptirler.  $\text{C}_{60}$  türevleri, altın nanopartiküller, nadir toprak nanopartikülleri ve ferromanyetik

nanopartiküller gibi bazı nanomateryallerin, beklenmedik enzim benzeri aktivite sergilediği bulunmuştur (Dugan, Gabrielsen, Yu, Lin , ve Choi, 1996; Wang, Liu, Yang, Wang, Liu , ve Cao, 2012). O zamandan beri, nanoboyutta yapılan çalışmalardaki sayının artışı ve nanomalzemelerin benzersiz özellikleri nedeniyle bu alandaki çalışmalarda önemli bir yol katedildi. Nanozimler, biyoalgılama, immünolojik testler, kanser teşhisi ve tedavisi, nöroproteksiyon, kök hücre büyümesi ve kirlenici uzaklaştırma dahil olmak üzere birçok alanda geniş uygulama olanaklarına sahip olmuştur (Wei ve Wang, 2013).

Fulleren ve türevleri, doğal enzimleri mimik etmek için keşfedilen ilk nanomalzemeler arasındaydı (Nakamura ve Isobe, 2003; Tokuyama, Yamago, Nakamura, Shiraki , ve Sugiura, 1993). Yapılan ilk çalışmalar C<sub>60</sub>'ın radikallere karşı benzersiz kimyasal reaktivitesi nedeniyle radikal bir sünger olarak görev yapabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, herhangi bir modifikasyon olmadan fullerenler suda çözünmez, yani sulu çözeltiler içinde biyomoleküllerle etkileşime giremezler. Suda çözünür fulleren türevlerinin kimyasal modifikasyon stratejileri yoluyla geliştirilmesine yönelik devam eden çalışmalar, biyomoleküllerle etkileşimleri ve enzim benzeri aktiviteler gibi çeşitli buluşların ortaya çıkmasını sağlamıştır (Wang, Wei, Zhang, Wang , ve Dong, 2018).

Nanomalzemelerin yüzey modifikasyonu, biyoyoumluluklarının iyileştirilmesinde, *in vivo* dağılım ve metabolizmalarının düzenlenmesinde ve özellikle zayıf çözünür veya çözünmeyen nanomalzemeler için önemli olan çevre üzerindeki toksisitesinin azaltılmasında önemli bir rol oynar (Wu, Chang, Liu, Zhao , ve Zhao, 2010; Yan, Zhao, Li, Hu , ve Zhao, 2011).

Karbonun yüzey kimyasını keşfetmeye yönelik araştırmalarda nanomalzemeler, biyomedikal ve diğer birçok uygulama için yeni özellik ve fonksiyonlarını daha iyi anlamak için önemlidir (Lao, Li, Han, Qu, Liu, Zhao vd., 2009; Meng, Xing, Blanco, Song, Zhao, Sun vd., 2012).

Fullerenlerin aminoasitler gibi hidrofilik kısımlarla işlevselleştirilmesi, düşük hidrofilitésinin üstesinden gelmek, enerji ve elektron transferini engelleyen kümelenmeyi önlemek için önemlidir. Fonksiyonelleştirilmiş C<sub>60</sub>, tümör büyümesinin inhibisyonu, HIV-1'e karşı antiviral aktivite ve seçici DNA kopması

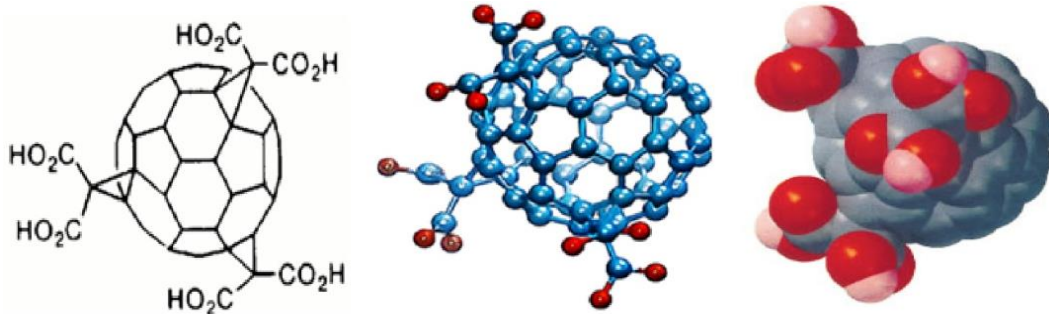
gibi tıbbi ve biyolojik uygulamalarda kullanılmıştır (Lee, Mackeyev, Cho, Li, Kim, Wilson vd., 2009).

Fullerenlerin tıptaki potansiyel uygulamaları, çoğu fullerene türevinin tipik ilaçlara kıyasla alışılmadık derecede düşük toksisiteye sahip olması sebebiyle arttırılmaktadır (Richardson, Schuster , ve Wilson, 2000).

1990'ların başlarında, bir  $C_{60}$  türeviyle (yani  $C_{60}$ -1) ışık kaynaklı oksidatif DNA bölünmesi gösterilmiştir. Birkaç yıl sonra, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini mimik eden fullerene türevi araştırılmış ve bu çalışma bugüne kadar fullerene bazlı nanoenzimlerin uzun süredir devam eden araştırmalarına yol açmıştır. Fullerene ve türevleri, nükleaz ve SOD'un yanı sıra peroksidaz gibi diğer enzimleri mimik etmek için de kullanılmıştır (Wang, Guo, Hu, Wu , ve Wei, 2016).

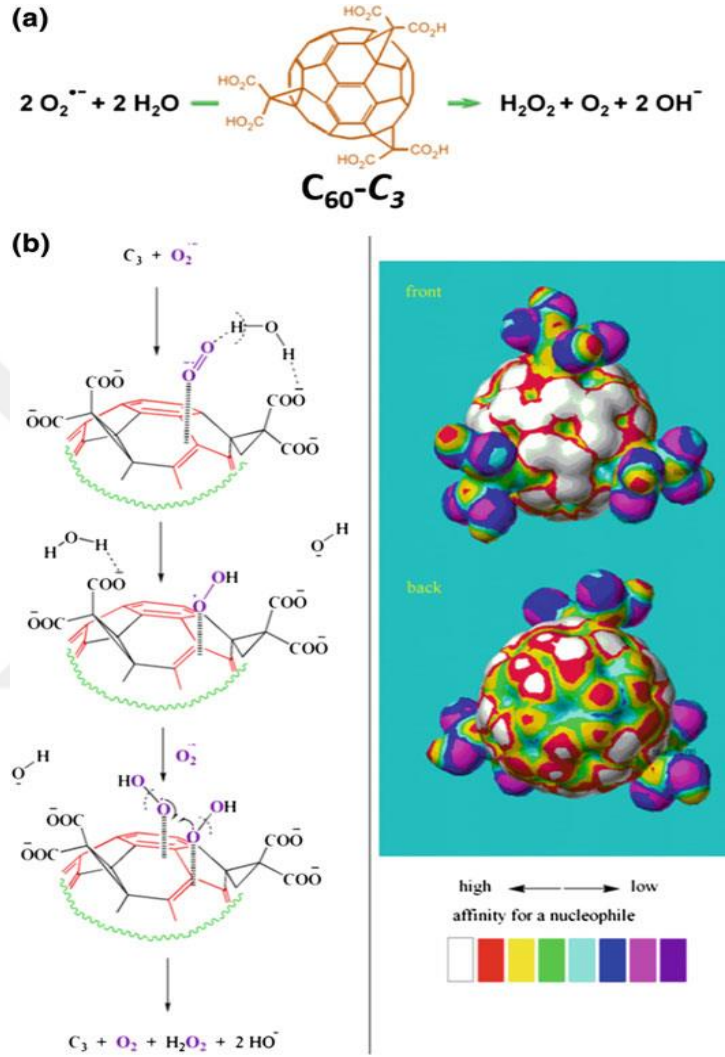
Fullerenlerin SOD mimik etme aktivitesi, kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Dugan, Gabrielsen, Yu, Lin , ve Choi, 1996).  $C_{60}$ 'ın radikal bir sünger görevi görebileceğinin erken keşfinden esinlenen Choi vd., iki polihidroksillenmiş  $C_{60}$ 'ın (yani,  $C_{60}(\text{OH})_{12}$  ve  $C_{60}(\text{OH})_n\text{Om}$ ,  $n = 18-20$ ,  $m = 3-7$  hemiketal grup) nöroprotektif aktivitelerini araştırmıştır (Dugan, Gabrielsen, Yu, Lin , ve Choi, 1996; Krusic, Wasserman, Keizer, Morton , ve Preston, 1991). İncelenen iki fullerene türevinin her ikisinin de serbest radikalleri temizlediği ve böylece kültürlenmiş kortikal nöronların eksitotoksik ve apoptotik ölümünü azaltabildiği gösterilmiştir.

Sonraki çalışmalarda, C3 simetriye ( $C_{60}$ -C3) sahip  $C_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ 'ün nöron korumasına karşı etkili olduğunu belirlediler (Dugan, Turetsky, Du, Lobner, Wheeler, Almlı vd., 1997).



**Şekil 10.**  $C_{60}[\text{C}(\text{COOH})_2]_3$ 'ün Moleküler Yapısı ('Free Radical Biology and Medicine' Dergisi izni ile (Dugan vd., 1997) şekil kullanılmıştır.).

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar analiz edilerek, C<sub>60</sub>-C<sub>3</sub>'ün SOD benzeri aktivitesi için katalitik mekanizma önerilmiştir (Şekil 11). Önerilen mekanizma, dendritik C<sub>60</sub> türevlerinin kullanıldığı diğer çalışmalar tarafından desteklenmiştir (Liu, Filipović, Ivanović-Burmazović, Beuerle, Witte , ve Hirsch, 2008; Osuna, Swart , ve Solà, 2010).



**Şekil 11.**SOD mimikleri olarak türetilmiş C<sub>60</sub> a. Süperoksit anyonunu katalitik olarak hidrojen peroksit, su ve hidroksile dönüştürmek için bir SOD taklidi olarak C<sub>60</sub>C<sub>3</sub>. b. Önerilen katalitik mekanizma ('Free Radical Biology and Medicine' Dergisi izni ile (Ali, Hardt, Quick, Kim-Han, Erlanger, Huang vd., 2004) referans göstermiştir.).

Fulleren tabanlı SOD mimiklerinin nöroprotektif etkileri, diğer birkaç hücre hattı kullanılarak da incelenmiştir. Örneğin, metiyonin ile modifiye edilmiş C<sub>60</sub>, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerini kurşun iyonlarının (Pb<sup>+2</sup>) indüklediği oksidatif

hasardan koruyarak ve böylece hücre sağkalımını iyileştirebilmektedir (Chen, Li, Zhang, Xu, Lin, Wang vd., 2011).

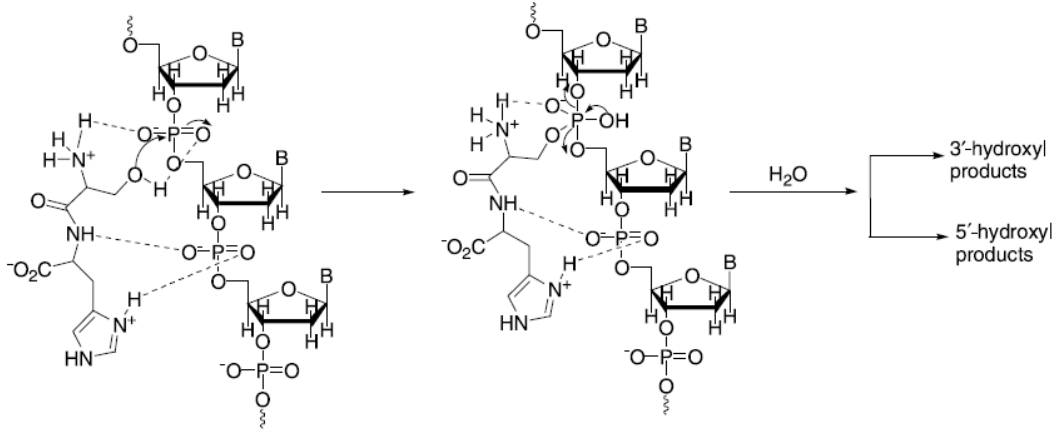
Suda çözünebilen fullerenler genellikle enzim mimik etme çalışmaları için gerekli olsa da, saf C<sub>60</sub> sulu süspansiyonunun sadece biyolojik olarak uyumlu olmadığı, aynı zamanda karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkiler de gösterdiği gösterilmiştir (Gharbi, Pressac, Hadchouel, Szwarc, Wilson , ve Moussa, 2005).

Son zamanlarda, yapay nükleik asit parçalama ajanları, biyokimya ve moleküler biyolojideki çok önemli uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir.

Yapay nükleik asit parçalama ajanlarının çalışmalarının yapılmasındaki amaç doğal nükleazların katalitik mekanizmasını anlamak (Nomura ve Sugiura, 2004) ve bölgeye, diziye özgü bölünme ajanlarının gen terapisine (Cowan, 2001), genel moleküler biyolojiye uygulanabilirliğini göstermektir.

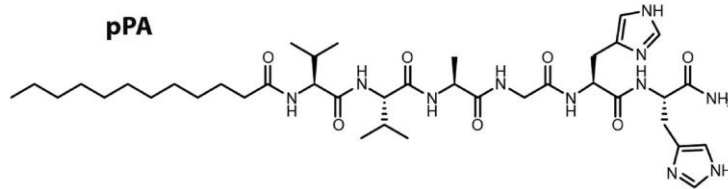
Yapılan enzim mimik çalışmalarından bir tanesi de sadece iki-üç aminoasit dizisinin birlikte çalıştığı mekanizmalardır. Örneğin; Serin (Ser) ve Histidin (His) amino asitleri, doğal olarak oluşan çeşitli enzimlerin aktif bölgelerinde enzimatik reaksiyonlara doğrudan katılımcılar olarak birlikte işlev görür. Serinin yan zincir hidroksili genellikle bir nükleofil görevi görürken, histidin, enzimlerde proton veren veya kabul eden bir grup olarak işlev gören imidazol yan zincirine sahiptir ve bazı serin proteaz mimikleri bu kavramlara göre tasarlanmış ve sentezlenmiştir (Catry ve Madder, 2007; Madder, Li, De Muynck, Farcy, Van Haver, Fant vd., 2002).

Enzimlerin peptid bağı ve ester bağı bölünme reaksiyonlarında Ser (veya ilgili aminoasit grupları) ve His görevleri bilinmektedir. Peptid bağının ve fosfodiester bağının bölünmesindeki ortak kimyasal özellikler, dipeptid serin-histidinin (Ser-His) DNA'nın kendisinin yanı sıra proteinleri de parçalayabildiği deneysel sonuçlarla daha da doğrulanmıştır (Ma, Chen, Sun, Wan, Zhu, Li vd., 2008).



**Şekil 12.** Ser-His tarafından DNA hidrolizi için önerilen mekanizma. Kesik çizgiler, Ser-His ve oligonükleotid arasındaki H-bağlarını göstermektedir ('Amino Acids' Dergisi izni ile (Ma vd., 2008) şekil kullanılmıştır.).

Yapılan farklı bir enzim mimik çalışması da, ALP'nin hem katalitik hem de biyomineralizasyon artırıcı işlevlerine sahip olan ve doğal hücre dışı matrikste bulunanlara benzer tasarlanan bir nano-lif yapı olan peptit nanofiberlerdir. Bu yapay fosfataz benzeri peptit nanoyapılar (pPA'lar), çok işlevli nodüller olarak hareket eden katalitik merkezlere sahiptir ve biyoaktif, katalitik ve kalsifiye olabilir kemik matris yapıları üretmek için kullanılmıştır (Gulseren, Yasa, Ustahuseyin, Tekin, Tekinay , ve Guler, 2015).



**Şekil 13.** pPA (Lauryl-VVAGH-Am) ve kontrol grup peptit amfifillerinin kimyasal yapısı ('ACS Publications' Dergisi izni ile (Gulseren vd., 2015) şekil kullanılmıştır.).

Peptit molekülleri arasında görüntülenen sinerjik etkilerle oluşturulan enzim benzeri katalitik bir aktiviteyle kolaylaştırılan biyomineralizasyon sürecinin güçlendirilmesi için bir iskele olarak peptit nanoyapılar kullanılmıştır. Bireysel peptit amfifil moleküllerinin aktif bölgeleri, nanofiber sistemin çevresinde çok sayıda histidin grubu sunmak üzere tasarlanmıştır. Kullanılan gruplar doğal ALP enziminin katalitik aktivitesini mimik etmek için düzenlenmiştir. Sentetik ALP mimetik nanoyapıları, aynı zamanda çoklu hücre tiplerinin verimli osteogenik farklılaşmasını indüklemiş ve

organofosfat moleküllerinin hidrolizi yoluyla kemik benzeri nodüllerin oluşumunu kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir (Gulseren vd., 2015).

#### **2.2.4. Model Enzim: Alkalen fosfataz**

ALP, omurgalılarda en yaygın bulunan fosfatazlardan biridir ve alkali ortamlarda proteinler, nükleotidler gibi biyomolekülleri veya pirofosfatlar ve ATP gibi küçük fosforile molekülleri defosforile etmek için işlev görür. Bu enzimin temel işlevlerinden biri kemik mineralizasyonunun düzenlenmesidir ve kemik yeniden şekillenme sürecinde osteoblastlar tarafından büyük ölçüde salgılanır.

ALP (EC 3.1.3.1), fosforik asidin monoesterlerinin hidrolizini katalize eden bir dimerik metaloenzim ailesinin bir üyesidir. Ayrıca, büyük konsantrasyonlarda fosfat alıcısı varlığında bir transfosforilasyon reaksiyonunu katalizlerler (Herries, 1981). ALP, *Escherichia coli*'den insana kadar birçok organizmada bulunan homodimerik enzimlerdir ve her katalitik bölge enzimatik aktivite için gerekli olan üç metal iyonu (iki Zn iyonu ve bir Mg iyonu) içermektedir (Kim ve Wyckoff, 1991).

Katalitik mekanizmanın temel özellikleri memeli ALP'leri ve *E. coli* enzimi arasında korunurken, önemli farklılıklar vardır.

Memeli ALP'leri;

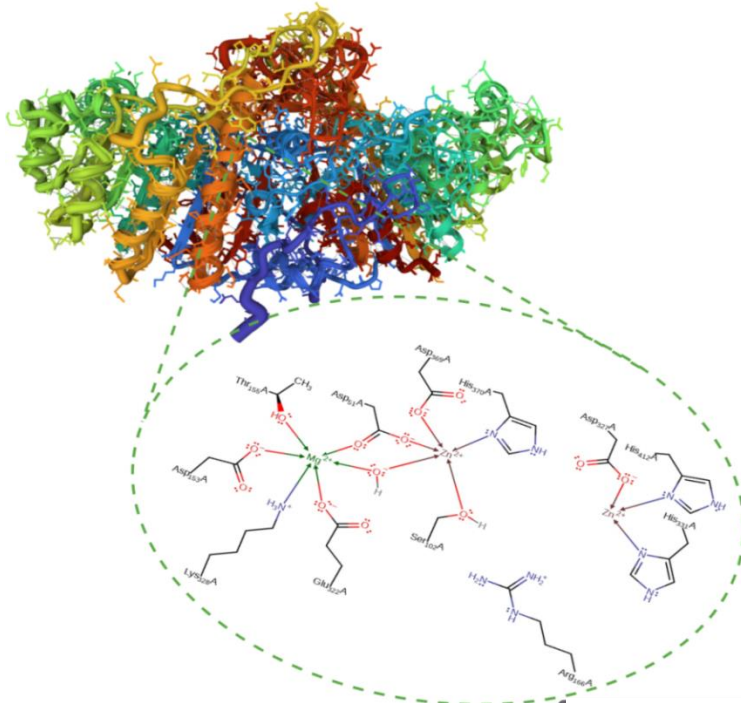
- (a) Daha yüksek spesifik aktiviteye ve  $K_M$  değerlerine sahiptir,
- (b) Daha alkali bir pH optimumuna sahiptir,
- (c) L-amino asitler ve peptitler tarafından rekabetçi olmayan bir mekanizma yoluyla inhibe edilirler ve
- (d) Daha düşük ısı stabilitesi gösterirler.

Bu özellikler, memeli ALP izozimleri grubu içinde önemli ölçüde farklılık gösterir (Kozlenkov, Manes, Hoylaerts , ve Millán, 2002).

### 2.2.4.1. Alkalen Fosfatın Özellikleri

ALP, iki aynı veya benzer alt birimden oluşan dimerik bir glikoproteindir. ALP, molekül başına dört  $Zn^{+2}$  ve iki  $Mg^{+2}$  iyonu içerir. Saflaştırılmış enzim en çok 7,5-9,5 pH aralığında stabildir ve daha düşük pH' ta hızla etkisiz hale gelir. Asidik denatürasyona karşı koruma, inorganik fosfat varlığında gözlenir.

ALP'nin katalitik aktivitesi, aktif alanda histidin aminoasit içeren imidazol grubuna güçlü bir şekilde bağlıdır. İmidazoil kısımları fizyolojik pH'ta farklı rollere sahip olabilirler. Genel bazlar veya asitler gibi davranırlar. Ya da spesifik katalitik reaksiyonlar üretmek için metal destekli nükleofil olarak hareket ederler. ALP'de histidin grupları, enzim üzerinde organofosfatların kompleks oluşturmalarına izin verir ve moleküller arası bir nükleofile dönüştürülen su molekülünün deprotonasyonunu kolaylaştırır. Bu nükleofilin daha sonra bir fosfat monoesterin ester bağına saldırması, hidroksiapatit mineralizasyon sürecinin başlamasını tetikler (Gulseren vd., 2015).



**Şekil 14.** ALP enzimi yapısı ve aktif bölgelerinin gösterimi. Şekil Biorender.com da oluşturulmuştur.

#### 2.2.4.2. Biyorejeneratif Çalışmalarda Kullanımı

ALP, çeşitli moleküler ve biyolojik sistemlerin koordineli hareketini gerektiren karmaşık bir işlem olan kemik oluşumunda görevli en önemli enzimdir. ALP, hücre dışı matriksteki inorganik piro fosfat ( $PP_i$ ), fosfat esterlerden inorganik fosfatı ( $P_i$ ) kopararak artırır. Böylece, inorganik fosfatın bölgesel konsantrasyonunu yükseltir ve kemik dokusunun temel yapı taşlarından biri olan hidroksiapatit oluşumunu teşvik eder. ALP, ayrıca osteoblast farklılaşmasını indüklemeye ve kalsifiye edilebilir bir kemik matriksi oluşturma kabiliyetinden kaynaklanan osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri gösterir (Gulseren vd., 2015).

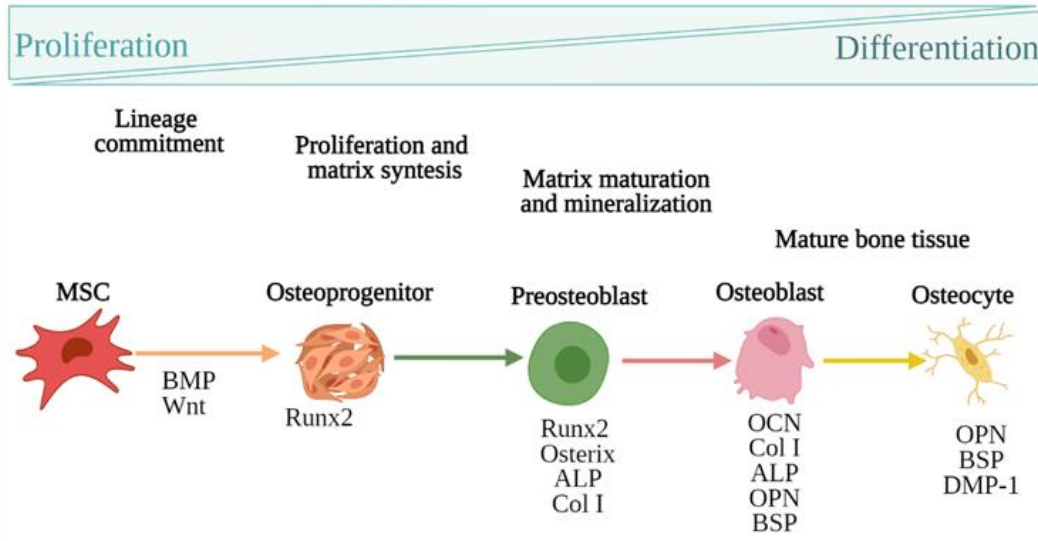
Enzimin kemik mineralizasyonunda (Tenenbaum, Torontali , ve Sukhu, 1992), kalsiyum pirofosfat kristallerinin çözünmesinde, fosfat ve kalsiyum taşınmasında ve bağırsak fosfat emiliminde (Roubaty ve Portmann, 1988) rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu enzim fosfat gruplarını monofosfat ester substratlarından ayırır; ayrıca fosfotransferaz ve protein fosfataz aktivitesi sergiler (McCarthy, Cortizo, Segura, Bruzzone , ve Etcheverry, 1998). Alkalen fosfataz, birincil ve ikincil alkollerin esterleri, şeker alkollerini, siklik alkoller, fenoller ve amino alkoller gibi çok sayıda fosfat esterinin hidrolizini katalize eder (Aehle, 2007). Enzimin doğal substratları arasında pirofosfat ( $PP_i$ ), ortofosfat,  $\beta$ -gliserofosfat, fosfoetanolamin ve piridoksal-5'fosfat bulunur (Schröder, Kurz, Müller , ve Lorenz, 2000). Enzim, tercihen, terminal fosfat gruplarını oligonükleotidlerden ve monofosfat esterlerden seçici olarak ayırmak için kullanılır. Moleküler biyolojide, alkalen fosfataz esas olarak 5'ucu fosforile DNA veya RNA uçlarının defosforilasyonunda kullanılır. Bu 5'ucu hidroksillenmiş substratlar, substrat olarak T4 polinükleotidkinaz ve  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP ile etkili bir şekilde 5'-ucu etiketlenebilir. 3'-fosforile RNA uçları da alkalen fosfataz ile defosforillenir. 5'-terminalde  $^{32}P$ -etiketli DNA veya RNA en çok kimyasal DNA dizilemesinde veya baza özgü RNazlarla uç etiketli RNA'nın degradasyonu yoluyla RNA dizilemesinde sıklıkla kullanılır (Aehle, 2007).

Bununla birlikte, alkalen fosfataz, haritalama ve parmak izi çalışmaları için kullanılan DNA ve RNA fragmentlerinin etiketlenmesinde de rol oynar. Enzim ayrıca rekombinant DNA moleküllerinin yapımında kullanılır. Vektör DNA'nın

kendi kendine yapışması, klonlanacak DNA parçasının eklenmesinden önce doğrusallaştırılmış vektör molekülünün defosforilasyonu ile önemli ölçüde engellenebilir.

ALP'nin de etkinliğinin gösterdiği kemik oluşumu, MSC veya kemik iliğinin perisitlerinin başkalaşımının olacağı hücre türlerine yönelimi ile başlar (James ve Péault, 2019) ve hücre türlerine başkalaşım, proliferatif çoğalma, hücre dışı matris sentezi, mineralizasyon olmak üzere dört aşamayla karakterize edilir (Şekil 1) (Rossi, Battafarano, De Martino, Scillitani, Minisola, ve Del Fattore, 2021).



**Şekil 15.** Kemik Hücresi Başkalaşım Aşamaları. Şekil (Rossi vd., 2021) kaynağından ilham alınarak Biorender.com da oluşturulmuştur.

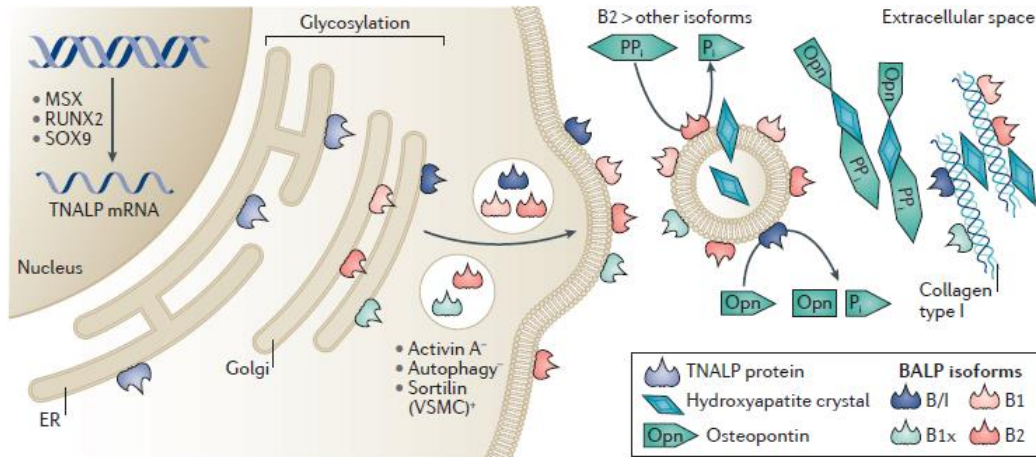
Özel bir hücre türüne yönelim aşaması ile ilgili olarak, MSC'den osteoblast farklılaşması, hem kanatsız protein (WNT) hem de kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP) kontrolü altında gerçekleşen spesifik bir gen ekspresyon programını takip eder.

Bu yolların aktivasyonu ve sinyal iletimi,  $\beta$ -katenin'in stabilizasyonuna ve küçük annenin dekuplejik (SMAD) sinyalizasyonuna karşı aktivasyonuna, runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2) ve transkripsiyon faktör 7 (Sp7, Osterix) gibi osteoblastogenezde yer alan ana transkripsiyonel faktörlerin ekspresyonuna yol açar (Wu, Chen, ve Li, 2016).

Hücre türlerine başkalaşım aşamasının başlamasının ardından, pre-osteoblastların yoğun bir proliferatif aktivitesi fazı meydana gelir; bu hücreler Runx2, Osterix, ALP

ifade eder ve sonuçta tip I kollajen ortaya çıkar ve bir ara aşamayı temsil eden bu evrede osteoblast hücre tipine doğru bir yönelim başlar.

Proliferasyon aşamasının sonunda, pre-osteoblastlar morfolojilerini büyük kübik osteoblastlarda değiştirir. Osteoblastlar, yüksek seviyelerde ALP eksprese eder ve tip I kollajen (%90) dahil olmak üzere matris proteinlerinin salgılanmasıyla mineralize olmayan ve esnek kemik osteoidlerinin (hücre dışı matris fazının sentezi), proteoglikanların, fibronektinlerin, osteopontin ve osteokalsin gibi spesifik kemik proteinlerinin küçük bir yüzdesini oluşturur (Rutkovskiy, Stensløkken , ve Vaage, 2016) . Daha sonra, mineralizasyon fazı oluşur ve osteoblastlar tomurcuklanarak 'kalsifiye globüller' olarak da bilinen matris vezikülleri (Avdeev vd.) salgılar ve kalsiyum ve fosfattan ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) oluşan hidroksiapatit kristallerinin oluşumuna yol açar (Del Fattore, Teti , ve Rucci, 2012). matris vezikül (MV), dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz (TNSALP) tarafından inorganik  $\text{P}_i$  a hidrolize edilen  $\text{PP}_i$  üreten membranlarında bulunan birkaç enzim ve taşıyıcı içerir (Zhou, Cui, Zhou , ve Han, 2012). MV deki anneksin ve fosfatidil serinin varlığı,  $\text{P}_i$  ile birlikte hidroksiapatit kristallerinin çekirdeklenmesini ve büyümesini destekleyen kalsiyum iyonlarının birikmesine yol açar. Yeni oluşan hidroksiapatit kristalleri, MV tarafından hücre dışı matrise salınır; burada  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{P}_i$  varlığı, kollajen fibriller arasındaki boş alanları dolduran kristal proliferasyonunu destekler (Del Fattore, Teti , ve Rucci, 2012). İlgili hücre tipinden bağımsız olarak, kemik ve vasküler mineralizasyon, hücre dışı matris mineralizasyonunun matris veziküllerin salınmasıyla ilişkilidir (Şekil 16) (Golub, 2011).



**Şekil 16.** Doku mineralizasyonunda kemiğe özgü alkalen fosfatazın (BALP) rolü ('Nature Reviews Nephrology' Dergisi izni ile (Haarhaus, Brandenburg, Kalantar-Zadeh, Stenvinkel , ve Magnusson, 2017) şekil kullanılmıştır.).

BALP (Kemiğe özgü alkalene fosfataz), doku mineralizasyonunun yayılmasından sorumludur ve osteoblastlarda, kondrositlerde ve kalsifiye VSMC (vasküler düz kas hücresi)'ler gibi diğer mineralizasyon yetkin hücrelerde ifade edilir (Millán, 2013). En yüksek BALP konsantrasyonu, VSMC'ler tarafından dökülen matris veziküllerde bulunur (Ali, Sajdera , ve Anderson, 1970). BALP'ın matriks veziküllere yüklenmesi,  $P_i$  açısından zengin bir ortamda otofajinin inhibisyonu gibi pro-kalsifik uyarımlarla kontrol edilebilen aktif bir işlemdir (Dai, Zhao, Cai, Guan, Zhao, Guan vd., 2013). Hasar görmüş hücresel bileşenlerin otofajisi, VSMC'leri  $P_i$ 'nin neden olduğu oksidatif stresten koruyan bir savunma mekanizmasıdır. Otofajinin ininhibisyonu, artmış ALP aktivitesi ile pro-kalsifik matriks veziküllerinin salınmasını uyarır (Dai vd., 2013).

Protein sınıflandırıcı peptit sortilin, farelerde vasküler kalsifikasyon sırasında matris veziküllere ALP'lerin yüklenmesinde rol oynar (Goettsch, Hutcheson, Aikawa, Iwata, Pham, Nykjaer vd., 2016). BALP'ın mineralizasyon sırasında baskın rolü, en önemlisi otokrin kalsifikasyon inhibitörü  $PP_i$  olan inhibitör polifosfatların inaktivasyonudur. ALP'ler aynı zamanda organik fosfat esterlerin hidrolizasyonu yoluyla mineralizasyonun substratı olan  $P_i$ 'yi oluşturur (Haarhaus, Brandenburg, Kalantar-Zadeh, Stenvinkel , ve Magnusson, 2017).

$P_i/PP_i$  oranı,  $P_i$  ve  $Ca^{+2}$  konsantrasyonları çözünürlük ürünlerini aştığında, hidroksiapatit kristalleri matriks veziküller içinde ve hücre dışı matrikste oluşup büyüdükçe, doku mineralizasyonunun merkezi bir belirleyicisi olarak giderek daha fazla tanınmıştır.  $PP_i$  ise hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine bağlanarak bu süreci engellemektedir. Hücre dışı matrikste bu denge, zara bağlı enzimler tarafından sağlanır. Bu enzimlerin ekspresyonu, fibroblast büyüme faktörü 23 ve 1,25-OH vitamin D gibi mineral metabolizmasını düzenleyen hormonlar tarafından düzenlenir (Villa-Bellosta, Wang, Millán, Dubyak , ve O'Neill, 2011).

Kemik oluşumunun sonunda, bazı osteoblastlar apoptoz nedeniyle ölür veya inert kemiği saran hücreler haline gelirken, diğerleri kalsifiye olmuş matrikste osteositler olarak gömülü kalır (Rutkovskiy, Stensløkken , ve Vaage, 2016).

Osteoblastların sayısı ve aktiviteleri epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilir ve yerel veya sistemik faktörlerle düzenlenir (Sims ve Martin, 2014).

## 2.2.5.Enzim Katalitik Aktivitesinin Belirlenmesi

### 2.2.5.1.Michaelis Menten- Metodu

Bir enzim reaksiyonunun ilk aşamasında, substrat konsantrasyonu [S] artarsa, katalitik hızı artacaktır. Substrat konsantrasyonu değiştirilirse, reaksiyon hızı, maksimum doygunluk hızı veya oranı (Vmax) ile sonuçlanan bir hiperbol oluşturacaktır (Şekil 17).

Bir enzim reaksiyonunda substrat konsantrasyonu artarsa, doygunluk gerçekleşir (Vmax). Böylece, bir enzime konjüge olan bir substrat işleminde substrat, enzim reaksiyonunda bir enzim ile işbirliği yapar. Bu, hız sınırlayıcı bir süreç olarak kabul edilir ve enzim reaksiyonunun düzenlenmiş bir reaksiyon hızı olabilir.

1913'te Michaelis ve Menten, sükrözün sükras ile hidroliz reaksiyonunun kinetik ölçümünü gerçekleştirdiler. Sonuçlarından, anahtar kilit modeli üzerinden bir enzim-substrat kompleksi modeli sundular ve enzim reaksiyonunu aşağıdaki gibi formüle edilmiştir:



Bir enzim reaksiyonu iki aşamaya bölünür. İlk aşamada, enzim ve substratı geçici olarak bağlanır ve bir enzim-substratkompleksi oluşturur. İkinci adımda, enzim-substrat kompleksi bir enzime ve bir ürüne bölünür (Komoda ve Matsunaga, 2015).

İnhibisyon yokluğunda temel enzim kinetiği; Denklem 2.2.6.2.'de gösterildiği gibi bir enzimik reaksiyonda serbest enzim (E), substrat (S), enzim-substrat kompleksi ve ürünler arasındaki denge dikkate alınarak anlaşılır. Tanımlanan reaksiyonda, hız sabitleri  $k_1$  ve  $k_2$  sırasıyla ileri ve geri reaksiyon hız sabitlerini gösterir. Enzim-substrat kompleksinin oluşum hızı daha sonra  $k_1[E][S]$  ve enzim-substrat kompleksinin yıkım hızı  $k_2[ES] + k_3[ES]$  ile tanımlanır. [ES]'nin değişim hızı ihmal edilebilir olduğundan, [ES]'nin oluşum ve yıkım oranları arasındaki ilişki,  $K_M$ 'nin Michaelis-Menten 2.2.6.6. sabiti olarak bilindiği Denklem 2.2.6.3.'ü verecek şekilde eşitlenebilir.



$$\frac{k_2 k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = k = K_M \quad 2.2.6.3.$$

Dengede, ürün oluşum hızı, reaksiyonun genel hızının bu hız tarafından belirleneceği şekilde sınırlayıcı adımdır (Denklem 2.2.6.4.).

$$v = k_3[ES] \quad 2.2.6.4.$$

Belirli bir enzim miktarı için maksimum hız, enzimin tamamı enzim-substrat kompleksi formunda olduğunda, yani başlangıçta mevcut olan toplam enzim miktarı ile ilgili elde edilen hızdır (Denklem 2.2.6.5.).

$$v_{max} = k_3([E] + [ES]) \quad 2.2.6.5.$$

Denklem 2.2.6.4., 2.2.6.4. ve 2.2.6.5.'ü birleştirmek, reaksiyon hızının tahmini için iyi bilinen Michaelis–Menten denklemini verir ve Michaelis–Menten sabiti (Denklem 2.2.6.6.) cinsinden ifade edilir.

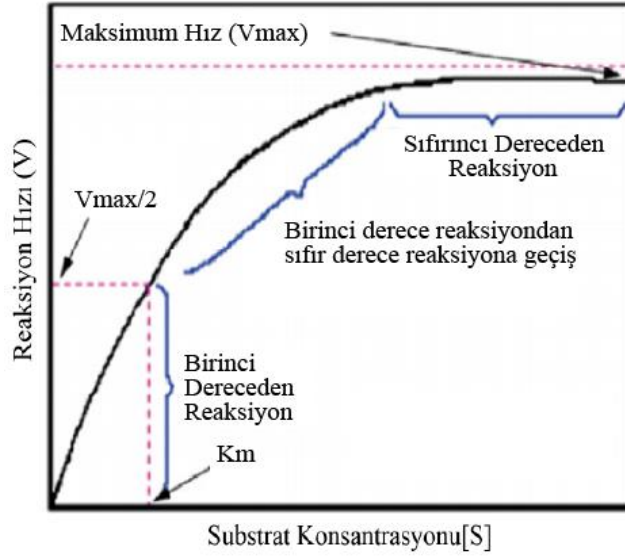
Bu fonksiyon, hız maksimumun yarısı olduğunda  $K_M$ 'nin substrat konsantrasyonuna eşit olduğu ve maksimum hıza ulaşıldığı hızı göstermeye hizmet ettiği (yani yüksek  $K_M$  yavaş bir hız anlamına gelir ve bunun tersi) tipik bir doyumluk eğrisini temsil eder.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad 2.2.6.6.$$

Denklem 2.5. ile reaksiyon hızının tahmini, bununla birlikte, kinetik sabitlerin,  $V_{max}$  ve  $K_M$ 'nin ölçülmesini gerektirir.

Geleneksel olarak bu hesaplama, Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmesi (Denklem 2.2.6.7.) ve y kesme noktası olarak  $v_{max}$ 'ın karşılığını ve x kesme noktası olarak  $K_M$ 'nin karşılığını aşağıdaki gibi vermek için substrat konsantrasyonunun (x) karşılıklı hızına (y) karşı grafiğini çizerek gerçekleştirilir (Clarke, 2013).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad 2.2.6.7.$$



**Şekil 17.** Kinetik Parametrelerin Michaelis Menten Grafiği Üzerinde Gösterimi ('Elsevier Books' Yayınevi izni ile (Komoda ve Matsunaga, 2015) şekil kullanılmıştır.).

### 2.3. Biyomineraller ve Biyomineralizasyon

Canlı organizmalar, sert dokuların oluşumu için inorganik moleküllerden oluşan biyomateryaller üretir. Bu biyokompozit malzemeler, hidroksiapatit, kalsiyum karbonat ve silika gibi 60'tan fazla farklı türde mineral içerir (Sarıkaya, 1999).

Kemikler, dişler, kabuklar, iskelet birimleri ve sivri uçlar gibi sert dokuları oluşturmak için biyolojik organizmalar hem organik biyomakromolekülleri (lipidler, proteinler ve polisakkaritler) hem de inorganik mineralleri aynı anda kullanırlar. Organik moleküllerin işlevi, inorganik materyalin biriktirilmesi için bir iskele sağlamak ve oldukça düzenli mineral katman oluşumunu kontrol etmektir. Özel dokulu ve sert bir doku üretmek için inorganik molekülün biriktirilmesi çok önemlidir.

Doğadaki tüm mineralizasyon süreçleri, çözeltilerden inorganik materyalin çökmesini içerir (Aksay, Trau, Manne, Honma, Yao, Zhou vd., 1996). Bu çökme sırasında, biyomineralizasyon adı verilen inorganik kristaller oluşur. Diğer bir deyişle biyomineralizasyon, biyolojik organizmalarda inorganik materyallerin oluşmasıdır.

Çok sayıda biyolojik organizma, hücre içi veya hücre dışı olarak inorganik materyaller üretir. Bu sert dokular, iskelet veya piezoelektrik özellikler gibi hem mekanik hem de fiziksel fonksiyonları sağlar.

Doğanın biyomineralizasyon yaklaşımındaki kilit rol, doğrudan veya sinerjik şablonlama ile yüksek düzeyde organize tekstüre ve lamine organik-inorganik molekül topluluklarının oluşumunu kontrol etmektir (Parker ve Townley, 2007).

Kemik, dişler, diatomlar ve deniz kabukları gibi doğada biyolojik olarak üretilmiş organik-inorganik kompozitler, sıklıkla eşzamanlı sentez ve birleşme yoluyla oluşurlar (Aksay vd., 1996).

Yapılar, proteinler veya lipitler gibi organik moleküllerin veya her ikisinin de inorganik materyalin biriktirilmesi için bir yapı iskelesi görevi göreceği şekilde şablon destekli kendiliğinden birleşme yoluyla oluşturulur.

Biyomineralizasyonun gerçekleştiği biyolojik organizmalar tarafından sentezlenen inorganik materyaller, fonksiyonel biyomimetik materyallerin üretim mühendisliği için önemli bir kaynaktır (Xu, Yao, Aksay , ve Groves, 1998). Doğal mineralizasyon süreçlerinin anlaşılması için gösterilen çabalar, yeni malzeme sentezi yaklaşımlarına yol açabilir. Makroskopik ölçekli yapı oluşturmak için organik-inorganik moleküllerin nano boyutlardan makro boyutlara hiyerarşik organizasyonu, sadece biyomedikal uygulamalar için değil, aynı zamanda yenilikçi mühendislik uygulamaları için de önemlidir.

### **2.3.1.Kemik Oluşumunda Etkili Kalsiyum Mineralleri**

Biyomineralizasyon, canlı organizmaların inorganik sert dokuların oluşumunu kontrol etmek için peptidler ve proteinler gibi organik molekülleri kullandığı biyolojik bir süreçtir.

Doğada kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) veya silikon dioksit ( $\text{SiO}_2$ ) gibi organizmalar tarafından sentezlenen çeşitli mineral türleri vardır. Ayrıca bir diğer önemli biyomineral sınıf, örneğin manyetotaktik bakterilerde bulunan demir oksitlerdir

(Blakemore, 1982). Biyominerallerin önemi, biyolojik sert dokuların oluşumu olan işlevlerinden gelir.

Kalsiyum ve fosfor, Dünya'nın yüzey tabakasında ağırlıkça yaklaşık %3,4 kalsiyum ve ağırlıkça %0,10 fosfor miktarında bulunan yaygın olarak dağılmış elementlerdir. Diğer biyominerallerle karşılaştırıldığında kalsiyum fosfatlar omurgalıların iskelet sistemlerinin ana bileşeni oldukları için çok önemlidirler (Dorozhkin ve Epple, 2002).

Kalsiyum fosfatlar, tüm karmaşık biyolojik sistemlerin sert dokularının oluşumundaki işlevleri arasında, yalnızca omurgalılarda değil, aynı zamanda mikroskobik organizmalarda da bulunan önemli bir biyomineral sınıfıdır (Mann, 1988).

Kalsiyum fosfatlar biyolojik sert dokuların en önemli inorganik bileşenleridir (Dorozhkin ve Epple, 2002). İnsanlar gibi omurgalılarda kemik ve diş dokusu kalsiyum fosfatlardan oluşur (Olszta, Cheng, Jee, Kumar, Kim, Kaufman vd., 2007).

Kalsiyum fosfatlar veya daha doğrusu kalsiyum ortofosfatlar, ortofosforik asit ( $H_3PO_4$ ) tuzlarıdır ve bu nedenle  $H_2PO_4^{-1}$ ,  $HPO_3^{-2}$  veya  $PO_4^{-3}$  içeren bileşikler oluşturabilir. Kalsiyum fosfat tuzları geniş bir bileşikler grubunu oluşturur (Hughes, 1996).

Tablo 2, bazı kalsiyum fosfat bileşiklerinin kimyasal adını, formülünü, kısaltmasını ve kalsiyum/fosfat oranını (Ca/P) özetlemektedir. Kalsiyum fosfat tuzları, bileşimlerine ve kristal yapılarına göre değişiklik göstererek belirli fizikokimyasal özelliklere yol açar.

**Tablo 2.** Biyolojik olarak önemli kalsiyum fosfat tuzları (Hughes, 1996).

İsim	Formülasyon	Kısaltma	Ca/P
Dikalsiyum fosfat anhidrat	$CaHPO_4$	DCPA	1,00
Dikalsiyum fosfat dihidrat	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	DCPD	1,00
Oktakalsiyum fosfat	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2 \cdot 5H_2O$	OCP	1,33
Trikalsiyum fosfat	$Ca_3(PO_4)_2$	TCP	1,50
Hidroksiapatit	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	HA	1,67

Ca/P molar oranlarına göre birkaç farklı tipte kalsiyum fosfat vardır; bunlardan bazıları monokalsiyum fosfat monohidrat, monokalsiyum fosfat anhidrat, dikalsiyum fosfat dihidrat, dikalsiyum fosfat anhidrat, oktakalsiyum fosfat, trikalsiyum fosfat, amorf kalsiyum fosfat, kalsiyum eksikliği olan hidroksiapatit (0,67), hidroksiapatit ve tetrakalsiyum fosfattır (Dorozhkin ve Epple, 2002).

### 2.3.2.Kalsiyum Fosfat Mineralizasyonu

Biyomineralizasyon süreci sert doku oluşumu açısından hayati öneme sahiptir. Biyomedikal bilimlerin temel araştırma alanlarından biri kemik ve dişleri oluşturan sert dokuların oluşumu ve yenilenmesidir.

Omurgalılarda olgun kemik ve dişlerde karbonatlı hidroksiapatit mineral fazı vardır. *İn vitro* olarak pH 8 civarında doymuş bir çözeltiden ilk çökelmiş fazın amorf kalsiyum fosfat olduğu ve bu nedenle termodinamik olarak kararsız olduğu ve böylece oktakalsiyum fosfat adı verilen kristalli mineral faza dönüştüğü bilinmektedir (Suzuki, 2010).

Apatit katmanları arasına eklenen hidratlı katman dışında hidroksiapatit ile hemen hemen aynı yapıya sahiptir. Oktakalsiyum fosfat (OCP) hidrolize maruz kaldığında hidroksiapatit oluşturur. Karbonatlı hidroksiapatit isminin nedeni, *in vivo* ortamda önemli miktarda bulunan fosfat moleküllerinin karbonata ikame edilmesinden kaynaklanmaktadır.

Kalsiyum fosfat ailesinin en önemli ilk üyesi olan amorf kalsiyum fosfat (ACP) yaklaşık 1,33 Ca/P oranına sahiptir ve kemik oluşumu sırasında ilk biriken faz olduğuna inanılmaktadır (Mahamid, Sharir, Addadi , ve Weiner, 2008). *İn vitro* ve ayrıca *in vivo* çalışmalar, ACP'nin aslında kemik dokusu olgunlaşmasından önce bir öncü faz olduğuna dair bazı önemli kanıtlar olduğunu ortaya çıkarmıştır (Mahamid, Aichmayer, Shimoni, Ziblat, Li, Siegel vd., 2010). Kalsiyum fosfat ailesinin ikinci çok önemli üyesi olan OCP ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), kemik oluşumunda ACP birikmesinden sonra oluştuğu düşünülen kalsiyum fosfatın geçici bir fazıdır.

Mineralizasyon çalışmaları açısından hem *in vitro* hem de *in vivo* hidroksiapatitin mineral oluşumunun son ve önemli aşaması olduğu söylenebilir. Hidroksiapatit

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  kalsiyum fosfat ailesinin üçüncü üyesi olmasının mineralize dokulardaki işlevleri nedeniyle biyomalzemeler alanında büyük bilimsel ilgi görmesi nedeniyle en önemlisi olabilir. Dişler, bu sert dokunun yaklaşık %96'sını oluşturan çok miktarda hidroksiapatit kristali içerir (Brès ve Hutchison, 2002). HA, kemik, diş minesi ve diş taşının ana bileşenidir ve OCP, en azından *in vivo* model organizmalarda kemik olgunlaşması sırasında bir öncü aşama olduğu kanıtlanan ACP ile oluşumunda önemli bir rol oynar. Birçok organizma, mineralize dokularının inorganik bileşenlerinin büyümesini yönlendirmek için karmaşık stratejiler geliştirmiştir.

Aktif kontrol mekanizmaları, nanoskopik rejimden bir kristalitin belirli bir bölgede çekirdeklenmesinden mineralize dokunun biyofiziksel özelliklerinin belirli bir işlevle eşleştirilmesi gereken makroskopik rejime kadar değişen yapısal sistemin neredeyse tüm seviyelerinde etkilidir. Bu konudaki önemli bilgi eksikliklerinden birisi, inorganik mineral ile makromoleküler organik matris arasındaki arayüzde meydana gelen moleküler etkileşimlerin mekanizmasıdır.

En yaygın kalsifiye dokular için, fibröz proteinlerden ve bunların üzerine adsorbe edilmiş asidik makromoleküllerden oluşan yapısal olarak sert bir kompozit matrisin, inorganik fazın nükleasyonunu içeren supramoleküler bir plan olarak görev yaptığı varsayılır. Sonraki kristal büyümesi, uygun bir sulu mikro ortamı çevreleyen özel bir bölme içinde ilerler.

Genellikle çözülmüş elektrolitler ve makromoleküllerin karmaşık bir karışımını içeren özel çözünen bileşimi, kristallerin morfolojisi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir.

Mineral biriktirme sırasında, büyüme faktörleri olgunlaşan kristal ile çözülmüş makromoleküller, belirli kristal yüzlere adsorbe edilebilir, böylece yavaşlar veya belirli kristalografik yönler boyunca birikme hızlarının engellenmesi gibi farklı şekillerde etkileşime girebilirler. Adsorbe edilmiş makromoleküller, kafes kusurları üretmek veya kristal dokusuna kesik bölmeleri eklemek için mineral tarafından tamamen büyütülebilir.

## 2.4.Osteogenik Farklılaşma Yolakları

İskelet dokusu, omurgalıların yaşam süresi boyunca mekanik kuvvetlere maruz kalır ve buna yanıt olarak kemik kütlesi ya mevcut iskelet materyalini emerek ya da bölgeye özgü bir şekilde yeni kemiği sentezleyerek ayarlanır.

Gelişmekte olan osteoblastlar ve progenitör hücreler içinde kemik sentezinin kontrol edildiği kesin hücrel sinyal mekanizmaları tanımsız kalır. Sürecin, integrinler ve gerilerek aktive edilmiş iyon kanallarının aracılık ettiği erken elektrofizyolojik tepkileri ve ardından hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu içerdiği düşünülmektedir.

Bu mekanizmalar daha sonra osteoblast fenotipinin düzenlenmesinde yer alan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin eylemlerini ve transkripsiyon seviyelerini düzenlemek için hareket edebilir ve bu da kemik matris proteinlerini kodlayan genleri düzenler (Kirkham ve Cartmell, 2007).

### 2.4.1. Runx2

Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2, (Cbfa1 / PEBP2 $\alpha$ A / AML-3 / Osf2)), osteoblast fenotipi içindeki merkezi kontrol geni olarak kabul edilir. Çok sayıda çalışma, çok sayıda memeli organizmasının iskelet gelişimindeki önemini göstermiştir. Gendeki mutasyonların hayati ve fizyolojik sonuçları olduğu gösterilmiştir. İnaktive edici mutasyonlar, anormal iskelet oluşumu ve osteoblast gelişiminin durması ile karakterize, otozomal dominant bir durum olan Kleido Kranial Displazi (CCD) olarak bilinen duruma neden olabilir (Otto, Thornell, Crompton, Denzel, Gilmour, Rosewell vd., 1997).Cbfa1- /- farelerinin de daha yüksek bir proliferasyon oranına sahip olduğu gösterilmiştir, bu da bir büyüme düzenleyicisi olarak olası rolünü göstermektedir. Ayrıca, Cbfa1'in bir kas öncesi hücreyi bir osteoblast soyuna yeniden yönlendirme yeteneği ve adipojenik fenotipi inhibe etme yeteneği, osteoblast gelişiminde Cbfa1'in anahtar bir rolü olduğunu göstermektedir. Cbfa1 proteininin aşırı ekspresyonuna neden olan mutasyonların, iskelet kanseri gelişimi ve ektopik meme kanseri ile bağlantılı olduğu bilinmektedir.

Bu dramatik etkiler, bu genin iskelet gelişimi ve düzenlenmesindeki önemini göstermektedir. Aynı zamanda, osteoblast fenotipi içinde Cbfa1'in önemi açıkça belirlenmiş olmasına rağmen, genin osteoblasta özgü olmadığı belirtilmelidir.

Daha önceki çalışmalarda osteokalsinin Runx2 düzenlemesi daha yaygın olarak kabul edilmişti, ancak son yıllarda çok sayıda araştırma, osteoblasta özgü genlerin geniş bir spektrumunun düzenlenmesindeki rolünü göstermiştir.

Runx2 geninin düzenlenmesinden sorumlu mekanizmalar henüz anlaşılmaya başlamıştır. Daha önce, osteogenik genlerin Runx2 düzenlemesinin sadece Runx2 protein seviyeleri ve dolayısıyla mRNA seviyeleri aracılık ettiği bilinmekteydi. Bu varsayım, insan dışı (genellikle fare) modellerinden toplanan verilere dayanıyordu. Son çalışmalar, insan osteoblastlarının *in vitro* farklılaşması sırasında Runx2 seviyelerinin önemli bir değişiklik göstermediğini, buna karşılık kemik sialoprotein ve alkalin fosfataz gibi akış aşağı genlerinin seviyelerinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Veriler, Runx2 mRNA seviyelerinin, Runx2 mRNA / protein seviyeleri ile osteoblast fenotipinin edinimi arasında belirgin bir korelasyon eksikliği ile yapısal olarak ifade edildiğini göstermektedir (Kirkham ve Cartmell, 2007).

Ayrıca, Shui ve diğerleri (Shui, Spelsberg, Riggs , ve Khosla, 2003) tarafından yapılan yakın tarihli bir çalışmada, gerçek zamanlı PCR ve western blot analizleri, insan osteoblast farklılaşması sırasında Cbfa1 proteini veya mRNA seviyelerinde önemli bir artış olmadığını gösterdi. Bu, kemirgen örneklerinden elde edilen verilerle çelişmektedir ve insan Runx2'nin mRNA ve protein seviyelerindeki değişiklikler dahil olmak üzere birden fazla seviyede düzenlenebileceğini göstermektedir (Kirkham ve Cartmell, 2007).

Osteoblast hücreleri, iki ana faktöre tepki verir ve farklılaşır: belirli sinyal yollarını aktive eden kimyasal sinyaller ve fiziksel stres uygulamasıdır.

Böyle bir yol, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağının MEK hücre dışı regülekinaz (MEK / ERK) dalı olup, bu, ECM ile mekanik duyarlı hücre yüzeyi integrin etkileşimleri ve Runx2 aktivasyonu arasında bir bağlantı sağlar (Shui, Spelsberg, Riggs , ve Khosla, 2003).

### 2.4.2. Kolajen I

Kolajen I, hücre yüzey integrinleri ve diğer ECM (hücre dışı matris) proteinleri ile bağlantılar oluşturan, kemik hücre dışı matrisin önemli bir bileşenidir. Protein, çok sayıda ilgisiz hücre tipinde tanımlandığı için kemiğe özgü olarak kabul edilmediği düşünülse de diğer faktörler varlığında kemik oluşumu markörü olarak tanımlanabilmektedir. Proteinin, osteoblast fenotipinin hücre yapışmasında, çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Kolajen I geninin ekspresyonunda artış, birkaç farklı *in vitro* kuvvet uygulama yöntemine yanıt olarak gözlenmiştir ve mRNA seviyelerinin uyarımdan sonra 2 gün kadar kısa bir sürede arttığı gözlemlenmektedir. Bu nedenle protein, osteoblast fenotipi içinde önemli bir rol oynamaktadır ve osteoblastik farklılaşmanın erken bir göstergesi olarak düşünülebilir.

### 2.4.3. Osteokalsin

Osteokalsin, osteoblasta özgü birkaç genden biridir ve kemikte bulunan kolajen tip I ile birlikte en çok sentezlenen proteinlerden biridir. Hem matris sentezinde hem de mineralizasyonda gözlemlenen önemli yükselişin ile osteoblast progenitör hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Gen, birçok farklı hormona özgü çok sayıda reseptör bağlanma yerine sahip olan çok sayıda hücre içi ve osteokalsin proteininin ekspresyonunu düzenleyen çok sayıda hücre dışı faktör tarafından düzenlendiği düşünülmektedir.

Çalışmalar ayrıca, osteokalsin mRNA seviyelerinin düzenlenmesinde mekanik kuvvetin rolünü de göstermiştir. Genlerin anlatımındaki artış, kuvvet uygulamasından 1-2 gün sonra osteoblastik farklılaşma ilerledikçe sabit bir şekilde gözlemlenmiştir (Kirkham ve Cartmell, 2007).

#### 2.4.4. Osteopontin

Osteopontin, kemik, dişler, böbrekler, epitelyal primer dokuları, kan plazması ve anne sütünde tespit edilen yapışkan bir glikofosfoproteindir. Kemik ile ilgili önemli işlevleri yerine getirmesine rağmen, osteopontin kemiğe özgü olarak kabul edilemez. Ancak bu sistemle ilişkilendirilen bazı genler gibi diğer faktörlerin varlığında kemik oluşumunda görev yaptığı gözlemlenmektedir. Kemik dokusu içinde hücrede adezyon, migrasyon ve hayatta kalma gibi temel işlevleri yerine getirir. Osteopontini kodlayan gendeki mutasyonlar, tümörijenise yol açabilir.

Osteopontin proteinini kodlayan genin mekanik kuvvetlere tepki verdiği de tespit edilmiştir. Çok sayıda çalışma, *in vitro* yapay mekanik kuvvetlerin uygulanmasından sonra genin ifadesindeki artışı göstermiştir. mRNA seviyelerindeki bu önemli artış, uyarımdan sonra 9-24 saat kadar kısa bir sürede gözlemlenmiştir (Kirkham ve Cartmell, 2007).

#### 2.4.5. Alkalen fosfataz

Alkalen fosfataz (ALP) her yerde bulunan bir hücresel proteindir ve bu nedenle kemiğe özgü olarak kabul edilemez.

ALP'nin işlevi, kesin olarak tanımlanmamıştır. Çok sayıda çalışma, ALP'nin hücresel aktivitenin ve farklılaşmanın erken bir göstergesi olarak hareket edebileceğini göstermiştir.

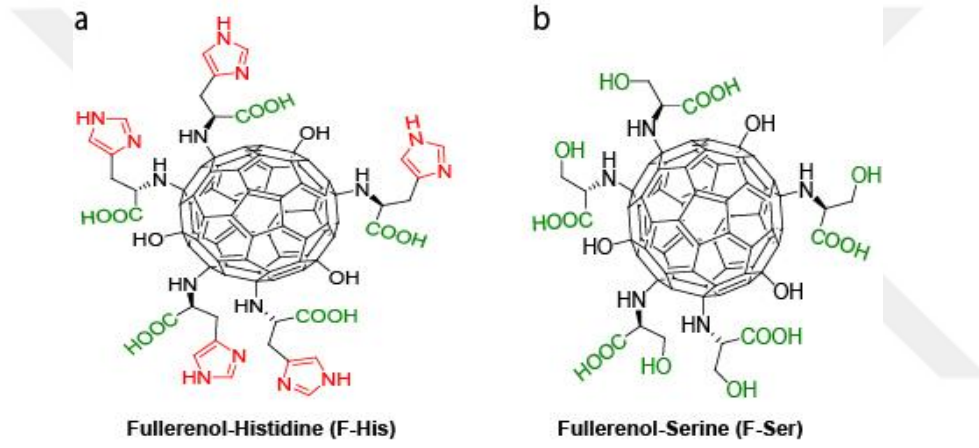
ALP mRNA seviyelerinin, osteoblastik farklılaşmanın ilerlemesiyle (14 güne kadar) sürekli artışlarla stimülasyondan 12-14 gün aralığında daha az arttığı gösterilmiştir. Çeşitli güç türleri ve *in vitro* uygulama yönteminin de bu yanıtı engellediğini gösterilmiştir (Kirkham ve Cartmell, 2007).

### 3.MATERYAL VE METOT

#### 3.1.Karbon Hibrit Yapıların Sentezi

##### 3.1.1.Fulleren Fonksiyonlandırılması:

Organik sentez yöntemi ile yüzeyi aktifleştirilen fulleren üzerine aktif gruplar (L-histidine, L-serine) eklendi. Böylelikle küresel hidrofobik yüzey hidrofilik aminoasit ile fonksiyonlandırılmıştır.

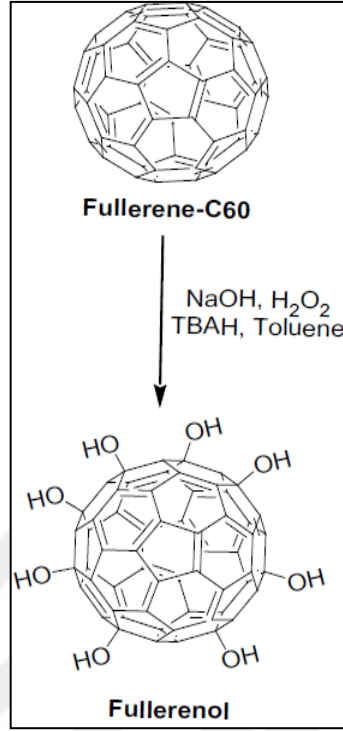


Şekil 18. a. Fullerenol-Histidin (F-His) b. Fullerenol-Serin (F-Ser) moleküllerinin ChemDraw gösterimi.

##### 3.1.2.Fullerenden Fullerenol (C<sub>60</sub>OH) Sentezi

80 mg C<sub>60</sub>, 50 mL tolüen içerisinde süspansiyon edildi ve içerisine sırasıyla 2 mL NaOH (1 g/mL), 5-6 damla %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve tetrabutil amonyum hidroksit (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>NOH (ağırlıkça %40) eklendi. Elde edilen çözelti, oda sıcaklığında 5 gün boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. Fullerenol oluşumu, hidroksil grubunun bir göstergesi olarak renklerin tolüen tabakasından sulu faza aktarılmasıyla gösterilmiştir. Organik faz uzaklaştırıldıktan sonra sentezlenen fullerenol, su fazına etanol ilavesiyle koyu kahverengi bir katı olarak çöktü. Koyu renkli katıdaki, fazla reaktifleri çıkarmak

için birkaç kez eter ile yıkandı. Hidroksil gruplarının miktarı ve oluşumu FTIR analizi ve TGA (Termal Gravimetrik Analiz) ile gösterildi. (Chaudhuri vd.2009)

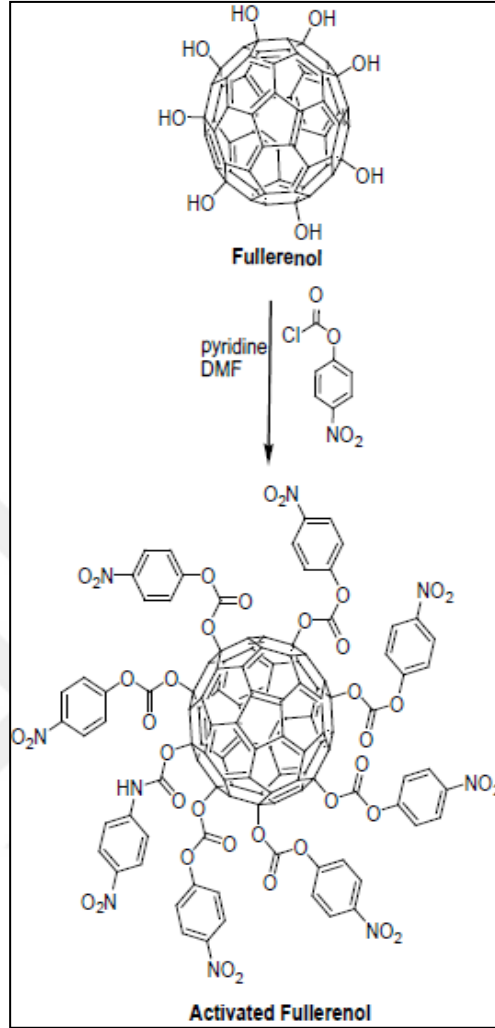


Şekil 19. Fullerenol Sentez Şeması.

### 3.1.3.Fullerenol Aktivasyonu

Asıl fonksiyonel grubun fullerene yüzeyine bağlanabilmesi için hidroksil gruplarına nitrofenil grupları bağlanarak bir sonraki reaksiyon için aktif yüzey oluşturuldu. 160 mg fullerenol, susuz dimetil formamid (DMF), (Sigma-Aldrich) içerisinde çözüldürüldü ve homojen bir süspansiyon oluşturmak için 1 saat sonike edildi. Süspansiyona, 800 mg *p*-nitrofenil kloroformat (Sigma-Aldrich), 4 mL susuz piridin ve 40 mg katalitik *N,N*-dimetil amino piridin (Sigma-Aldrich), 0 °C'de karıştırıldı. Oluşturulan karışım, homojen bir süspansiyon oluşturmak için nitrojen altında 48 saat karıştırıldı ve her 8 saatlik reaksiyondan sonra çözelti, 1 saat süreyle sonike edildi. Aktivasyon işlemiyle fulleren kısımları DMF'de çözünür hale gelmektedir. Elde edilen kahverengi katı, dietil eter ilave edilerek çökeltildi ve sırasıyla eter, diklorometan (DCM) ve izopropil alkol ile tekrardan yıkama işlemi yapıldı.

Fullerenolün aktivasyonu, proton NMR spektroskopisinde 6,9 ve 8,1 ppm'deki aromatik çiftlerin varlığı ile doğrulanmıştır (Chaudhuri vd.2009).

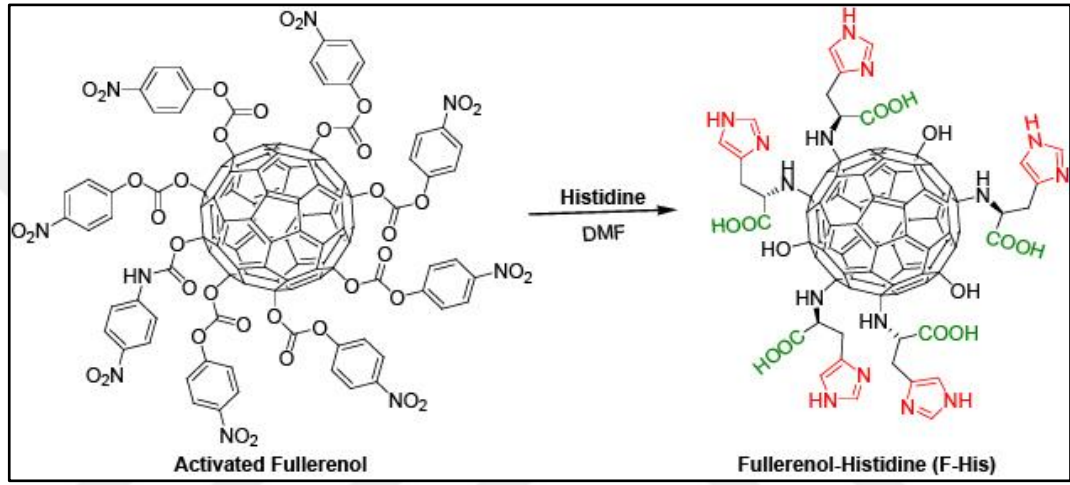


**Şekil 20.** Fullerenol Aktifleştirme Şeması.

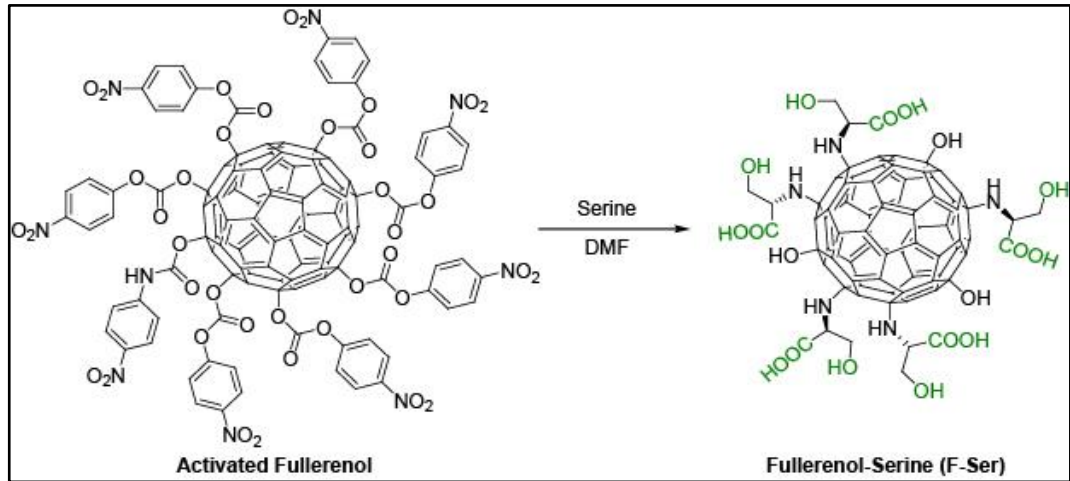
### 3.1.4. Aktif Grup Fonsiyonlandırması

Aktive edilmiş fullerenolün nitrofenil grupları ile aminoasit moleküllerinin yer değiştirme reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere, 100 mg aktive edilmiş fullerenol, susuz DMF içerisinde çözündürüldü ve çözelti, nitrojen altında 30 dakika süreyle sonike edildi. Aminoasit bağlanması için, 152 mg L-histidin veya 108 mg L-serin, oda sıcaklığında reaksiyon karışımına ilave edildi ve koyu çözelti, her 8 saatlik karıştırımdan sonra 1 saat sonikasyon ile azot altında karıştırılmaya bırakıldı. Her bir

aktif grup için aynı prosedür tekrarlandı (L-histidin, L-serin). Soğuk dietil eterin eklenmesiyle koyu bir katı halinde çökelti oluşturuldu. Elde edilen çökelti sırasıyla iki kez soğuk dietil eter ve 1-2 damla metanol içeren diklorometan ile yıkandı. Çözelti, 4 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, DCM çıkarıldı ve koyu çökelti kurutuldu. Her aktif grubun boyut dağılımını DLS yöntemi ile test edildi. Aminoasitle modifiye edilmiş fulleren türevlerinin oluşumu,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR ve FTIR spektroskopi yöntemleri (Şekil 29, 30, 31, 32, 33, 34) kullanılarak karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 21. Fullere-Histidin Konjüğü (F-His) Sentez Son Basamak.



Şekil 22. Fullere-Serin Konjüğü (F-Ser) Sentez Son Basamak.

### 3.2. Sentezlenen Karbon Hibrit Yapıların Karakterizasyonu

Sentezlenen molekül proton NMR yöntemi ile karakterize edildi. Daha sonra FTIR yöntemi ile aktif grupların fullerenile bağlarını karakterize etmek için kullanıldı. Böylelikle sentez sonucu iki farklı spektrometrik yöntem ile kanıtlanmış oldu. Oluşan parçacık büyüklükleri DLS nanopartikül büyüklüğü analizi yöntemi ile test edildi. Yüzeydeki fonksiyonlandırılmış grup sayısında TGA yöntemi ile belirlendi.

#### 3.2.1. TGA Analizi

C<sub>60</sub>OH'nin hidroksilasyon derecesi TGA yöntemi ile belirlendi. Shimadzu DTG-60H Diferansiyel Termal Termogravimetri Analizörü, N<sub>2</sub> akışı (50 mL/dk) altında 22 °C ila 900 °C sıcaklıkta 10 °C/dk ısıtma hızında analiz için kullanılarak bir fullerenol molekülünde bulunan hidroksil grubu miktarı hesaplandı. Her bir fulleren çekirdeğe bağlanan hidroksil gruplarının miktarı 26 olarak hesaplandı. 150–570 °C aralığında ağırlıkça yaklaşık %23,2 ağırlık kaybı gözlemlendi ve bu sonuç karbon kafese bağlı hidroksil bileşiklerinin ayrışmasına bağlandı. Fonksiyonel grupların bağlanması doğrulandı ve elemental analiz ile hesaplandı.

#### 3.2.2. DLS Analizi

Fonksiyonlandırılmış fullerenol moleküllerinin boyut dağılımı, 24 °C'de gerçekleştirilen dinamik ışık saçılımı (Malvern Zetasizer Nano-ZS) (DLS) ile incelenmiştir. Parçacıkların katalitik aktivitenin çalışıldığı ortamda (pH=7) parçacık boyutlarını gözlemlemek için fosfat tampon salin (PBS) içinde çözüldü. Fullerenzim yapılarının agregasyon safhasından önce tek molekülün boyutlarını hesaplamak için solüsyonlar ölçüm almadan hemen önce taze şekilde hazırlanıp, sonike edilmiştir.

### 3.2.3. FTIR Analizi

Kuru numunelerin FTIR analizi, 550-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında bir Nicolet iS10 FTIR Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. OH gruplarının oluşumu, C=O, C-H ve C-O gibi moleküllere özgü bağlar takip edilerek aktif grup modifikasyonu takip edildi. OH gruplarının oluşumu, F-Ser ve F-His 'in FTIR spektrumunda 3400  $\text{cm}^{-1}$ 'deki geniş pikten açıkça görülmüştür. F-His ve F-Ser için, karboksil gruplarının C = O gerilmesi 1715  $\text{cm}^{-1}$  civarında görüldü. Tüm fulleren türevlerinin alifatik bileşenlerine ait C-H bantları 2850-2955  $\text{cm}^{-1}$  arasında gözlemlendi ve F-His için 3004  $\text{cm}^{-1}$ 'de aromatik bir C-H germe pik vardı. F-His, F-Ser ve fullerenol'ün C-O bantları 1327-1340  $\text{cm}^{-1}$  civarında gözlenirken, F-His'in amin gruplarının NH gerilmesi 3345-3408  $\text{cm}^{-1}$ 'de aralığında görülmüştür (Şekil 34).

### 3.3. Katalitik Aktivite ve Enzim Kinetiği Analizi

#### 3.3.1. Kinetik Hesaplamalar

Hidroliz deneylerinde aktif grupla Konjüge fullerenol kombinasyonları kullanılarak (serin varlığında ve yokluğunda), 0.13 mM'lik bir stok çözeltiler hazırlandı ve PBS ile 0.005 mM'ye seyreltildi. Çözeltilerdeki fullerenzim moleküllerinin katalitik aktivitesi, DMSO içerisinde hazırlanan 100 mM *p*-nitrofenil fosfat (pNPP) substrat stok solüsyonu ile 0,5 mM ila 4 mM arasında değişen konsantrasyonlarda aktif moleküllerin tekli ve çiftli kombinasyonlarını içeren fullerenzim solüsyonları ile karıştırılarak ölçüm alınmasıyla tespit edildi. Doğal katalizde görev alan aktif grupların bir arada ve ayrı ayrı kullanılması ile grupların enzimin aktivitesi üzerindeki etkisini de açıklamış oldu. Karıştırmadan hemen sonra, SoftMax Pro yazılımı (Molecular Devices) kullanılarak bir SpectraMax M5 plaka okuyucu tarafından 410 nm'de elde edilen *p*-nitrofenol (pNP) çözeltilisinin absorbans spektrumunun toplanmasıyla kinetik ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen kataliz sonuçları Michealis-Menten hesaplamalarında kullanılarak enzim kinetiği verileri elde edildi. Katalitik dönüşüm ve bağlanma katsayısı hesaplanarak enzimin katalitik

başarısı kantitatif yöntemle test edildi ve enzim benzeri moleküllerin enzimatik aktiviteleri kanıtlanmış oldu. Reaksiyon hızları her konsantrasyon için  $18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ekstinksiyon katsayısı ile hesaplandı ve Michaelis-Menten denkleminde yerleştirildi (Şekil 3). Tampon çözeltiler içindeki substratın kendi kendine hidrolizi kontrol grupları ile belirlendi ve değerler, belirlenen mimiklerin gerçek reaksiyon hızlarını bulmak için enzim mimiklerinin reaksiyon hızlarından çıkarıldı.

### **3.3.2. Tasarlanan Enzim Mimik Yapının Yeniden Kullanılabilirlik Testi**

Enzim mimik yapıların yeniden kullanılabilirlik testi 2000 Da moleküler ağırlık sınırına sahip diyaliz membran (Merck D-2272) kullanılarak yapıldı. Tasarlanan enzim mimik yapı kullanım için hazır hale getirilen diyaliz membrana sızıntı yapmayacak şekilde yüklendi. Ardından malzeme yüklenen diyaliz membran PBS solüsyonun eklendiği cam tüplere daldırıldı. Solüsyon içerisine pNPP substratı eklendi. 1-5 ve 10. dakikalarda 410 nm’de absorbans ölçümleri alındı. Aynı tüpdeki 10. dk ölçümlerinden sonra membran substrat eklenmeyen PBS solüsyonunda bir süre bekletildi. Bu ölçümler art arda 5 kez tekrar edildi.

## **3.4. Mineralizasyon Çalışması**

### **3.4.1. Mineral Oluşumu ve Karakterizasyonu**

Cam lameller, aktif gruplar tek tek ya da ikisi bir arada olan  $4,6 \mu\text{M}$  konsantrasyondaki fulleren çözeltilerinde 200  $\mu\text{l}$  olacak şekilde kaplandı. Kaplanan yüzeyler 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Kontrol grupları olarak da hiçbir şey ile kaplanmamış cam yüzeyler kullanıldı. Sonrasında da her bir kuyucuğa 24 mM  $\text{CaCl}_2$ , 14,4 mM  $\beta$ -gliserofosfat içeren pH 7,4’teki 50 mM TRIS tampon çözeltisi ve otoklavlanmış distile su ilave edilerek mineralizasyon için 7 ve 14 gün boyunca inkübe edildi. Kalsiyum mineral birikimi sağlandıktan sonra yüzeyler su ile yıkılarak yüzeye tutunmayan mineraller uzaklaştırıldı. Yüzeyin yeterince

kurumasının ardından yüzeydeki mineraller Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-Işını Analizi (SEM/EDX) ile karakterize edildi.

Mineralizasyon miktarının belirlenmesi için, yukarıda verilen prosedüre göre hazırlanan yüzeyler suyla yıkandı ve 40 dakika Alizarin Kırmızısı ile boyandı. Alizarin Kırmızısı ile boyanan kalsiyum miktarı oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 10 mM sodyum fosfat tamponu içinde çözülen %10 (w/v) setilpiridinyum klorit kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen kalsiyum miktarı mikropilaka okuyucusu tarafından 550 nm absorbandsdaki alınan ölçüm miktarı ve absorbanların grafik denklemi üzerinden hesaplamalar yapılarak belirlendi.

### **3.5.Biyoaktivite Analizi**

Bu bölümde de araştırmamızın rejeneratif uygulamalara uygunluğunun kanıtlanması açısından *in vitro* deneylerin detaylandırılacağı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar klinik kullanım öncesi gerekli ve malzemenin biyolojik kapasitesi konusunda bilgi sağlayıcı olacaktır.

#### **3.5.1. SaOS-2 Osteoprogenitör ve BM-MSK Hücrelerinin Kültürü**

SaOS-2 (ATCC® HTB-85™) ve BM-MSK hücreleri, fullerenzim kaplı kültür yüzeyleri üzerinde *in vitro* hücre kültürü deneyleri için kullanıldı. SaOS-2 ve BM-MSK hücreleri %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ile takviye edilmiş düşük glikoz oranına sahip Dulbecco Modifiye Besiyeri (DMEM) kullanılarak %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C ve %21 O<sub>2</sub> ile beslenen CO<sub>2</sub> inkübatöründe 75 cm<sup>2</sup> hücre kültürü şişelerinde kültürlendi ve büyütüldü.

### 3.5.2. Biyouyumluluk

Fulleren türevlerinin biyouyumluluğu Alamar Mavi metabolik aktivite takibi yöntemi ile analiz edildi. Moleküllerin hücreler üzerinde toksik etkisinin olup olmadığı bu deneyler ile belirlendi. Hücrelerin canlılık testleri, Alamar Mavi boyaması ile belli aralıklarla yapıldı (1., 2. ve 7. gün). Bu amaçla,  $1 \times 10^4$  hücre /  $\text{cm}^2$  yoğunluğunda hücre 96 kuyucuklu hücre tabakaları üzerinde inkübe edildi ve besiyeri içerisine yapay katalist olarak tasarlanan enzim mimik yapılar farklı konsantrasyonlarda verildi. İnkübasyon sürelerinden (1., 2. ve 7. gün) sonra, kültür ortamı kaldırılıp; hücreler PBS ile yıkandı ve %10 oranında serumsuz kültür ortamı içerisindeki Alamar Mavisi ile 3 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. 3 saatte hücrelerdeki renk değişimi takip edildi. Renk değişimi gözlemlendikten sonra, mikropilaya okuyucuda 560 nm eksitasyon, 590 nm emisyon dalga boyunda floresans ölçüm alındı. Elde edilen ölçümler grafiğe geçirilerek uygulanan malzemelerin kontrole göre oranlaması yapılarak hücre üzerindeki biyouyumluluk miktarları belirlendi.

### 3.5.3. SaOS-2 Osteoprogenitör ve BM-MSK Hücrelerinin *in vitro* 2D Biyomineralizasyon Çalışması

SaOS-2 ve BM-MSK hücreleri ile biyomineralizasyon ve kalsiyum fosfat testleri fulleren nanopartikül kaplı 24 kuyucuklu plakalar üzerine hücrelerin ekimi ile gerçekleştirildi. Kaplamalar mineralizasyon çalışmalarındaki gibi kaplandı daha sonra bir gece boyunca laminar akışlı kabinde kuruması için bekletildi. Yüzey kaplama yapılmış cam lamellerin bulunduğu her kuyuya hücrelerin direkt malzemeyle temas etmesini engellemek amacıyla 250  $\mu\text{l}$  hücresiz kültür ortamı eklendi ve üzerine kuyudaki kültür ortamı miktarını 2 ml'ye tamamlayacak şekilde SaOS-2 hücreleri için  $5,5 \times 10^4$  hücre standart kültür ortamı ve osteogenik kültür ortamı (1,68 mM  $\beta$ -gliserofosfat, 0,2 mM askorbik asit ve 50 nM deksametazon) ile desteklenerek ekildi. BM-MSK'ler için  $8 \times 10^4$  hücre standart kültür ortamı ve osteogenik kültür ortamı (1,68 mM  $\beta$ -gliserofosfat, 0,2 mM askorbik asit ve 50 nM deksametazon) ile desteklenerek ekildi ve bir günlük inkübasyondan sonra solüsyon

olarak fulleren nanopartiküller uygulandı. Yüzeylerdeki kalsiyum birikimi ve farklılaşmış osteoblast görüntüleri Alizarin Kırmızısı ile boyanarak SaOS-2 hücreleri için 3.,7. ve 12. günlerde, BM-MSC ler için 7. ve 14. günlerde görüntülenmiştir. Görüntüleme ardından yapılan bazı deneyler için ortamda oluşan Ca miktarını tayini için setil piridinyum klorit çözeltisi ile kantifikasyon sağlanmıştır.

#### **3.5.4. SaOS-2 Hücreleri ve BM-MSC Hücrelerinin Yüzeyinde Kalsiyum Fosfat Birikiminin Alizarin Kırmızı Yöntemi ile Mikroskop Görüntüleme ve Kantifikasyon ile Tayini**

Hücre yüzeyindeki kalsiyum birikimi hücrelerin osteoblasta başkalaşmasının en önemli göstergelerinden biridir ve kemiğin yapı taşlarını oluşturur. Ortamda kalsiyum ve fosfat iyonlarının artması bu sürecin devamını sağlamasının yanında, önemli bir destek olarak da görev yapar. Dönüşüm sürecinin başlangıcında sentezlenen alkalin fosfataz proteini fosfat iyonunun ortamda artmasını sağlamaktadır. Cam lamellere kaplamasını yaptığımız fullerenzimler tıpkı doğal ALP deki gibi inorganik iyon artışını destekleyerek, hücrelerin kemik hücrelerine dönüşümünü sağlayan gen bazındaki yolakların ve mekanizmaların açılmasını hızlandırmaktadır. Osteoblasta dönüşen hücrelerin mineral biriktirme becerilerini test etmek amacıyla Alizarin Kırmızısı boyaması yapıldı. Alizarin Kırmızısı  $Ca^{+2}$  iyonunu şelatlar ve bu boyama mineralizasyon için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SaOS-2 ve BM-MSC hücreleri standart kültür ortamı, osteogenik kültür ortamı ( $\beta$ -gliserofosfat-askorbik asit-deksametazon) ile veya osteogenik olmayan sadece  $\beta$ -gliserofosfat içeren kültür ortamı içinde inkübe edilecek ve alkalin fosfataz benzeri nano yapılar hücrelere uygulandığında kalsiyum fosfat depozisyonuna bağlı olarak mineralize kemik benzeri nodüllerin oluşumu beklenmektedir. Hücrelerin ve nodüllerin kırmızıya boyanması hücreler üzerindeki kalsiyum birikimini ifade etmektedir.

Yukarıdaki 2D biyo-mineralizasyon yönteminde anlatıldığı gibi hücre ekimi yapıldıktan SaOS-2 hücreleri için 3., 7. ve 12. günlerde, BM-MSC hücreleri için 7. ve 14. günlerde hücrelere boyama yapabilmek için yüzeydeki kültür ortamı uzaklaştırıldı. Yüzeydeki kirliliklerden kurtulmak için 150-200  $\mu$ l PBS ile yıkandı.

Ardından yüzey üzerindeki hücreler 4 °C soğuk saf etanolde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca muamele edilerek yüzeye sabitlendi. Ardından mikropilaka 2500 rpm de 3dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında plaka içerisindeki etanol boşaltıldı ve 15 dakika boyunca etanolün yüzeyden uçması için beklenildi. Sabitleme işleminden sonra hücrelerin üzerine 40 mM Alizarin Kırmızı boyası eklendi ve yüzeyde biriktiği düşünülen Ca mineral oluşumlarının boyanması için 30-40 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Boyama işleminden sonra tekrar 2500 rpmde 3 dk santrifüj yapıldı. Yüzeydeki boya ortamdan uzaklaştırıldı. Spesifik olmayan Alizarin-Kırmızısı boyamalarını gidermek için 4-5 kez çift damıtılmış su ile yıkama yapıldı. Hücre yüzeyinde oluşan mineralizasyonu gözlemek için ters ışık mikroskopunda görüntü alındı.

Görüntüleme tamamlandıktan sonra bazı deneylerde ortamdaki kalsiyum konsantrasyonunun tayini için Alizarin Kırmızısına bağlı kalsiyumun ekstraksiyonu, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 10 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde çözülmüş %10 (w/v) setil piridinyum klorit kullanılarak gerçekleştirildi. Alizarin-Kırmızısına bağlı kalsiyum konsantrasyonu 550 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi.

### **3.5.5. BM-MSK Hücrelerinin Yüzeyindeki Osteoblast Hücre Oluşumunun Akridin Turuncusu Boyama Yöntemi İle Floresan Mikroskopta Gözlemlenmesi**

BM-MSK ler Alizarin Kırmızısı boyaması dışında floresans bir boya aracılığıyla bir görüntüleme gerçekleştirildi. Oluşan mineralizasyon kümelerinin floresan görüntülenmesi için farklılaşmış hücreler, 30 dakika boyunca soğuk saf etanol ile yüzeye sabitlendi. Fiksasyonun ardından hücreler 30 dakika 1µg/mL akridin turuncusu ile boyandı. Spesifik olmayan boyamalarını gidermek için 1-2 kez çift PBS ile yıkama yapıldı ve karanlık ortamda kurumaya bırakıldı. Floresanla boyanmış hücrelerde ortamdaki mineralizasyon kümeleri, Zeiss Axio Observer Floresan Mikroskobu kullanılarak 475 nm eksitasyon ve 555 nm emisyon dalga boyunda floresans ışık altında görselleştirildi.

### 3.5.6. Gen Ekspresyon Analizi ile Kantifikasyonu:

SaOS-2 hücreleri  $5,5 \times 10^4$  yoğunlukta yüzey kaplama yapılmış cam lamellerin yerleştirildiği 24 kuyucuklu plakalara düşük glikoz DMEM ile ekildi. BM-MSC hücreleri  $8 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 24 kuyucuklu plakalara düşük glikozlu DMEM ile ekildi. Fullerenzim yapılar, hücreler morfoloji almaya başladıklarında sıvı formda ekimin yapıldığı besiyerlerinin içerisine uygulandı. Toplam mRNA, RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak izole edildi. Saflaştırılan mRNA'nın verimi ve saflığı Nanodrop 2000 (Thermoscientific) ile değerlendirildi. Runx2 ve Kollajen-1 (COL I) gibi osteoblast dönüşümünün erken ifadecisi olan genlerin analizleri yapılarak osteoblast farklılaşması süreci incelendi. Runx2 nun hücrelerin kemik hücrelerine transformasyonunun erken markörü olması sebebi ile ilk günlerde gözlenecek artış, SaOS-2 hücrelerinin osteoblast hücrelerine dönüşmeye başladığı anlamına gelmektedir. Osteoblastların olgunlaşmaya doğru gittiği ileriki aşamalarda bu markörlerin ifadesinin azalması ve yahut sabit kalması beklenmektedir. Aynı şekilde COL I ekspresyonunun da artışı kontrol gruplarına göre karşılaştırmalı olarak takip edildi. Hücrelerde COL I birikimi kemik oluşumu için önemli bir parametredir. Bu yüzden kolajen ifadesinin artışında istatistiksel farklar ile gözlemlenmesi önemli bir sonuçtur. Bu markörler sayesinde tasarlanan yeni moleküllerin kemik oluşumu sırasındaki etkileri gözlemlendi. Çalışmayı daha da detaylandırmak adına primer türlerinin artırılması mümkündür.

**Tablo 3.** Primer Sekansları.

Primerler	İleri Primer	Geri Primer
Runx-2	TCTGGCCTTCCACTCTCAGT	GACTGGCGGGGTGTAAGTAA
COL-I	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG	AGATCACGTCATCGCACAAAC
Gapdh	TCCCATCACCATCTTCCAGG	CCATCACGCCACAGTTTCC

Primer dizileri literatürden seçilmiştir. RNA'dan cDNA sentezi ve qRT-PCR üreticinin talimatlarına göre Tek Adımlı qRT-PCR Kiti (Takara) kullanılarak gerçekleştirildi. Primer gen ekspresyon sonuçları, ekspresyon verilerinin analizi için

GAPDH ekspresyon seviyesine normalize edildi. Sonuçları analiz etmek için karşılaştırmalı bir döngü eşiği yöntemi kullanıldı.

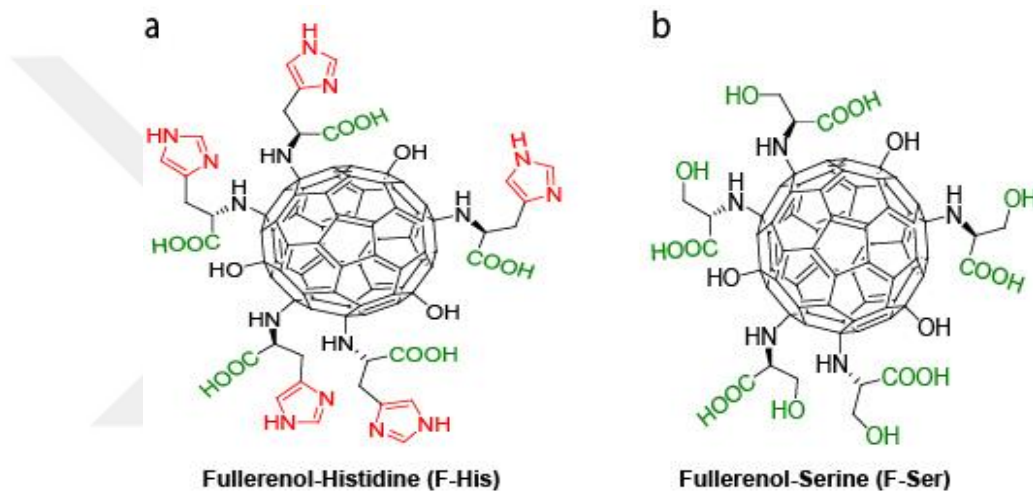
### 3.6. İstatiksel Analiz

Tüm deneyler malzeme uygulanan gruplar veya kontrol grubu için her bağımsız deneyde en az dört tekrar yapıldı. Tüm niceliksel sonuçlar ortalama  $\pm$  standart ortalama hatası (SEM) olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Anlamli farklar P değeri ile değerlendirildi; farklılıklar  $P < 0.05$ 'te istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  olarak değerlendirildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının Sentezlenme Sonrası Yapısı

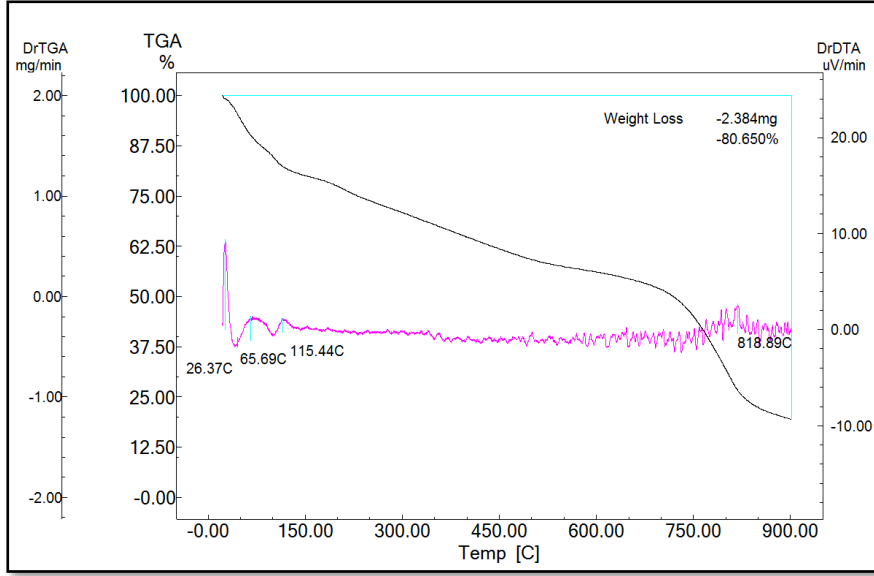
Fulleren-histidin (F-His) ve fulleren-serin (F-Ser) fullerenzim nanoyapıları fulleren üzerine enzim benzeri aktiviteyi gerçekleştirmek üzere amino asitlerin konumlandırılması vasıtası ile tasarlandı (Şekil 23). Fulleren nano yapıların sulu ortamda nanokümeleşmesi vasıtası ile aktif grupların arasındaki etkileşimlerin artırılması hedeflenmiştir.



Şekil 23. a) F-His b) F-Ser moleküllerinin yapısal gösterimi.

### 4.2. Fullerenolün Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ile Karakterize Edilmesi

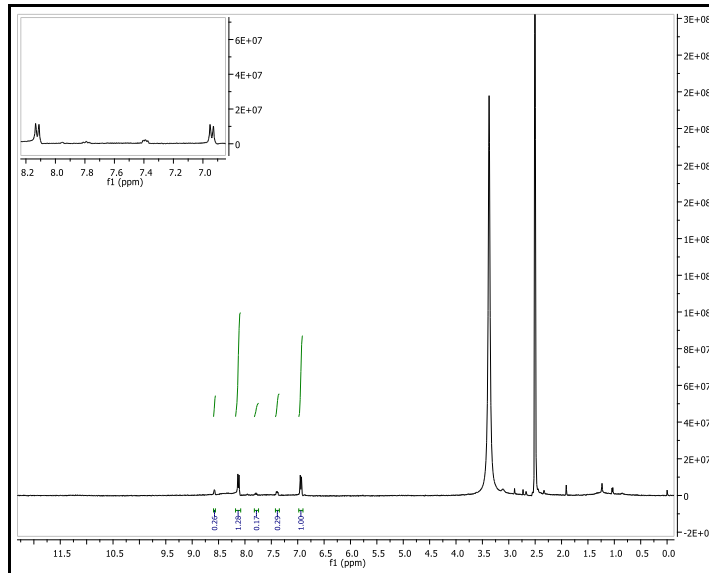
Sentezlenen fullerenol üzerindeki hidroksil grubu sayısı TGA analizi Shimadzu DTG-60H analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 24). 150-570 °C arasında OH gruplarının çıkarılmasına karşılık gelen ağırlık kaybı yüzdesi ve 570-900 °C arasında fullerenin yapısal bozunmasına karşılık gelen pluschar verimi, fullerenol moleküllerine bağlı OH gruplarının sayısını belirlemek için kullanıldı. 150-570 °C arasındaki ve 570 °C' nin üzerindeki ağırlık kaybı, Fullerenol'ün TGA termogramından sırasıyla %23,2 ve %37,4 olarak hesaplandı. Daha sonra fulleren başına OH grubu sayısı  $(720 / 37,4) \times (23,2 / 17) \approx 26$  olarak hesaplandı.



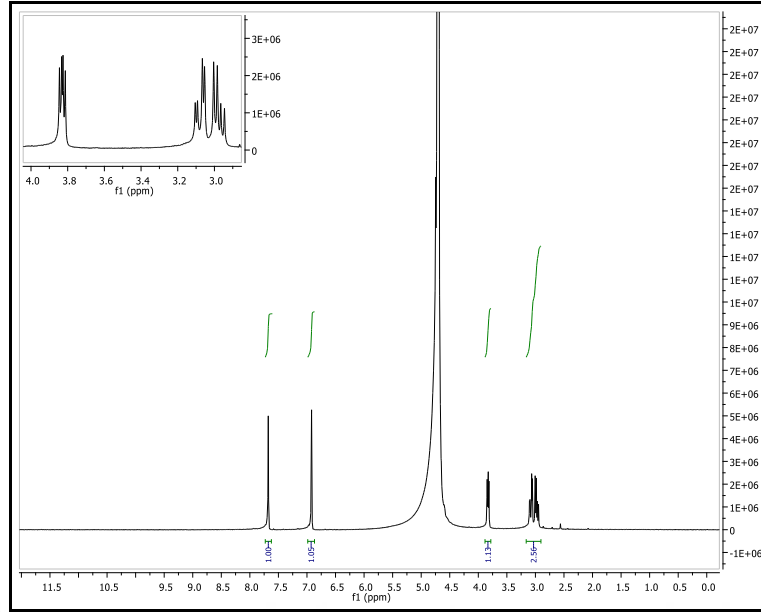
Şekil 24. Fullerenolün Termal Gravimetri Analizi Grafiği.

#### 4.3. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının NMR Analizi

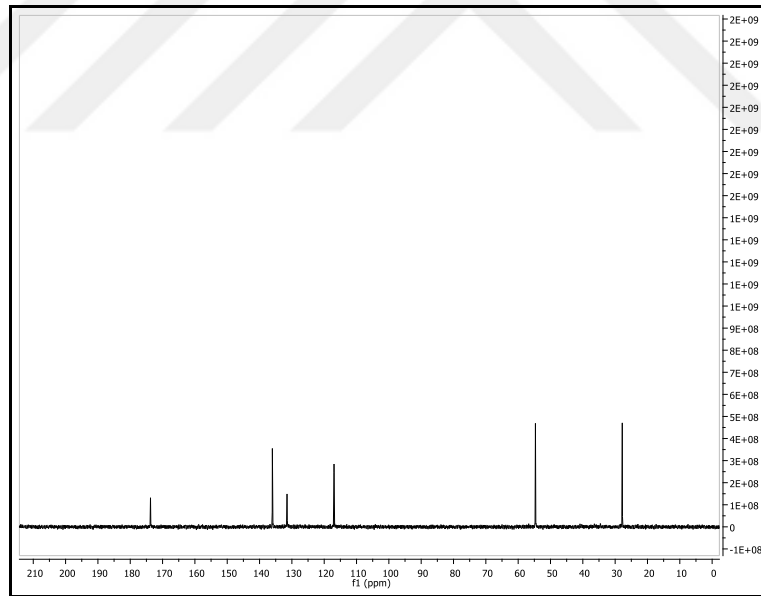
Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) analizleri için Bruker Spectrospin Advanced DPX 400 Spektrometresi kullanılmıştır. Fullerene üzerine konumlandırılan aktif gruplara ve aminoasitlere özgü NMR sinyalleri bu yöntem ile tespit edilerek, hedef moleküllerin sentezi kanıtlanmıştır.



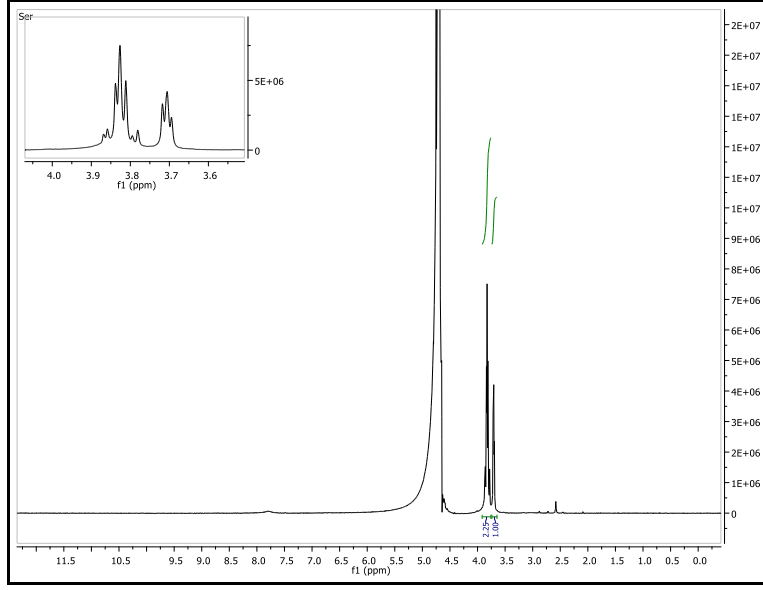
Şekil 25. Aktive edilmiş fullereneolün  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.12(d, 2H,  $J = 9.1$  Hz), 6.94 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz).



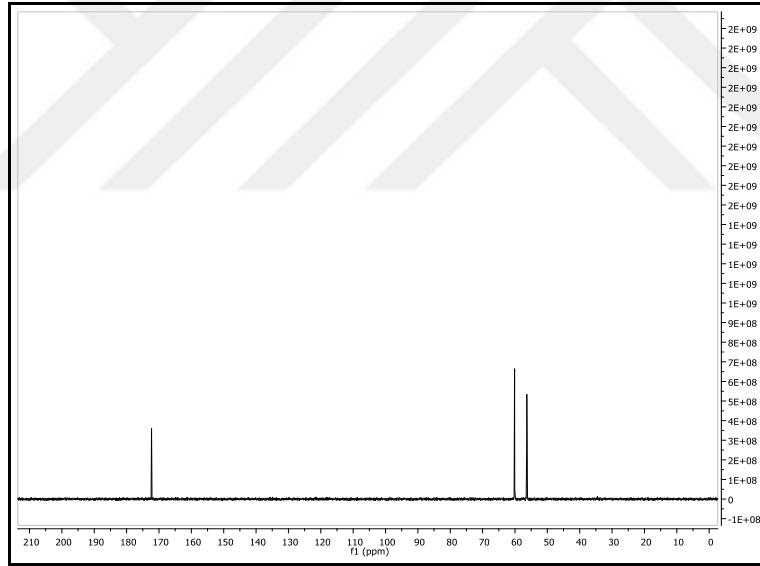
**Şekil 26.** F-His  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).  $\delta$  7.68 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.83 (dd, 1H,  $J = 7.9, 4.9$  Hz), 3.08 (dd, 1H,  $J = 15.5, 4.8$  Hz), 2.97 (dd, 1H,  $J = 15.5, 7.9$  Hz).



**Şekil 27.** F-His  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  174.7, 136.0, 131.50, 117.0, 54.7, 27.8.



**Şekil 28.** F-Ser  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.85 (dd, 1H,  $J = 12.3, 4.0$  Hz), 3.80 (dd, 1H,  $J = 12.2, 5.6$  Hz), 3.75 (dd, 1H,  $J = 5.3, 4.1$  Hz).



**Şekil 29.** F-Ser  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  172.3, 60.1, 56.3.

$^1\text{H}$ -NMR karakterizasyonları ile fulleren üzerindeki aminoasitlerin hidrojen atomlarına özgü çiftleşme sabitleri takip edilerek malzemelerin sentezi kanıtlandı. Benzer bir şekilde  $^{13}\text{C}$ -NMR kullanılarak hedef moleküllerde görülmesi beklenen çiftleşme sabitleri gösterilerek analiz desteklenmiştir.

#### 4.4. Fulleren-Aminoasit Konjüгатlarının Elemental Analizi

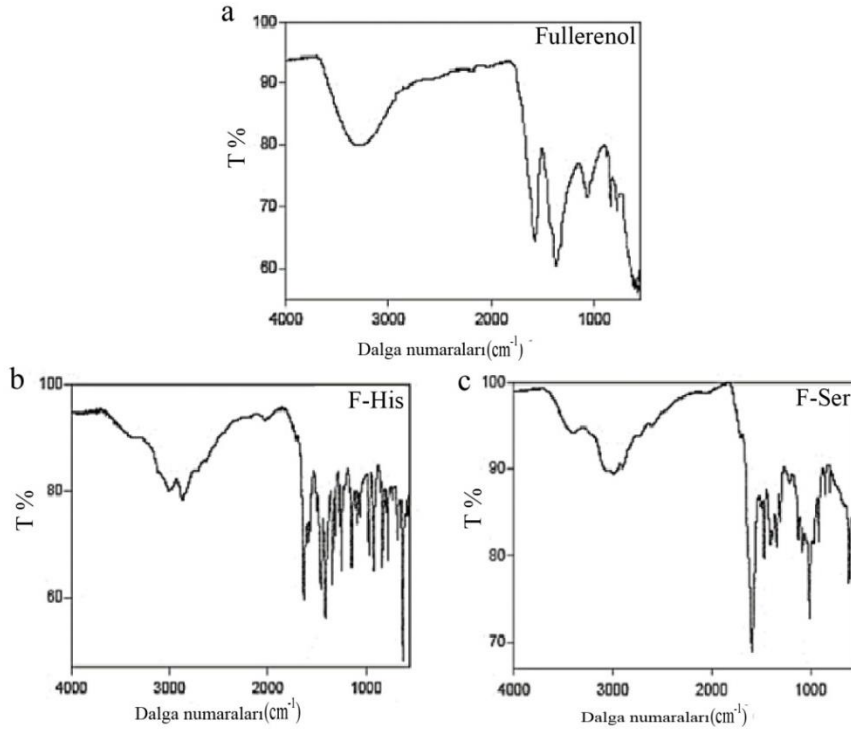
Katı fulleren örnekleri element analizi için kullanıldı. Fonksiyonel grupların sayısı nitrojen yüzdesi kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tabloda verildiği gibidir.

**Tablo 4.** Fullerenol Türevlerinin Elemental Analizi.

Fullerenol Konjüгатı	%N	Aktif Grup #
F-His	14.32	7
F-Ser	12.19	8

#### 4.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Grafikleri

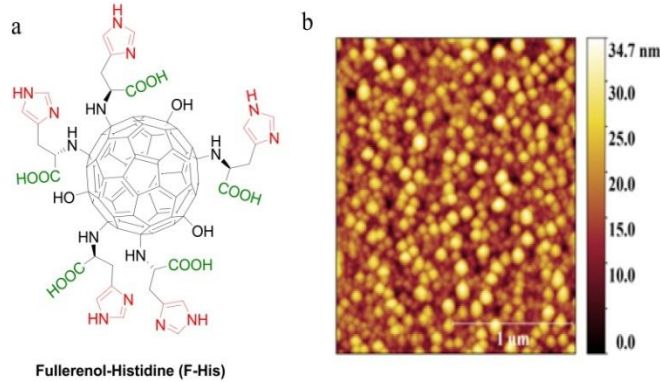
Kuru numunelerin FTIR analizi, 550-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında bir Nicolet iS10 FTIR Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. OH gruplarının, C=O, C-H ve C-O bantları gibi aminoasitlere özgü bantlar takip edilmiş ve aktif grup modifikasyonu gösterilmiştir. Fullerenol ve F-Ser moleküllerindeki hidroksil grupları 3400  $\text{cm}^{-1}$  deki geniş bant ile karakterize edilmiştir. 1560  $\text{cm}^{-1}$  de fullerene ait C=C soğurma bandı her örnek için gösterilmiştir.



**Şekil 30.** a) Fullerenol b) F-His c) F-Ser fonksiyonlandırılmış nanopartiküllerin FTIR analiz grafiği.

#### 4.6. Fulleren-Aminoasit Konjüгатının Atomik Güç Mikroskobu (AFM) Görüntüsü

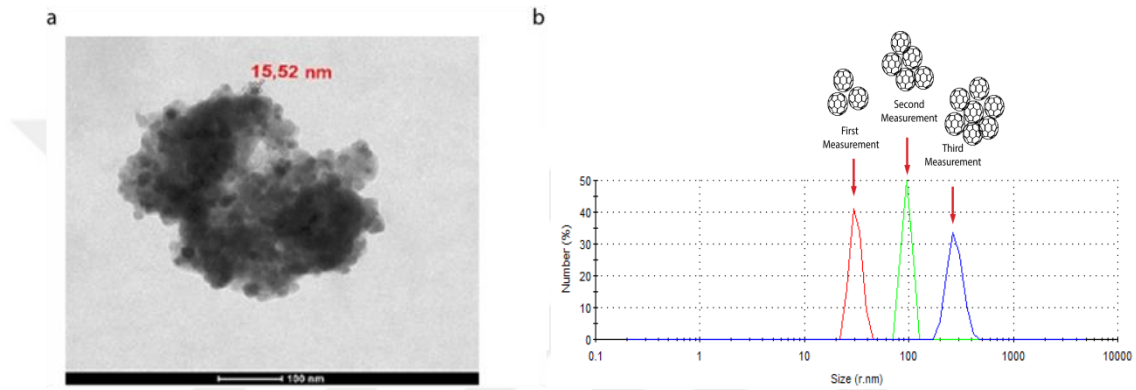
Çalışmamızda kullanılacak olan nanokatalistler, AFM hazırlık aşamasında yüzeye kaplanıp silikon yüzey üzerinde kurumaya bırakıldığı için agregatlar halinde gözlemlendi. Kaplanan yüzey üzerindeki tek tek dağılım gösteren fulleren molekülleri AFM görüntüsü ile gösterilmiştir (Şekil 31).



**Şekil 31.** a) F-His Konjüгатı b) F-His kaplanmış yüzeyin tek tek fulleren moleküllerini gösteren AFM görüntüsü.

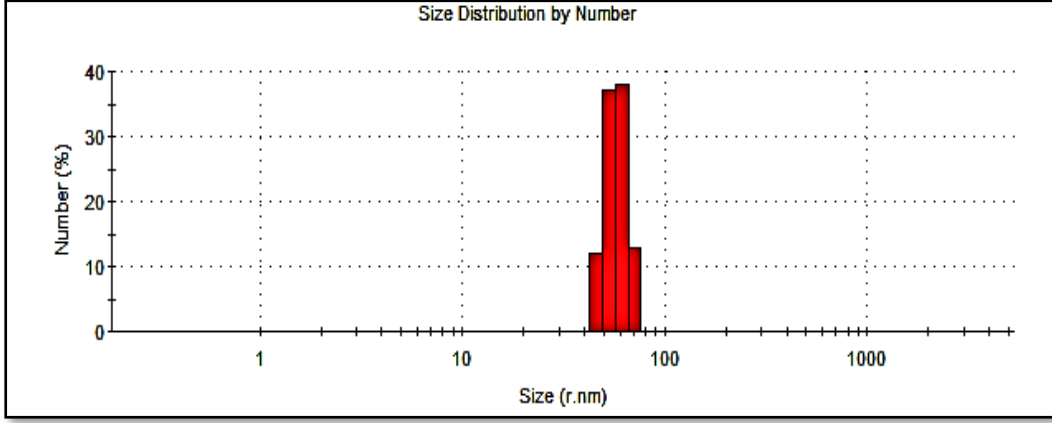
#### 4.7. Fullerene-Aminoasit Konjüгатının Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülenmesi ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Sonuçları

Seyreltilmiş numuneler Lacey ultra ince karbon kaplı bakır gridler üzerine alınmış, organik numuneler %2'lik uranil asetat ile 5 dakika boyanmıştır. Bir gece kurumaya bırakılan numuneler, kurutmanın ardından FEI Tecnai G2 F30 marka Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 32-a).

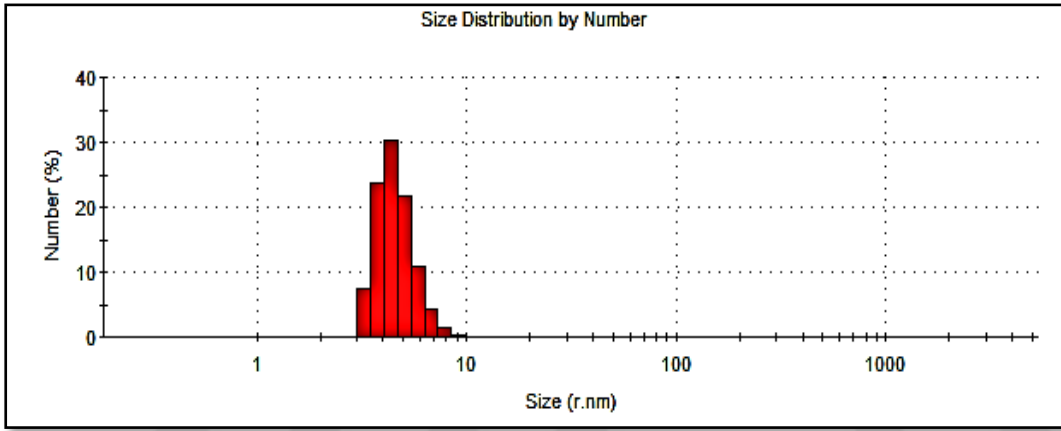


Şekil 32. a) F-His'nin TEM görüntüsü b) F-His nin arka arkaya alınmış 3 DLS ölçümü.

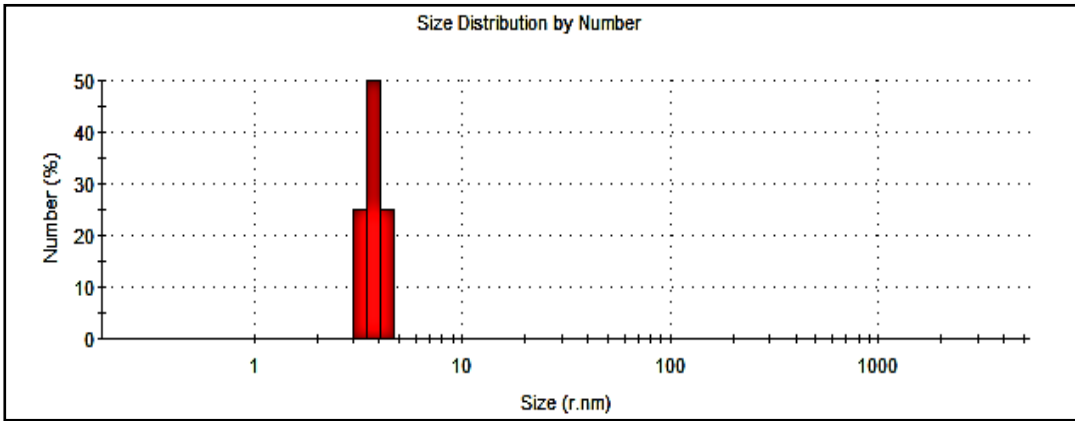
Tek nanopartikül boyutlarını ölçmek üzere, fonksiyonlandırılmış fulleren içeren solüsyonlar zamanla moleküller arasında oluşan agregasyonu kırmak için yüksek ultrasonik güç ile sonike edildi. Fonksiyonlandırılmamış fullerenol, kontrol olarak kullanıldı ve bu başlangıç molekülünün partikül boyutu, <2 nm olarak ölçüldü. DLS okumaları, fonksiyonlandırılmış fullerenol türevlerinin, 5-10 nm aralığında partikül boyutlarına sahip olduğunu gözlemlendi. Şekil 32-b de gösterildiği gibi sonikatör etkisinin zamanla ortadan kalkmasıyla moleküllerin agregatlar oluşturup daha büyük boyutlarda partiküller oluşturduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 33. Fullerenolün DLS ölçümleri sonucunda elde edilen parçacık boyutu.



Şekil 34. F-His'in DLS ölçümleri sonucunda elde edilen parçacık boyutu.



Şekil 35. F-Ser'in DLS ölçümleri sonucunda elde edilen parçacık boyutu.

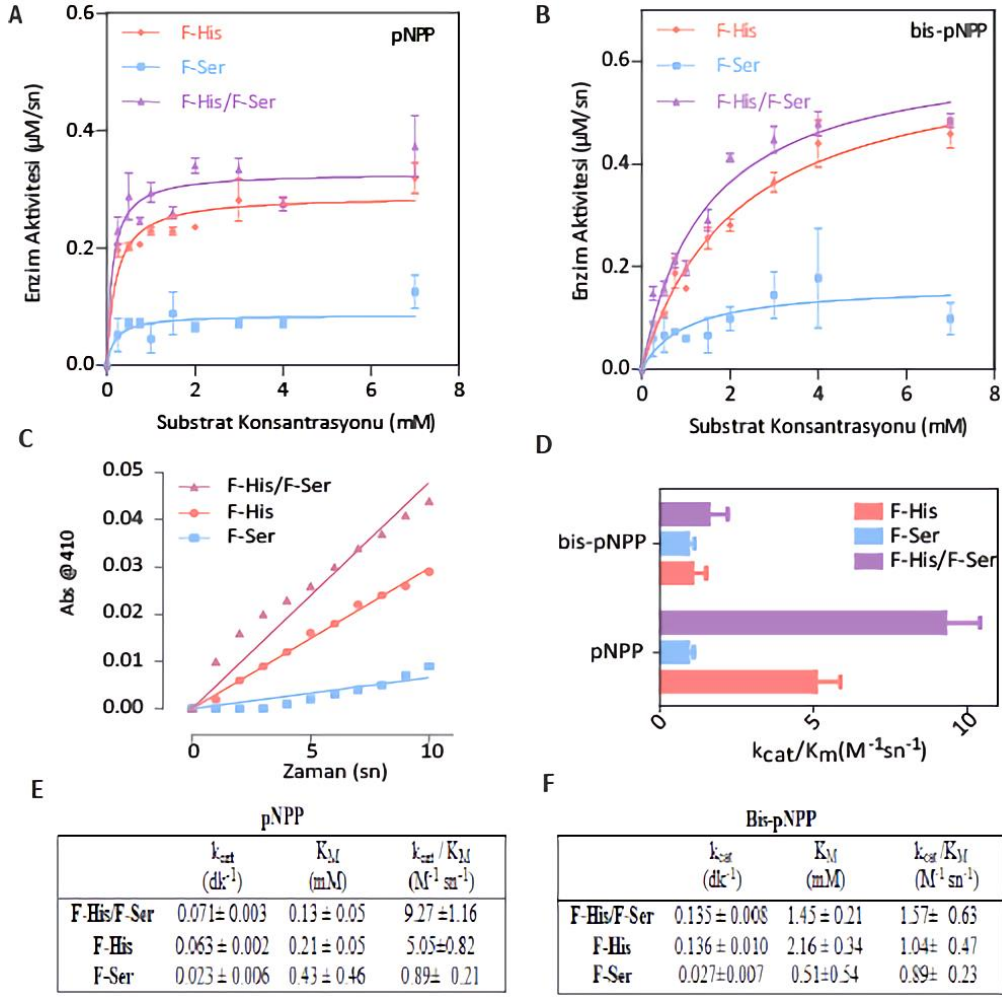
**Tablo 5.** Fullerenzim Türevlerinin DLS Boyut Dağılım Sonuçları.

Molekül	Büyüklik (d.nm)	% Yüzde
<b>F-His</b>	4.53	100
<b>F-Ser</b>	3.79	100

#### **4.8. Katalitik Aktivite ve Enzim Kinetiği Analizi**

##### **4.8.1 Enzim Kinetiği Deneyleri**

Hidroliz deneylerinde aktif grupların kombinasyonları kullanılarak (serin varlığında ve yokluğunda) fulleren moleküllerinin katalitik aktivitesi p-nitrofenil fosfat ve bis-para nitrofenil fosfat substratları ile tespit edilmiştir. Doğal katalizde görev alan histidin ve serin gruplarının kataliz üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen kataliz sonuçları Michealis-Menten hesaplamalarında kullanılarak enzim kinetiği verileri elde edilmiştir. Katalitik dönüşüm ve bağlanma katsayısı hesaplanarak enzimin katalitik başarısı kantitatif yöntemle test edilmiş ve enzim benzeri moleküllerin enzimatik aktiviteleri Şekil 36' te verilmiştir.



**Şekil 36.** Enzim kinetiği hesaplamaları. Tasarlanan enzim mimikleri varlığında alınan ölçümlerden çizilen Michaelis Menten grafikleri a) pNPP, b) bis-pNPP, c) 2 mM pNPP'nin zamana bağlı enzimatik hidrolizi, d) Tasarlanan enzim mimiklerin katalitik etkinliklerinin karşılaştırmalı analizi, e) Tasarlanan enzim mimiklerin pNPP üzerindeki  $k_{cat}$ ,  $K_M$  ve katalitik verimliliklerinin hesap tablosu f) Tasarlanan enzim mimiklerin Bis-pNPP üzerindeki  $k_{cat}$ ,  $K_M$  ve katalitik verimliliklerinin hesap tablosu.

Fulleren konjüгатlarının çözeltileri hazırlandıktan sonra PBS kullanılarak son konsantrasyonlarına seyreltilmiştir. TRIS tampon çözelti içinde 100 mM lık *p*-nitrofenil fosfat (pNPP) substrat stok çözeltisi hazırlanmasının ardından, katalistler (50 nM) 200 μl tampon çözelti (Tris pH=9,0) içinde çözülmüştür. Bu çözeltiler üzerine belirlenen substrat konsantrasyonları eklenerek, yapay katalistler ile etkileşimi karşılaştırılmıştır. Substrat konsantrasyonu daha önceki çalışmalardan yola çıkarak belirlenmiştir (Gulseren vd., 2015). Karıştırmanın hemen ardından, mikropilaka okuyucusu ile 410 nm'de kinetik reaksiyon sonrasında ortaya çıkan *p*-nitrofenolat (pNP) molekülünün absorbans spektrumunun toplanmasıyla kinetik

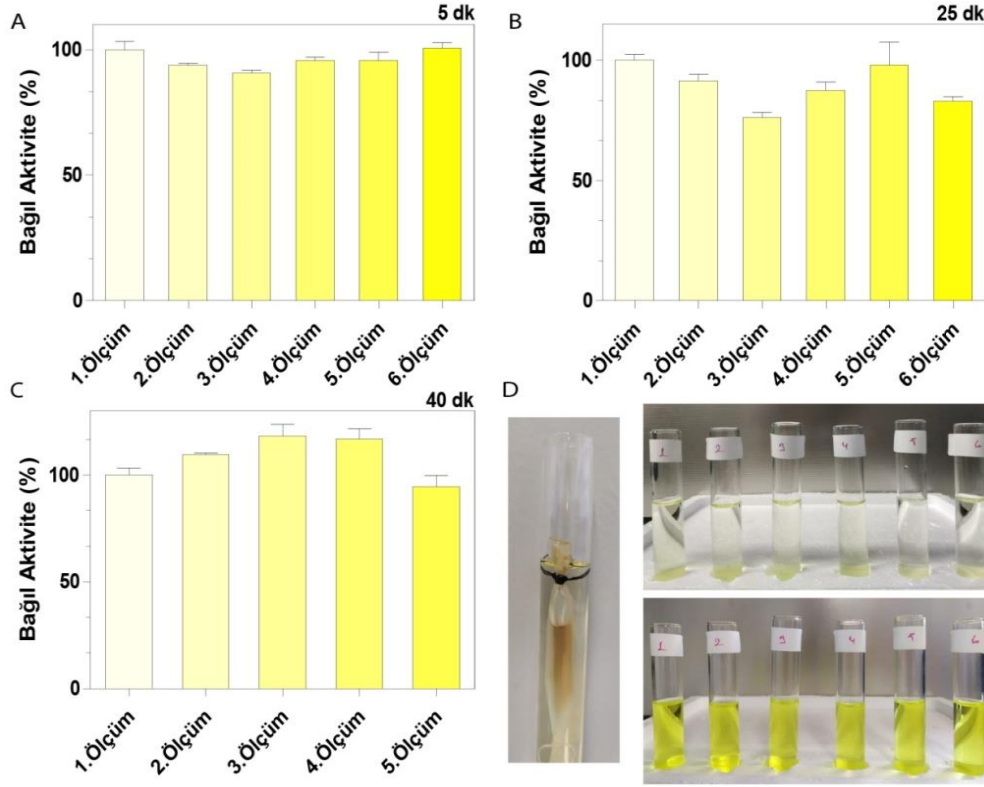
ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ekstinksiyon katsayısı literatürden alınarak  $18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  değeri hesaplamalarda kullanılmıştır. Absorbans okumalarından elde edilen değerler katalitik aktivite parametreleri (hız, katalitik dönüşüm katsayısı ve bağlanma sabiti Michaelis-Menten denklemi kullanılarak grafikleri çizdirilen grafiklerden hesaplanmıştır ( $v_0 = k_{cat} [E]_0 [S]_0 / (K_M + [S]_0)$ )).

#### 4.8.2. Tasarlanan Enzim Mimik Yapının Yeniden Kullanılabilirlik Deneyleri

Yeniden kullanılabilirlik, enzimler için kritik bir özelliktir. Tasarladığımız fulleren bazlı enzim mimiklerinin yeniden kullanılabilirliği bir diyaliz membran kataliz modeli kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 37). Bu amaçla enzim mimikleri bir diyaliz membrana yüklenerek ve yapay katalizörlerin yeniden kullanılabilirliği, katalist yüklü torbaların substrat içeren solüsyonlara daldırılmasıyla test edildi.

Yapılan deneyler sonucunda 1 dakikalık ölçüm aralığı ile kaydedilen analiz sonuçlarında altı ölçüm arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. 5 dakikalık ölçümlerde 4. ölçüme kadar belirgin bir düşüş gözlemlenirken, 4 ve 5. ölçümlerde bir yükselme gözlemlenmiştir. 6. ölçümde düşüş gözlemlenmeye başlamıştır. 10 dakikalık ölçümler en tutarlı sonuç veren analiz olmuştur. İlk 4 ölçüm de bağlı aktivitenin artışı gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar tasarlanan enzim mimik yapının bir enzim gibi davranarak ortamdaki substratı tekrar tekrar hidrolize edebildiğini göstermektedir.

Beş döngü yeniden kullanımdan sonra, enzim mimiklerinin varlığında pNP veriminde yaklaşık %20'lik bir iyileşme elde edildi. Tasarlanan enzim mimik yapı sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda en az beş döngü için tam kapasite olarak yeniden kullanılabilir olduğu gözlemlenmektedir.



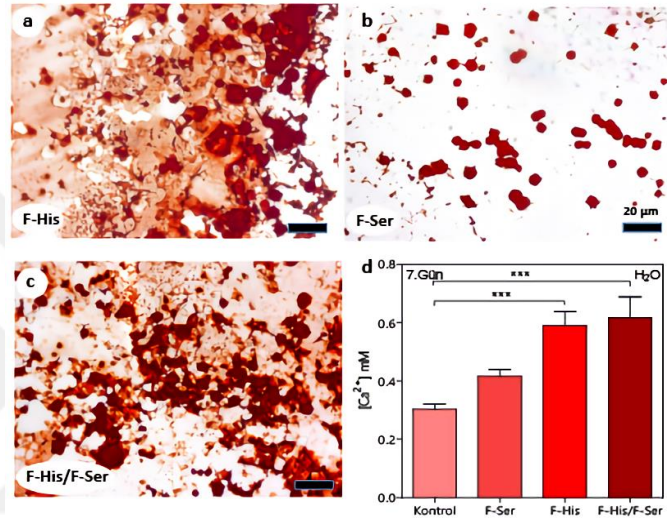
**Şekil 37.** Yeniden kullanılabilirlik deneyi A)1dk B)5 dk C)10 dk'lık aralıklarla alınan ölçüm sonuçları, D) F-His/F-Ser enzim mimik yapının diyaliz membrana yüklenmiş hali, ölçüm alınan gün PBS solüsyonlarının görüntüsü (üst), ölçüm alındıktan 1 gün sonra pbs solüsyonlarının görüntüsü (alt).

## 4.9. Mineralizasyon Deneyleri

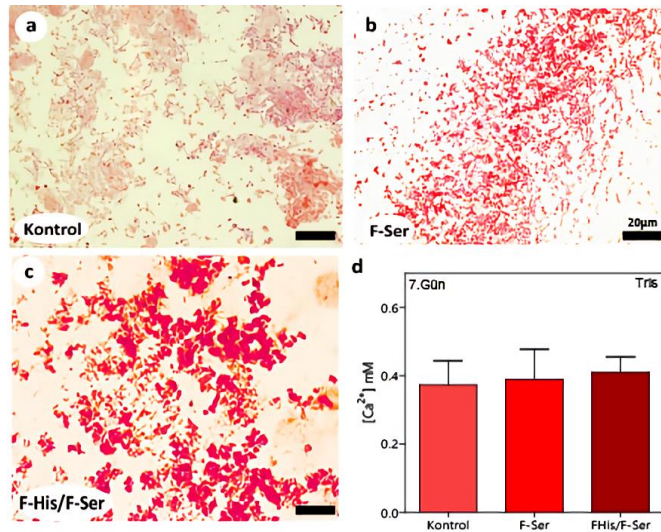
### 4.9.1. Mineral Oluşumu ve Karakterizasyonu

Cam yüzeyler, aktif gruplar fullerene gruplarının sulu çözeltileri ile kaplanmıştır (% 5 DMSO). Kaplanan yüzeyler 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Kontrol grupları olarak herhangi bir madde ile kaplanmamış cam yüzeyler kullanılmıştır. Sonrasında da her bir kuyucuğa suda ve 25 mM Tris çözeltisinde çözülmüş 24 mM  $\text{CaCl}_2$ , 14,4 mM  $\beta$ -gliserofosfat (Gungormus vd., 2010) çözeltileri ilave edilerek mineralizasyon için 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ca mineral birikimi sağlandıktan sonra yüzeyler su ile yıkanarak yüzeye tutunmayan mineraller uzaklaştırılmıştır. Yüzeyin yeterince kurummasının ardından yüzeydeki mineraller Alizarin Kırmızısı boyaması ile boyanarak fotoğraflanmış ve kantifiye edilmiştir.

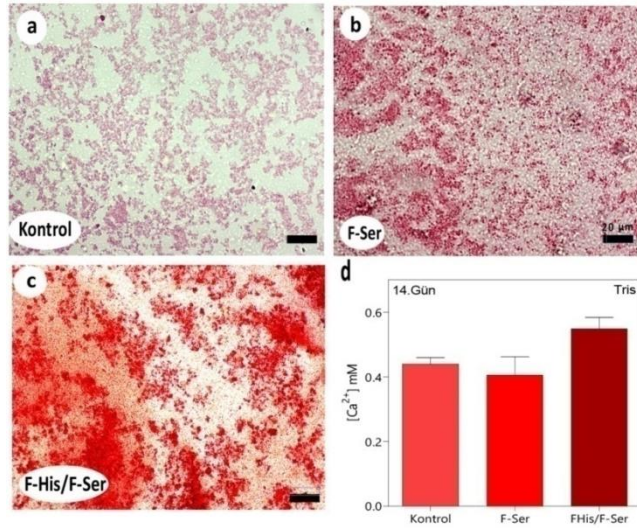
ZEISS Ters Işık Mikroskobunda alınan görüntülerde F-His, F-Ser ve F-His/F-Ser enzim mimiklerinin yüzey kaplama yapıları mineralizasyonun indüklendiği cam slaytlarda karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen görüntüler ve alizarin red boyasının setilpiridinyumklorit çözeltisi ile kantifikasyonunun sonuçlarına göre en çok Ca mineral deposizyon başarısı sırasıyla F-His/F-Ser, F-His ve F-Ser olarak bulunmuştur. Aynı zamanda aynı yöntem ile SEM için hazırlanan kaplamalar da mineralizasyon indüksiyonu sonucunda oluşan görüntüler elde edilmiştir.



**Şekil 38.** Hüresiz ortamda 7.gün yüzey mineralizasyonu deneyleri a) F-His b) F-Ser ve c) F-His/F-Ser d) Kantifikasyon sonuçları.

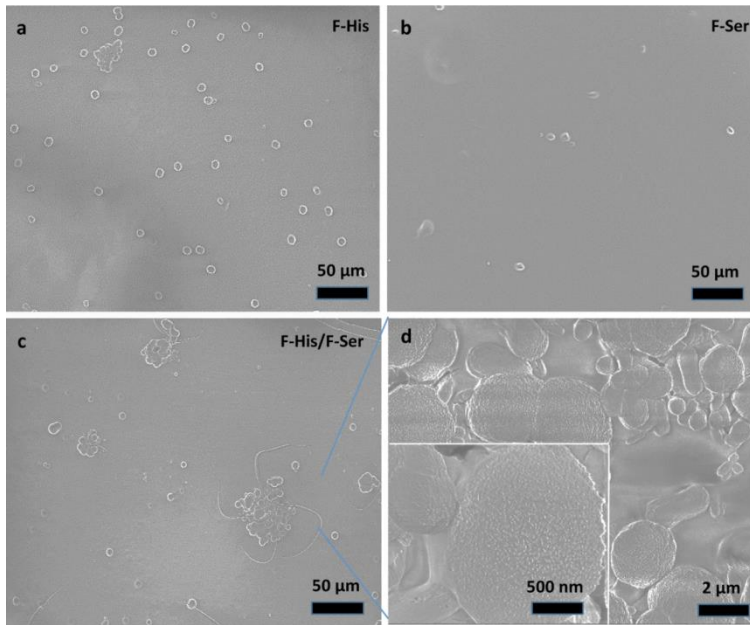


**Şekil 39.** Hüresiz ortamda TRIS çözeltisinde 7. gün yüzey mineralizasyonu deneyleri a) Kontrol b) F-Ser ve c) F-His/F-Ser d) Kantifikasyon sonuçları.

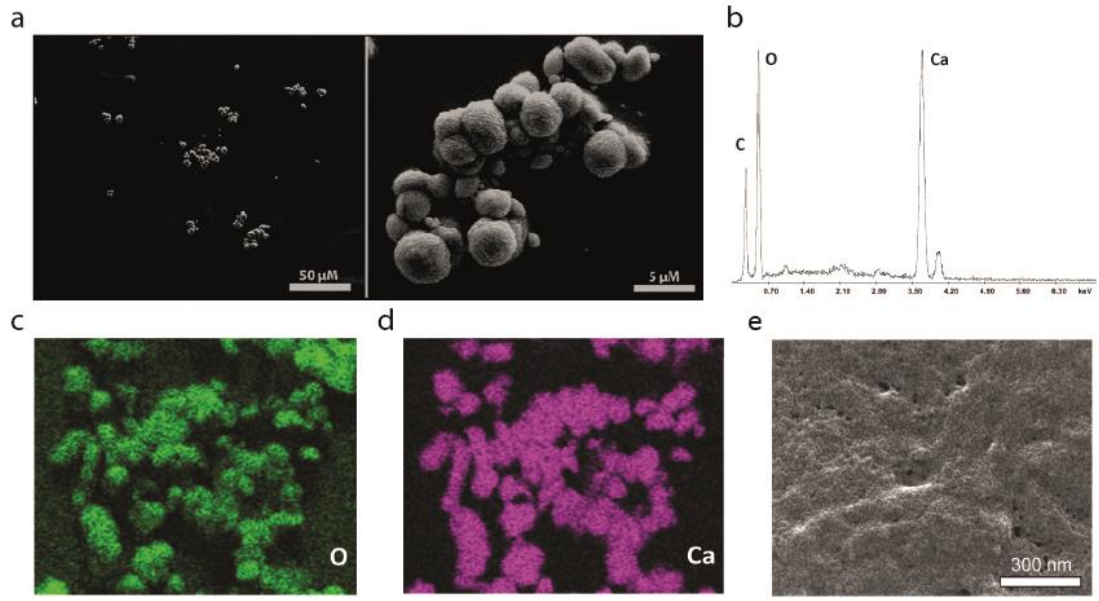


**Şekil 40.** Hüresiz ortamda TRIS çözeltisinde 14. gün yüzey mineralizasyonu deneyleri a) Kontrol b) F-Ser c) F-His/F-Ser d) Kantifikasyon sonuçları.

Mineralize olmuş yüzeylerin taramalı mikroskop görüntülerin ZEISS Gemmini SEM 500 FE-SEM taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Ölçümler Bilkent Üniversitesi UNAM ve Necmettin Erbakan Üniversitesi BİTAM da gerçekleştirilmiştir. Gerekli durumlarda numuneler, 4 nm Au/Pd ile kaplama yapılmıştır.



**Şekil 41.** Yüzeyde oluşan minerallerin taramalı elektron mikroskop ile gösterimi a) F-His, b) F-Ser, c) F-His/F-Ser, d) Oluşum bölgesi belirlenen minerallerin yakından görüntülenmesi.



**Şekil 42.** SEM görüntüleri. a) F-His/F-Ser kaplı yüzeylerde mineral kristalleri, b) Birikmiş minerallerin EDX analizi, c) Elemental dağılım haritası (O) d) Elemental dağılım haritası (Ca) ve e) Tamamen mineralize yüzeyin SEM görüntüsü.

Yüzeyde mineral formasyonu indüklenmesi SEM yöntemi ile gösterilmiştir. İçinde F-His enzim mimiğinin kaplama olarak uygulandığı gruplar kontrol gruplarına göre daha çok mineral oluşumunu indüklemiştir.

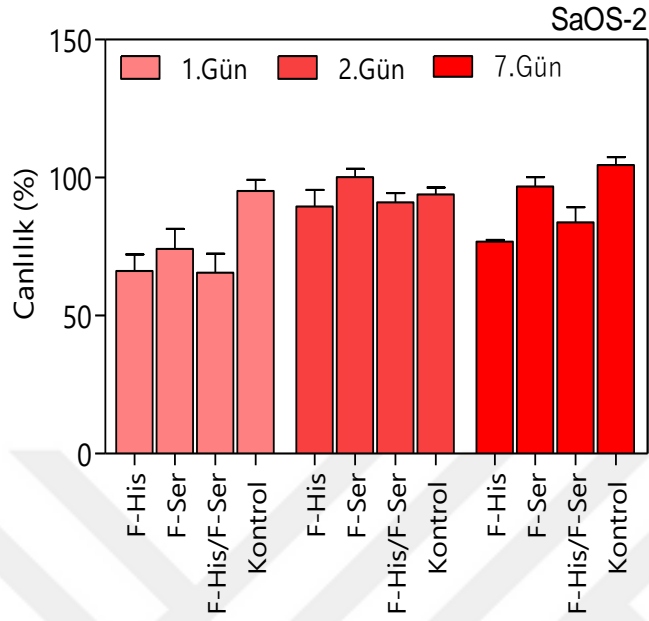
## 4.10. Hücre Kültürü Deneyleri

### 4.10.1. Biyouyumluluk Deneyleri

Hücre kültürü deneylerinde yapılması gereken ilk çalışmalardan birisi hücre biyouyumluluk testleridir. Bu deneylerde uygulanması planlanan malzemenin farklı konsantrasyonlarda hücre üzerinde gösterdiği etki gözlemlenerek hücre için toksik olmayan ve etkinlik için yeterli olan konsantrasyon seçimi yapılır.

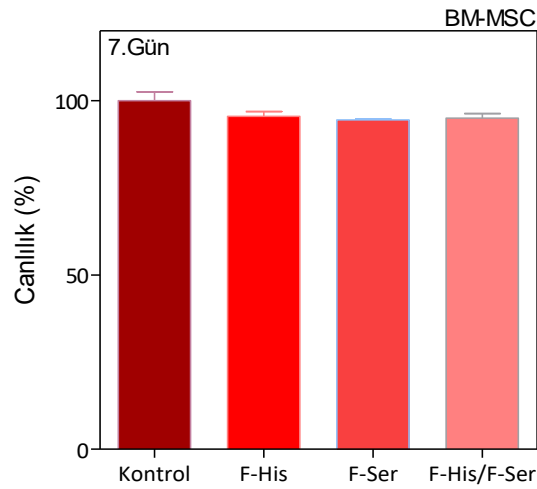
ALP mimik olarak tasarlanan fullerenzim nanoyapılar için yapılan enzim kinetiği çalışmalarında belirlenen nanokatalist konsantrasyonunun (4,6 µM) hücrelere uygulanması sonucu yapılan Alamar Mavisi canlılık deneylerinde %80 in üzerinde hücresel canlılık gözlemlendi (Şekil 43). Aynı zamanda, enzim mimik yapıların

uygulandığı SaOS-2 hücrelerinin biyomineralizasyonunu ve osteogenik farklılaşmasını artırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 43. SaOS-2 Hücre Biyoyumluluk Testi Sonuçları.

Aynı zamanda BM-MSK hücrelerinde yapılan çalışmalarda 2,3 µM konsantrasyondaki malzemenin uygulanması sonucu yapılan Alamar Mavisi canlılık deneylerinde %80 in üzerinde hücresel canlılık gözlemlendi (Şekil 44).



Şekil 44. BM-MSK Hücre Biyoyumluluk Testi Sonuçları.

#### 4.10.2. Fullerenzim Uygulanan SaOS-2 ve BM-MSK Hücrelerinde Osteogenik Farklılaşmanın Gözlenmesi

Fulleren katalistler ile kaplanmış cam lamellerin üzerine ekilmiş hücreler farklı koşullarda yapılan deneylerle SaOS-2 hücreleri için 3., 7. ve 12. günlerde, BM-MSK ler için 7. ve 14. günlerde soğuk saf etanol ile yüzeye sabitlenip,  $Ca^{+2}$  iyonunu şelatlayan ve osteoblast benzeri hücrelerin mineral biriktirme yeteneğini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan Alizarin Kırmızı boyaması ile boyandı. Yapılan boyamaların sonuçlarında SaOS-2 hücrelerinde oluşan mineral birikimleri kantitatif ve kalitatif olarak karşılaştırılarak osteogenik farklılaşmanın oranının gruplar arasındaki farkları gözlemlendi.

Hem kantitatif hem de mikroskopik analiz, enzim mimik yapıların uygulanmasının SaOS-2 hücrelerinin matriks mineralizasyonunu önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Biyomineralizasyon testleri sırasında, fosfataz benzeri nanopartikül ile muamele edilmiş hücreler başkalaşma sürecinde kültür ortamının etkinliğini araştırmak üzere, hem normal kültür ortamında, literatürden seçilen konsantrasyonlarda fosfat kaynağı olarak sadece  $\beta$ - gliserofosfat içeren kültür ortamında ve deksametazon,  $\beta$ - gliserofosfat, askorbik asit içeren osteogenik kültür ortamında kültürlenmiştir. Çalışmalarımızın sonucunda osteoprogenitör hücre olan SaOS-2 hücrelerinin morfolojik olarak osteoblast hücrelerine farklılaşması Alizarin Kırmızısı ile boyanan hücreleri mikroskopta gözlemlenmesiyle gösterilmiştir.

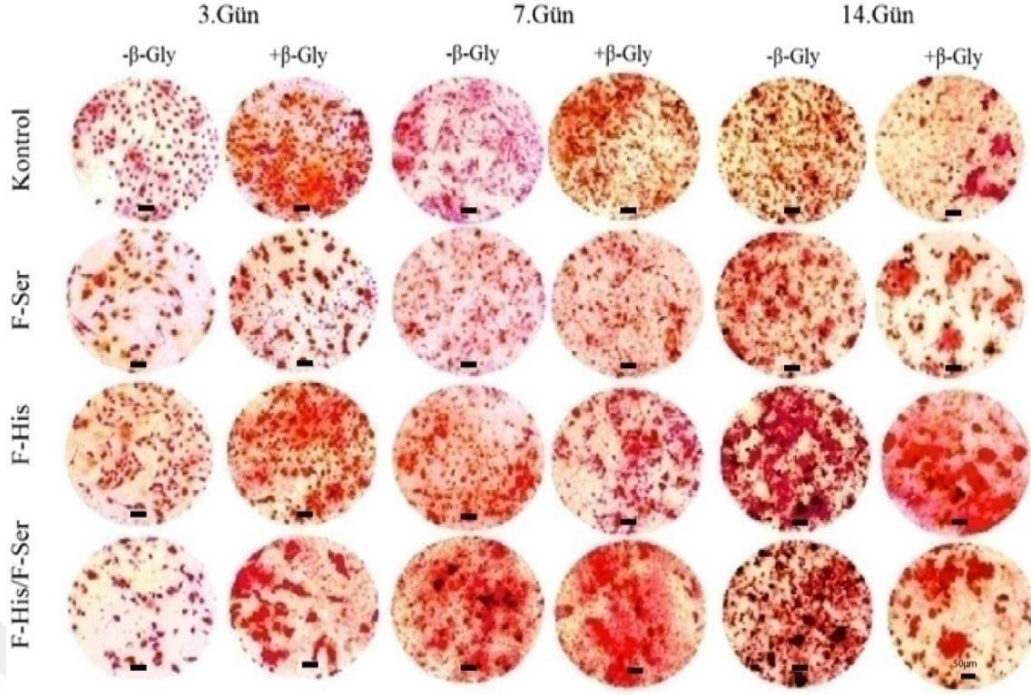
Deneyler 24 kuyucuklu plakalar üzerindeki cam lamellere kaplanan enzim mimik yüzeylerine hücre ekimi ile gerçekleştirilmiştir. Mineralizasyon için optimum hücre yoğunluğuna sırasıyla  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$  ve  $5,5 \times 10^4$  hücre ekimleriyle gerçekleştirilen denemeler ile karar verildi. Yapılan deneylerin sonucunda SaOS-2 hücreleri için en iyi sonucun ilk ekim de  $5,5 \times 10^4$  hücre yoğunluğunun uygun olduğuna karar verilmiştir. BM-MSK hücreleri için ise, yapılan hücre sayısı optimizasyon denemeleriyle başlangıç hücre ekim sayısının  $8 \times 10^4$  olduğu deneylerde en iyi sonucun elde edildiği gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelere enzim mimikler besiyerinin içine ilave edilerek uygulanmıştır. Böylelikle enzim mimiklerin farklı uygulama yöntemleri de test edilmiştir.

SaOS-2 hücrelerindeki optimizasyon deneylerinde yapılan ilk denemelerde, öncelikle fosfat kaynağı olarak etkisini gözlemlenmek adına  $\beta$ -gliserofosfat içeren kültür ortamı

ve normal kültür ortamı gruplarından oluşan denemede plakalara  $3 \times 10^4$  hücre ekimi gerçekleştirildi. Ekimden sonraki gün hücre sayısının yeterli olmadığı düşünülerek malzeme uygulaması için yeterli hücre yoğunluğunun oluşması beklendi. Bu denemede ve daha sonraki denemelerimizde gözlemlenen hücre görüntülerinde öncelikle F-His/F-Ser grubunun F-His grubuna göre karşılaştırıldığında proliferasyonu baskılandığı gözlemlenmiştir. Düşük proliferasyonun, malzeme uygulandıktan 3-4 gün sonra hücrelerin ortama alışmasıyla birlikte normal düzeye geldiği gözlemlenmiştir.

Optimizasyonun ardından gerçekleştirilen ilk deneyde, test grupları arasındaki biyomineralizasyon farkı 3. günde gözlemlenmeye başlanmıştır. Görüntülerde matriks mineralizasyonunu ifade eden Alizarin Kırmızısı yoğunluğu karşılaştırılmıştır. Farklılaşmadaki gruplar arasındaki farklar 7. ve 14. günde de bir değişiklik göstermedi. Mikroskop görüntülerinde, F-His ve F-His/F-Ser grubunda 7. ve 14. günlerde olgun osteoblast görüntüsü belirgin olarak gözlemlendi.

Mikroskop görüntülerinde  $+\beta$ -gly grubundaki fosfat konsantrasyonunun yüksek olmasından ötürü, 3. ve 7. günlerde tüm gruplarda daha yüksek matriks mineralizasyonu gözlemlendi. 14. gün görsellerine bakıldığında bu farkın kapandığı söylenebilir. Yine mikroskop görüntülerine göre hem  $-\beta$ -gly hem de  $+\beta$ -gly deney grubunda gruplar arasında matriks mineralizasyonunu indüklemeye sırasıyla F-His, F-His/F-Ser, F-Ser ve kontrol olarak bulunmuştur.

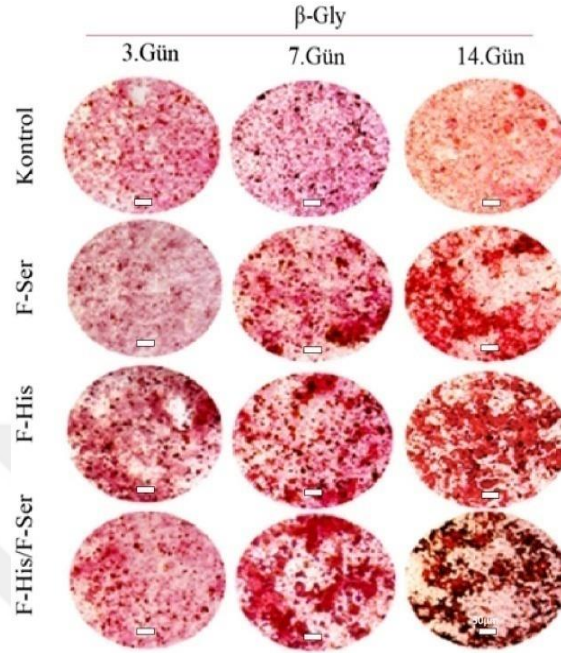


**Şekil 45.** İlk hücre ekimin de  $3 \times 10^4$  sayıda olan SaOS-2 hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin  $\beta$ -gliserofosfat ile desteklenmiş ve desteklenmemiş standart kültür ortamı gruplarında ayrı olacak şekilde elde edilen 3.,7. ve 14. gün yüzey mineralizasyon görselleri.

Önceki deneyimizde başlangıç hücre sayısının düşük gelmesi ve bu sebeple eklenen malzemelerin miktar olarak fazla geldiği anlaşılmıştı dolaylı ve + $\beta$ -Gly grubunun ortamdaki yüksek fosfat miktarı kaynaklı Alizarin Kırmızısı boyamalarında görülen tutarsızlıklardan ötürü hücre sayısı artırılıp tekrar bir deneme daha yapıldı. Deneyde 24'lük plakalara  $4 \times 10^4$  hücre ekildi ve hücrelerin yeterli yoğunluğa gelmesi beklendi. Yeterli hücre yoğunluğu oluştuğundan sonra enzim mimikler hücreye uygulandı. 3.,7. ve 14. günlerde hücreler yüzeye sabitlenip boyandı.

3. gündeki mikroskop görüntülerinde, gruplar arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi. 7. günde enzim mimik uygulanan grupların kontrolle karşılaştırıldığında önemli ölçüde bir artış gözlemlenmektedir. Mikroskop görüntülerinde F-His/F-Ser grubunun en yüksek matriksmineralizasyon ve olgun osteoblast hücre yapısının gösterdiği gözlemlendi.

14. gündeki mikroskop görüntülerinde F-His ve F-His/F-Ser gruplarının 7. güne göre daha yoğun boyamalar gerçekleştirdiğini ve olgun osteoblast morfoloji görünümünde artışların olduğu gözlemlenmiştir.



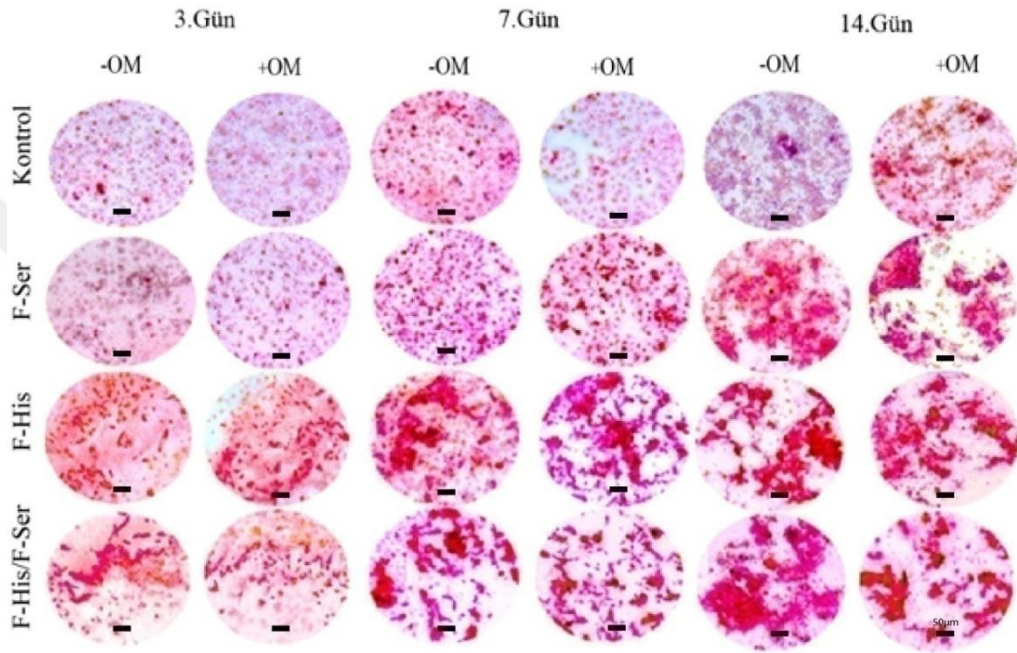
**Şekil 46.** İlk hücre ekimin de  $4 \times 10^4$  sayıda olan SaOS-2 hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin  $\beta$ -gliserofosfat ile desteklenmiş kültür ortamı uygulandığı grupta elde edilen 3., 7. ve 14. gün yüzey mineralizasyon görselleri.

Hem hücrelerin yeterli yoğunluğa gelmesini beklememek, hem de genel osteogenik besiyerinin enzim mimik yapılarla birlikte standart kültür ortamından farklı bir sonuç verip vermeyeceğini öğrenmek için, literatürden seçilen 50 nM deksametazon, 0,2 mM askorbik asit ve 1,68 mM  $\beta$ -gliserofosfat içeriğinden oluşan osteogenik kültür ortamı ile deney gerçekleştirildi. Deneyde 24'lük plakalara enzim mimikler yüzey kaplama yapıp üzerine her kuyucuğa  $6 \times 10^4$  hücre ekildi. 3., 7. ve 14. günlerde hücreler yüzeye sabitlenerek boyama yapıldı. Boyama işleminden sonra mikroskopik görüntüleme yapıldı.

3. gün mikroskop görüntülerinde F-His ve F-His/F-Ser grupların da gözlenen matriks mineralizasyonunda F-Ser ve Kontrol grubuna göre gözle görünür farklar mevcuttur. 7. ve 14. gün mikroskop görüntülerinde ise F-His ve F-His/F-Ser gruplarının F-Ser ve kontrol gruplarına göre hem matriks mineralizasyonu hemde olgun osteoblast hücre tipi oluşturması bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir. 14. gün deneylerinde

plakaların yüzey alanına göre hücre sayısının fazla gelmesinden dolayı hücreler plaka yüzeyinden ayrılmışlardır. Bu sonuç mikroskop görüntülerinin kalitesinin düşmesine yol açmıştır.

Kullandığımız enzim mimikleri osteogenik içerik ile desteklenmeyen deney grubunda desteklenen gruba göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu sonuç herhangi bir destekleyici kullanmaksızın tasarlanan enzim mimik yapıların hücre farklılaştırmaya yönlendirmek için yeterli olduğunu düşünmemizi sağlamıştır.

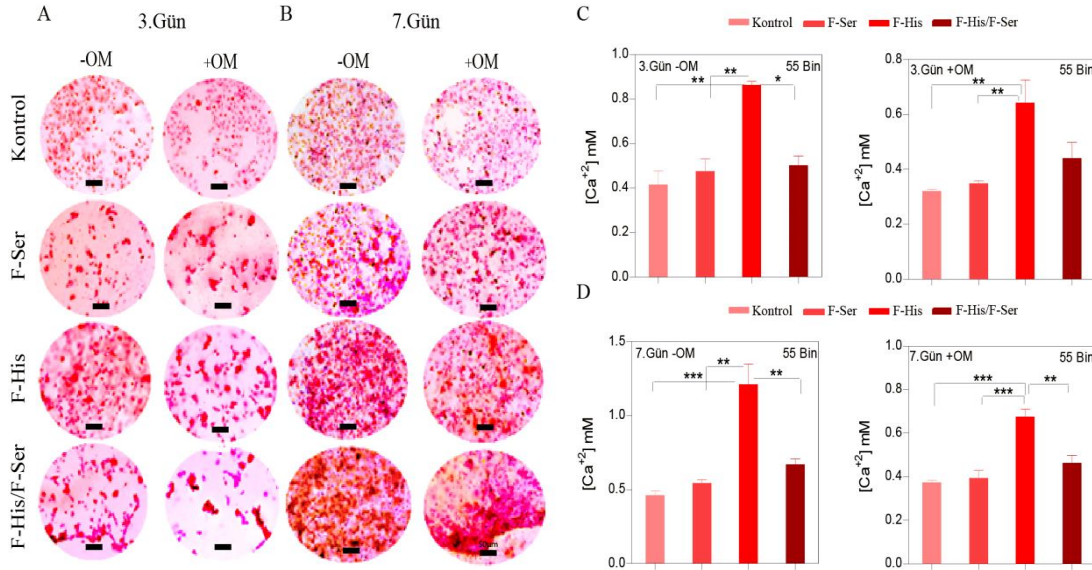


**Şekil 47.** İlk hücre ekimin de  $6 \times 10^4$  sayıda olan SaOS-2 hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin normal kültür ortamı ve osteogenik kültür ortamı gruplarında ayrı olacak şekilde elde edilen 3., 7. ve 14. gün yüzey mineralizasyon görselleri.

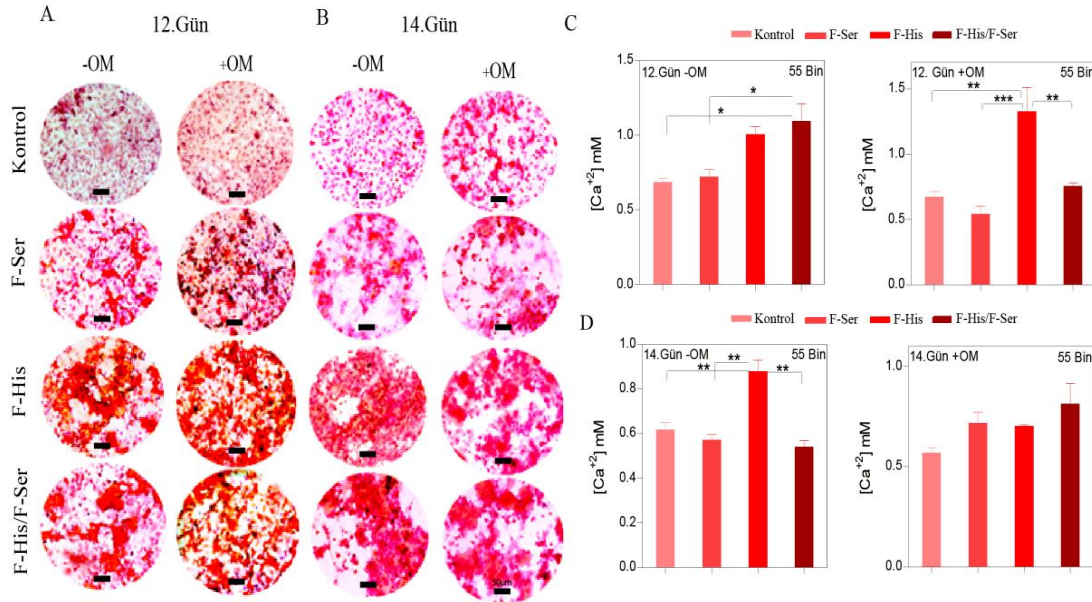
$6 \times 10^4$  hücre ile gerçekleştirdiğimiz deneyde oluşan yüksek proliferasyon kaynaklı hücrelerin yüzeyden ayrılmalarını engellemek için 3., 7., 12., ve 14. günlerde ve her plakaya  $5,5 \times 10^4$  hücre ekilerek deney tekrarlandı.

Sonuçlara genel olarak baktığımızda tüm deney setinde matriks mineralizasyonu ve uygun osteoblast hücre şekli oluşumunun en yüksekte en düşüğe doğru olarak F-His  $\geq$  F-His/F-Ser, F-Ser, Kontrol sıralamasıyla indüklendiği söylenebilir.  $6 \times 10^4$  hücre sayısı ile kurulan deneyde gözlemlendiği gibi bu deneyin de genelinde normal kültür ortamı ile yapılan deneyin sonuçlarının osteogenik içerik ile desteklenen deney gruplarına göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. 14. günde yine diğer

deney setlerinde gözlemlendiği gibi hücrelerin yüzeyden ayrılması sonucunda mikroskop görüntüsü almakta zorluk çekilmiştir.



**Şekil 48.** İlk hücre ekimin de  $5,5 \times 10^4$  sayıda olan SaOS-2 hücreleri üzerine uygulamak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin A. Normal kültür ortamı B. Osteogenik kültür ortamı gruplarında ayrı olacak şekilde elde edilen 3. ve 7. gün yüzey mineralizasyon görselleri C. 3. gün mineralizasyon kantifikasyon grafiği D. 7. gün mineralizasyon kantifikasyon grafiği.



**Şekil 49.** İlk hücre ekimin de  $5,5 \times 10^4$  sayıda olan SaOS-2 hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin A. Normal kültür ortamı B. Osteogenik kültür ortamı gruplarında ayrı olacak şekilde elde edilen 12. ve 14. gün yüzey mineralizasyon görselleri C. 12. gün mineralizasyon kantifikasyon grafiği D. 14. gün mineralizasyon kantifikasyon grafiği.

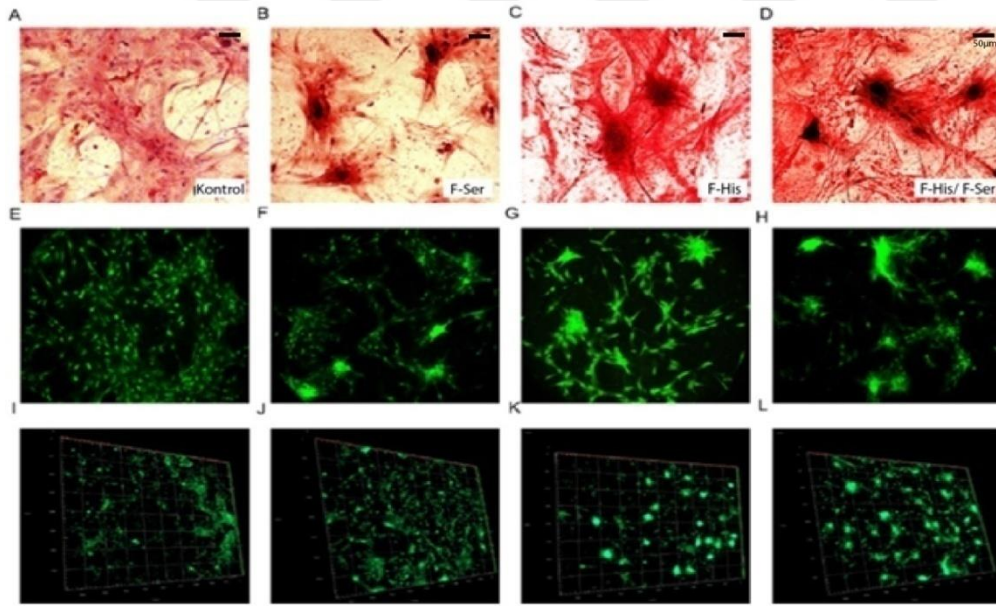
Fosfataz benzeri nanozimlerin performansı, osteogenik takviyenin yokluğunda osteogenik farklılaşmaya neden olması enzim mimiklerin işlevselliği açısından önemlidir. Ayrıca, fosfataz taklidi nanopartiküller, standart kültür ortamında kültürlenmiş hücrelerin nispeten daha yüksek mineralleşmesine neden olmuştur.

Tüm mineralizasyon deneylerine genel olarak bakıldığında 3. günde tüm gruplar arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiş, test grupları arasındaki biyomineralizasyon farkı 7. günde gözlemlenmiştir. Farklılaşma 7. gün civarında başlamış ve 12. güne kadar olgun osteoblastların oluşumu gözlemlenmiştir. Mikroskop görüntüsüne ve 7., 12. günde kantitatif verilere göre, F-His ve F-His/F-Ser, hücresiz mineralizasyon deneylerindeki farklılıklara benzer düzeyde biyomineralizasyona yol açmıştır. Bu sonuçlar, F-Ser'in katalitik etki için çok önemli olduğunu, ancak biyomineralizasyon sürecine önemli bir katkısı olmadığını ortaya koymuştur.

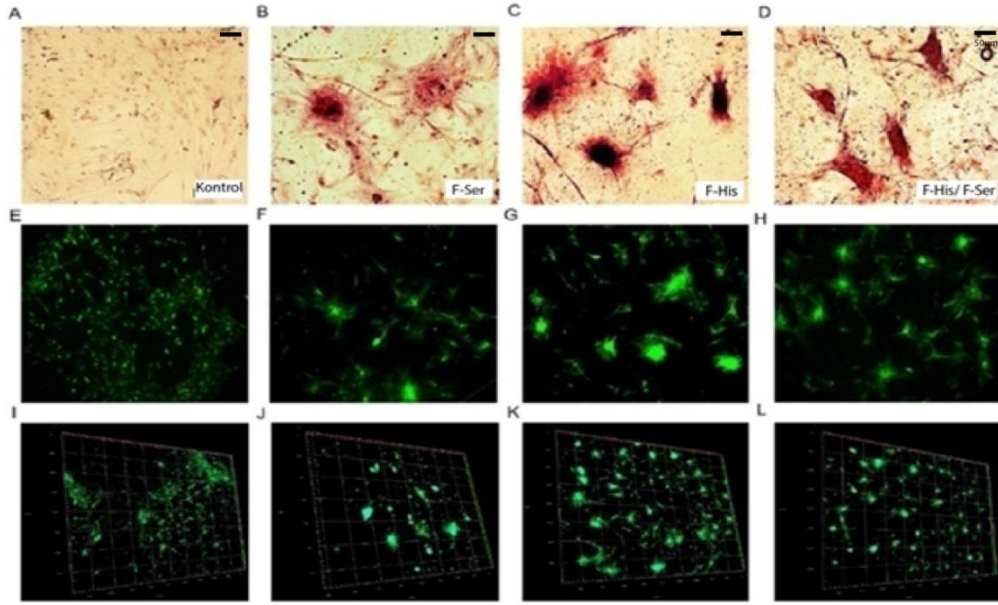
Tasarladığımız fullerenzim yapılarla osteoprogenitör SaOS-2 hücrelerindeki matriks mineralizasyonu deneyleri yapıldıktan sonra, malzememizin daha zor farklılaşmanın gözlemlenmesini öngördüğümüz mezenkimal kök hücre olan BM-MSK hücrelerinde de etkinliği gözlemlenmek için deneyler gerçekleştirildi. BM-MSK hücreleri için yaptığımız deneylerde, hücre ekimi yapılan plakalara malzeme uygulamasının 7. ve 14. günlerde soğuk saf etanol ile yüzeye sabitlenip,  $Ca^{+2}$  iyonunu şelatlayan ve osteoblast benzeri hücrelerin mineral biriktirme yeteneğini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan Alizarin Kırmızı boyaması uygulandı. Yapılan boyamaların sonuçlarında SaOS-2 hücrelerinde oluşan mineral birikmelerinin karşılaştırılarak osteogenik farklılaşmanın oranının gruplar arasındaki farkları gözlemlendi. BM-MSK hücreleri için yapılan hücre sayısı optimizasyon denemeleriyle başlangıç hücre ekim sayısının  $8 \times 10^4$  olduğu deneylerde en iyi sonucun elde edildiği gözlemlenmiştir.

Deney sonuçları osteogenik kültür ortamının kullanıldığı deneylerin standart kültür ortamına göre belirgin bir fark gözlemlenmediğini ortaya koydu. Alizarin Kırmızı boyaması sonucunda alınan görüntülerde gruplar arasında F-His/F-Ser ve F-His enzim mimiklerinin uygulandığı hücrelerin yüzey mineralizasyonunun indüklendiği gözlemlendi. Hem standart kültür ortamı hem de osteogenik kültür ortamı ile yapılan

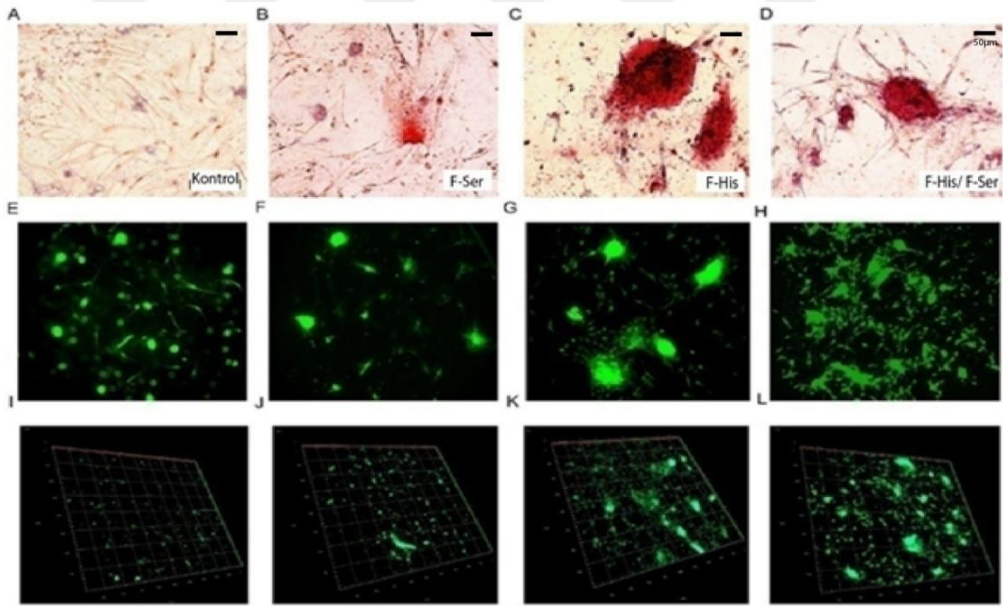
deneylerde osteogenik kültür ortamında standart ortama kıyasla önemli bir farklılık gözlemlenmedi. Aksine standart kültür ortamında indüklenen hücrelerde yapılan Alizarin Kırmızısı boyamalarında olgun osteoblast ve matris mineralizasyon görüntülerinin daha kırmızı ve belirgin olduğu gözlemlendi. Yapılan Alizarin Kırmızısı boyamasından elde edilen görüntülerden sonra, oluşan kemik hücresi benzeri hücre kümelerini göstermek adına, hücre çekirdeğini ve sitoplazmasını boyadığı ve floresan ışığa verdiği bilinen akridin turuncusu boyaması yapıldı. Boyama yapıldıktan sonra floresans görüntüleme ve yine floresans sinyallerle yapılan 3D analiz ile ortamın genel mineralizasyon oranı gösterilmiş oldu. Alizarin Kırmızısı ve akridin turuncusu boyamaları sonuçları birbirleriyle uyumlu sonuçlar vermiştir. Yapılan çalışmada alınan mikroskop görüntüleri sonucunda olgun osteoblast ve matris mineralizasyon görüntüsünün enzim mimikler arasında çoktan aza doğru sıralanışı F-His/F-Ser ve F-His gruplar birbirine yakın, F-Ser olarak gözlemlenmiştir. Olgun osteoblast görünümü kök hücrelerde beklenildiği gibi 7. günde henüz başladığını ve 14. günde daha olgun yapıların oluşmuş olduğunun gözlemledik.



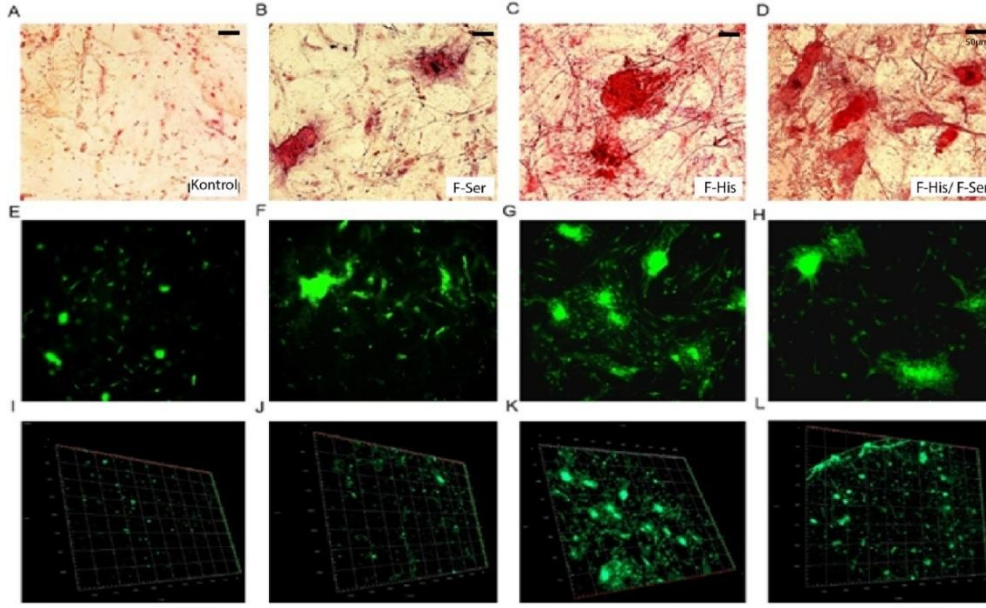
**Şekil 50.** BM-MSCs hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin normal kültür ortamının kullanıldığı 7 günlük yüzey mineralizasyon görselleri (A-D) Alizarin Kırmızısı boyaması (E-H) Akridin turuncusu boyası ile mineralizasyonun floresan mikroskop ile gösterimi (I-L) Floresan boyamanın 3D olarak gösterimi.



**Şekil 51.** BM-MSK hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin osteogenik kültür ortamının kullanıldığı 7 günlük yüzey mineralizasyon görselleri (A-D) Alizarin Kırmızısı boyaması (E-H) Akridin turuncusu boyası ile mineralizasyonun floresan mikroskop ile gösterimi (I-L) Floresan boyamanın 3D olarak gösterimi.



**Şekil 52.** BM-MSK hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin normal kültür ortamının kullanıldığı 14 günlük yüzey mineralizasyon görselleri (A-D) Alizarin Kırmızısı boyaması (E-H) Akridin turuncusu boyası ile mineralizasyonun floresan mikroskop ile gösterimi (I-L) Floresan boyamanın 3D olarak gösterimi.



**Şekil 53.** BM-MSC hücreleri üzerine uygulanmak için tasarlanmış fosfataz mimiklerinin osteogenik kültür ortamının kullanıldığı 14 günlük yüzey mineralizasyon görselleri (A-D) Alizarin Kırmızısı boyaması (E-H) Akridin turuncusu boyası ile mineralizasyonun floresan mikroskop ile gösterimi (I-L) Floresan boyamanın 3D olarak gösterimi.

#### 4.10.3.Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları

Hücrelerin osteoblastkökenine bağlılığı çeşitli sinyaller tarafından yönetilir. Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü-2 (Runx2) ve kolajen tip I (COL-I), osteoblast farklılaşmasını izlemek için sıklıkla kullanılan osteoblasta özgü belirteçlerdir.

Osteoblast farklılaşma süreci sırasında Runx2, osteogenik farklılaşmadaki gen ekspresyonunda genel bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu nedenle Runx2, osteogenik farklılaşma ve iskelet genlerinin düzenlenmesiyle bağlantılıdır. COL-I ise hücre dışı matriks olgunlaşma sürecinde yüksek oranda ifade edilen, osteoblast farklılaşması için başka bir kritik faktördür. Bu nedenle COL-I, osteoblast olgunlaşmasının ilerlemesi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür.

Tasarlanan enzim mimik yapıların gen ekspresyon profilleri, fulleren bazlı nanopartikül kaynaklı osteoblast farklılaşmasını daha iyi anlamak için qRT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

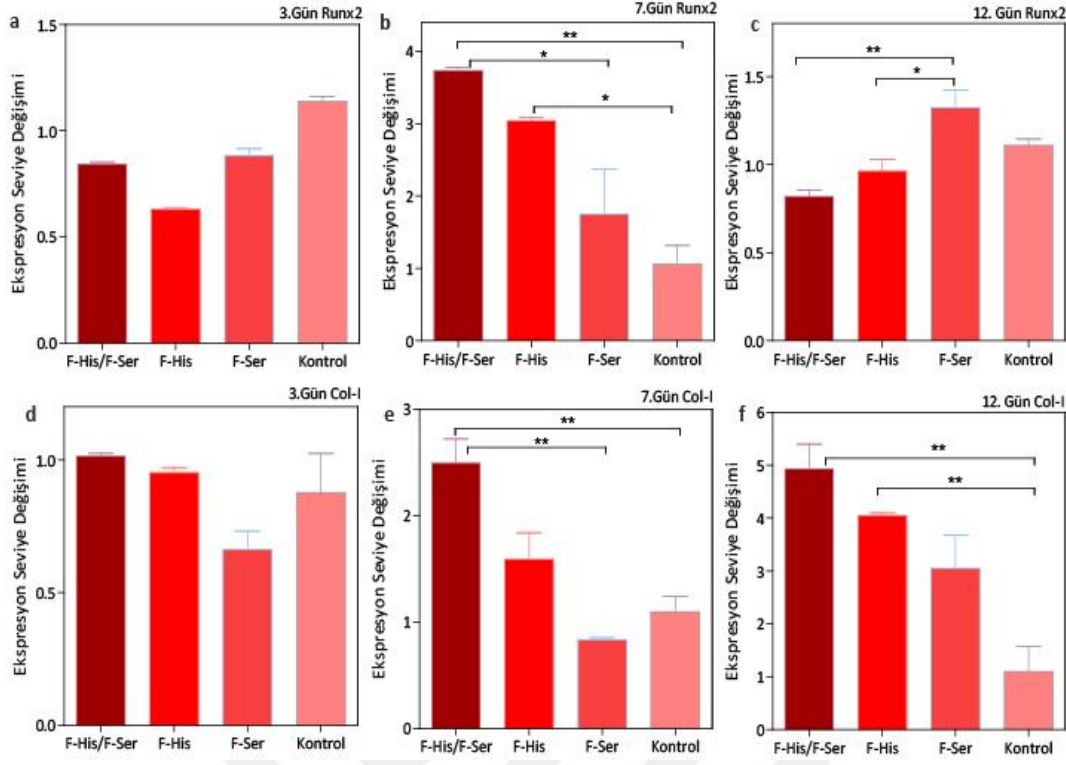
7. günde Runx2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli değişiklikler elde edildi, 3. gün yapılan çalışmada osteoblast spesifik transkripsiyon işaretlerinin aktivasyonu için erken bulundu ve hem gruplar arasında hem de referans gene kıyasla önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. 12. günde yapılan analiz sonucunda Runx2 ekspresyonu kontrol grubuna daha yakın bulundu. Ekspresyon seviyesindeki bu düşüş, osteoblastın matris olgunlaşmasının bir belirteci olarak açıklanabilir.

COL-I, osteoblast olgunlaşmasının ilerlemesi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. 7. günde, COL-I ifadesi Runx-2 ile benzer bir profil gösterdi, bu faktörün ifadesi osteoblast farklılaşmasını belirten ekspresyonda referans gene göre gözle görülür bir farkla artış gözlemlendi. 12. günde, devam eden biyomineralizasyon sürecinin bir sonucu olarak COL-I ekspresyonundaki artışın devam ettiği gözlemlendi.

Alizarin Kırmızısı boyama sonuçlarına uygun olarak, 3. gün enzim mimik uygulaması kaynaklı biyomineralizasyon için erken bulmuş ve hücre dışı matris olgunlaşması 7. günde başlamıştır. Biyomineralizasyon sonuçlarına göre, kemik dokusunun indüklenme seviyesi F-His ve F-His/F-Ser gruplarında birbirine yakın bulunmuştur. Ancak F-Ser grubunun diğer iki gruba kıyasla daha düşük osteogenik indüksiyon kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

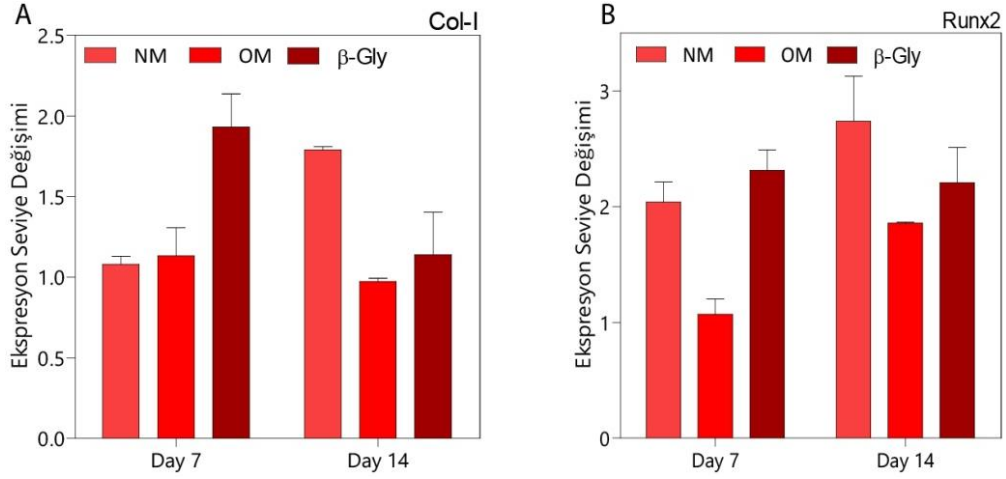
Mineralizasyon çalışmalarından sonra yapılan gen seviyesi analizi, F-His/F-Ser uygulamasının kritik faktörlerinin ekspresyonunda artışa neden olduğunu ve F-His grubuna eklenen F-Ser enzim mimik yapısının osteoblast farklılaşmasındaki önemini göstermektedir.

Osteorejenerasyon çalışmalarında, osteogenik ortam genellikle osteogenik farklılaşmayı desteklemek için kullanılır. Çalışmada fosfataz mimikleri, osteogenik ortama ihtiyaç duymadan osteoblast oluşumunu indüklediği gösterilmiştir.



**Şekil 54.** Osteoblast indüksiyonu için kullanılan fosfataz enzim mimik yapılarının SaOS-2 hücrelerindeki gen ekspresyon üzerindeki etkilerinin analizi.

Farklı büyüme koşullarında malzemenin gen ekspresyonunda nasıl değişimler göstereceğini analiz etmek için ve farklı kültür koşullarında büyütülen hücrelerden 7. ve 14. gün izole edilen mRNAlarla gen ekspresyon analizi yapıldı. Çalışma osteogenik ortam, normal ortam ve yalnızca 1,68 mM  $\beta$ -gliserofosfat (bir fosfat kaynaklı kültür ortamı olarak) ile büyütülen hücrelerden izole edilen mRNA materyali ile gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, ortama  $\beta$ -gliserofosfat verilen deney grubunda 7. günde COL-I seviyesinde gruplara arasında en yüksek değer görülmüştür. Ortama verilen fosfat kaynağı indüksiyonu hızlandırmış ve 14. güne gelmeden enzim mimik yapının “feedback” mekanizmasına geldiğinin düşünmemizi sağlayan azalmaya neden olmuştur. Normal besiyeri ve osteogenik ortam grupları arasında çok önemli farklılıklar gözlemlenmedi. Osteogenik ortamın ekspresyonu artırma yolunda yükseltmesi beklenirken, normal ortam grubunda fulleren katalisterin osteoblasta özgü gen ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir.

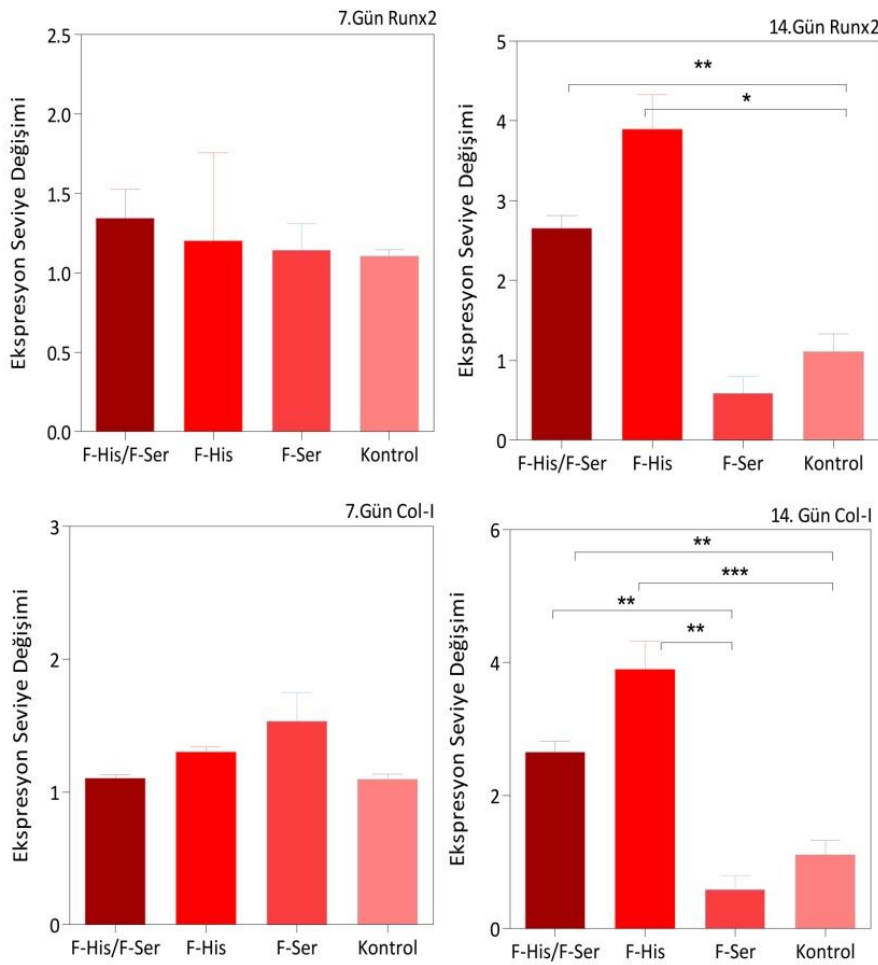


**Şekil 55.** Fosfataz taklidi F-His/F-Ser enzim mimiğinin SaOS-2 hücrelerindeki osteoblast indüksiyonunda kültür ortamı etkisi için gen ekspresyonu çalışması (NM: Standart kültür ortamı, OM: Osteogenik kültür ortamı, β-gly: β-gliserofosfat içeren kültür ortamı).

SaOS-2 hücreleri ile yapılan gen ekspresyon analizinden sonra, mezenkimal kök hücre olan BM-MSK hücrelerinde de malzeme uygulaması yapılan mineralizasyon sonuçlarında olduğu gibi gen bazında da değişiklik gözlemleyip gözlemleyemeyeceğimizi tayin etmek için gen ekspresyon analizi yapıldı (Şekil 56). Analiz sonuçları SaOS-2 hücrelerinde elde edilen ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldığında 7. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, 14. günde ekspresyon seviyelerinde artışlar ve gruplar arasındaki farkların olduğu gözlemlendi. Osteoprogenitör hücrelerdeki 7.gün mineralizasyon sonuçlarında önemli mineral birikimi gözlemlenmesine rağmen, kök hücrelerin gen düzeyinde osteogenik farklılaşmayı henüz etkinleştiremediği bulunmuştur. Bu kök hücreler için beklenen bir sonuçtur ve bu sonuç, enzim mimik yapıların pluripotent BM-MSK hücrelerinde osteoprogenitör hücrelere nazaran daha uzun sürede gen düzeyinde aktivasyona sebep olduğu gösterilmiştir. 14. gün ekspresyon seviyelerindeki artış kök hücreler için herhangi bir osteogenik takviye kullanılmaksızın sadece enzim mimiklerin kullanılmasıyla elde edilmiştir. Bu sonuç, uygulanan enzim mimik yapının mezenkimal kök hücreleri osteogenik farklılaştırmaya yönlendirmek için yeterli olduğunu göstermektedir.

14.gündeki COL-I ekspresyon sonuçlarında F-His grubunun F-Ser grubuna göre üç kat, F-His/F-Ser ve Kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek ekspresyon gösterdiği gözlemlenilmiştir. 14. gün Runx2 ve COL-I sonuçları F-Ser ve F-His/F-Ser

gruplarında osteogenik indüklenme ve matris mineralizasyonunun başlangıç aşamasında olduğunu anlamamızı sağlamaktadır. qRT-PCR deneyleri sonucunda enzim mimik yapılar karşılaştırıldığında en yüksek matris mineralizasyonu ve osteoblast indüklenme kapasitesinin yüksekte düşüğe sırasıyla F-His  $\geq$  F-His/F-Ser ve F-Ser olduğu belirlenmiştir. F-His ve F-His/F-Ser grupları arasındaki ekspresyon farklılığı istatistiksel analizde de gözlemlendiği gibi minör farklılıklardır. Her ikisi de kontrole göre anlamlı bir artışa sebep olmuştur.



**Şekil 56.** Osteoblast indüksiyonu için kullanılan fosfataz enzim mimik yapılarının BM-MSC hücrelerindeki gen ekspresyon seviyesi üzerindeki etkilerinin analizi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal enzimlerin hem üretim hem saklama koşullarındaki sınırlamalarından dolayı enzim mimik yapıların üretimi ile ilgili çalışmalarda artış gözlemlenmiştir. Bizde bu problemlere çözüm üretebilmek için çalışmamızda ALP mimik olarak tasarladığımız fulleren moleküllerini kullandık.

Sentezlenen karbon hibrit yapılar doğal bir fosfataz enziminin biyokatalitik ve biyoinduktif işlevlerini mimik etmek için tasarlandı. Karbon hibrit yapıları fonksiyonlandırmada kullanılan histidin ve serin aminoasitleri, çeşitli enzimlerin aktif bölgesinde yaygın olarak bulunur ve önceki çalışmalarda, bu aminoasitlerle Konjüge nanoyapılar, metal içermeyen fosfataz mimikleri olarak başarıyla kullanılmıştır (Nothling, Xiao, Hill, Blyth, Bhaskaran, Sani vd., 2020; Zhang, Xue, Luo, Li, Yang, Zhuang vd., 2014).

Bu yapıyı tasarlamak için fulleren moleküllerine ALP nin aktif katalitik bölgesinde bulunan histidin ve serin aminoasitleriyle fonksiyonlandırma yaparak ALP enzim mimik yapıları oluşturduk. Bu tasarımı yaparken öncelikle fulleren moleküllerini hidroksil grupları ile aktif hale getirdik. Oluşan fullerenol yapılarının varlığını TGA (Şekil 24), <sup>1</sup>H-NMR (Şekil 25), FTIR (Şekil 30-a) ve DLS (Şekil 33) analizleri ile doğruladık. Fullerenol yapılarının oluşumu kanıtlandıktan sonra fullerenol yapısına aminoasit fonksiyonlandırma yapılabilmesi için hidroksil grupları üzerine nitrofenil grupları eklenerek amino asit fonksiyonlandırması için aktifleştirildi. Fullerenolün aktivasyonu, proton NMR spektroskopisinde aromatik çiftlerin varlığı ile doğrulanmıştır. Daha sonra aktifleştirilmiş fullerenol yapılarının üzerine mimik edilecek enzimin aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerin fonksiyonlandırılması yapıldı. Küresel fulleren nanokatalizörler, <sup>1</sup>H-NMR (Şekil 26, Şekil 28), <sup>13</sup>C-NMR (Şekil 27, Şekil 29), Elemental Analiz (Tablo 4), DLS (Şekil 34, Şekil 35), TEM (Şekil 32), AFM (Şekil 31) ve FTIR (Şekil 30-b,c), karakterizasyon yöntemleri ile analiz edildi. Analizler sonucunda parçacık ve agregat olarak nasıl bir yapı elde edildiği tayin edilmiş oldu.

Sentezlenen nanoyapılarının üzerinde konumlandırılan aktif bölgeler nanokümelere halinde kendi kendine bir araya gelmek üzere tasarlandı ve bu agregat oluşumu TEM karakterizasyon sonuçları ile gözlemlendi (Şekil 32). Ayrıca uzun süre sonikasyon

uygulamasıyla agregatların dağıtılmasının ardından DLS ölçümü alınması sonucu ~5 nm olarak gözlemlenen fulleren enzim mimiklerinin bir süre sonra sulu ortamda ~100-200 nm kümeler halinde birleştiğini gösterdik. Fullerenzim enzim mimiklerinin kümeler halinde birleşmesi, doğal enzimler gibi kendi kendine bir araya gelmesine benzemektedir. Fulleren moleküllerin spontane agregat oluşturmaları enzimler gibi çoklu aktif bölge oluşumunu sağlamaktadır.

Histidin ve serin aminoasitleri doğal enzimlerin katalitik aktivitelerinde farklı işlevlere sahiptir. Doğal enzimlerde, histidin ve serin arasındaki kovalent olmayan etkileşimler katalitik aktiviteyi kolaylaştırır. Özellikle histidin, genel bir baz görevinde olup nükleofilik saldırı için serinin hidroksil grubunu polarize eder. Bu nedenle çalışmamızda, F-His ve F-Ser, moleküller arası etkileşimlerin biyokataliz üzerindeki etkisini test etmek için ayrı ayrı ve bir karışım olarak uygulandı.

Fosfatazı mimik eden fulleren nanoparçacıkların katalitik aktivitesini test etmek için ilk model substrat olarak pNPP kullanıldı. pNPP, fosfataz aktivitesini izlemek için yaygın kullanılan bir substrattır. Reaksiyon, pNPP'den para-nitrofenolat (pNP) oluşumunun ölçülmesiyle izlendi. Nanokatalizörlerin konsantrasyonu (4,6  $\mu\text{M}$ ) sabit tutularak reaksiyonun kararlı durum kinetiği incelenmiştir. pNPP konsantrasyonu 0,5 mM'den 7,0 mM'ye yükseltildiğinde tipik bir Michaelis-Menten grafiği elde edildi ve bu doygunluk profili, fulleren enzim mimiklerinin enzim benzeri kinetiği takip ettiğini göstermektedir. Bu grafikten hesaplanan kinetik parametrelere göre, F-His/F-Ser kombinasyonu, katalitik profilde önemli bir artışa sebep oldu (Şekil 35). Fulleren bazlı enzim mimiklerinin katalitik etkinliği, F-His/F-Ser enzim mimiklerinin ( $9.27 \pm 1.16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) tekli F-His ( $5.05 \pm 0.82 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) nano yapılarından katalitik olarak daha verimli olduğu Michaelis-Menten hesaplamaları ile gösterilmiştir (Şekil 36-d). Enzim kinetiği deneylerinin sonucunda, tasarlanan katalitik yapıların birlikte kullanımının, verimli bir hidroliz için optimize edilmiş, bir artışa yol açtığını gösterdi. Sadece F-Ser enzim mimiğinin uygulanması, polarize edici bir genel baz ünitesinin olmaması nedeniyle düşük bir katalitik aktivite profili gösterdi. Bu nedenle, oluşan nükleofilik aktivite, F-His enzim mimiği içeren grupların gerisinde kalmıştır. Histidin, birçok enzimatik reaksiyonda görev alan ana aktif birimlerden biridir, bu nedenle histidinin varlığı katalitik etki için kritiktir.

Tasarlanan enzim mimik yapının sadece monoesteraz substratı pNPP'ye özgü olup olmadığını tayin etmek için farklı bir substrat olan diesteraz substratı olan bis-pNPP ile de kataliz çalışması gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda, pNPP'ye benzer şekilde, fulleren enzim mimikleri, gruplar arasında benzer bir kinetik aktivite gözlemlendi. Fosfataz mimikleri, pNPP'ye kıyasla bis-pNPP'ye (F-His/F-Ser için  $1.57 \pm 0.63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ve F-His için  $1.04 \pm 0.47 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) karşı daha düşük bir katalitik etkinlik göstermiştir, tasarlanan nanoyapılar diesterazdan ziyade monoesteraz olarak daha iyi performansa sahiptir (Şekil 36-d).

Yeniden kullanılabilirlik enzimlerin bir diğer önemli özelliğidir. Tasarlanan enzim mimik yapıların birlikte olduğu F-His/F-Ser grubu için yeniden kullanılabilirlik deneyi yapıldı. F-His/F-Ser enzim mimiği bir diyaliz torbasına yerleştirildi ve yapay katalizörlerin yeniden kullanılabilirliği, torbaların substrat içeren solüsyonlara daldırılmasıyla test edildi. Beş döngü yeniden kullanımdan sonra, enzim mimiklerinin varlığında pNP veriminde yaklaşık %20'lik bir artış elde edildi. Enzim mimik bu nedenle en az altı döngü için yeniden kullanılabilir olduğu gösterilmiş oldu (Şekil 37).

Fosfatazlar, osteogenez sürecinde görevli en önemli enzimlerden birisidir. Organik fosfatlardan inorganik fosfat türetilmesi, kemik doku oluşumunun düzenlenmesi ve osteoblast farklılaşmasının indüklenmesi dahil olmak üzere birçok işleve sahiptir. Fosfatazlara yakın etkide bir fosfataz taklidi tasarlamak için, bu farklı işlevleri tek bir yapı üzerinde toplayabilmek önemlidir. Biyomineralizasyon çalışmalarında, osteorejeneratif uygulamalar için biyomineralize olabilen yüzeyler geliştirmek için enzim taklidi yapı kaplı biyoaktif yüzeyler kullanılmaktadır (Gulseren vd., 2015).

Çalışmada, fulleren bazlı fosfat mimikleri, biyomineralize olabilen substratlar hazırlamak için cam yüzeyler üzerine kaplandı. Hücresiz ortamda mineralizasyonu indüklemek için, fosfataz mimik kaplı yüzeyler kalsiyum kaynağı olarak  $\text{CaCl}_2$  ve fosfat kaynağı olarak  $\beta$ -gliserofosfat ile maruz bırakıldı. 7 gün inkübasyon sonucunda yüzeyde oluşan mineraller analiz edildi. F-His/F-Ser ve F-His kaplı yüzeyler, F-Ser ve kaplamasız cam yüzeylere kıyasla daha iyi mineral nodül oluşumu gösterdi (Şekil 38, Şekil 39, Şekil 40). Kaplanmış yüzeyler üzerinde biriken mineral nodüllerin kalsiyum içeriği, aynı zamanda Alizarin Kırmızısı ile boyandı. Boyamaların mikroskopik görüntüleri alındı. Görüntü alma işleminden sonra

ortamdaki kalsiyum oranını kantifiye etmek için setilpiridinyumklorit ile boya ortamdan ayrıştırıldı. Yapılan okuma sonucunda gruplar arasındaki deposit olan kalsiyum içeriğinin farkı gözlemlendi. Test edilen fosfataz-mimetik grupları arasında F-His/F-Ser'in en yüksek mineralizasyon kapasitesine sahip olduğu bulundu. Daha sonra F-His ve F-Ser takip etti. Yüzeysel mineralizasyonu sonuçlarında F-Ser grubunun geride kalması mineral indüklemesinde geride kaldığını ve F-His molekülünün mineralizasyonu indüklemesindeki önemini göstermektedir. Esansiyel bir aminoasit olan histidin, bir imidazol fonksiyonel grubuna sahiptir. İmidazol, enzim katalizli reaksiyonlarda ortamı koordine etmesinde yardımcı olur. Protonlanmamış imidazol, nükleofiliktir ve genel bir baz görevi görmektedir. Histidinin imidazol kısmı, bir proton donörü, bir proton alıcısı ve bir nükleofilik reaktif olarak hareket edebilir. Bu özelliklerinden dolayı imidazol gruplarının, mineral koordinasyonu ve bunun sonucunda iyon birikiminin uyarılması için aktif bölgeler olarak hizmet ettiği bilinmektedir. İmidazol gruplarının, mineral koordinasyonu ve bunun sonucunda oluşan iyon birikiminin uyarılması için aktif bölgeler olarak hizmet ettiği bilinmektedir (Remko, Fitz , ve Rode, 2010).

Kalsiyum minerallerinin yapısal oluşumunu göstermek için, boyanmamış yüzeyler SEM (Şekil 41, Şekil 42) ile incelenmiştir. SEM analizi, biriken nodüllerin kemik dokusuna benzeyen gözenekli yapılar gösterdiğini gözlemlendi. Mineralin kimyasal bileşimi Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ile incelendi ve biriken mineral  $\text{Ca(OH)}_2$  ve daha az miktarda CaP'den oluştuğu tespit edildi (Şekil 42 b-c-d).

Osteogenez esnasında fosfatazların ifadesi artar. Bu artan ekspresyon seviyeleri, osteoprogenitor hücrelerin olgun osteoblastlara dönüşümünü belirlemek için kullanılabilir. Fosfataz enziminin aktivitesindeki artışla ortamdaki  $\text{P}_i$  oranında bir artış oluşur. Oluşan inorganik fosfattaki artış dolaylı yoldan ortamdaki kalsiyum minerali miktarında artmasına sebep olur. Bu nedenle kalsiyum mineral birikimi osteoblast indüksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Olgun osteoblastlar yüksek oranda mineralize hücrelerdir ve bu hücreler mineralize kemik dokusunun ana bileşenleridir. Tasarlanan enzim mimiklerinin osteogenez indüksiyon kapasitesini test etmek için, osteoprogenitor hücre olarak SaOS-2 ve indüklemesi daha zor olduğu düşünülen BM-MSC'ler seçildi. Kök hücrelerin farklı hücrelere farklılaşabilme özelliği onların rejeneratif tıp alanındaki kullanımını artırmaktadır.

Ancak büyümeleri için özel ortamlar gerektirmeleri ve farklılaşmalarının uzun zaman alması uygulanabilirliklerini sınırlandırabilmektedir.

Uygulanan malzemelerin öncelikle hücreler üzerinde biyoyumluluğu analiz edildi ve %80 in üzerinde hücre canlılığı tespit edildi (Şekil 43 ve 44). SaOS-2 hücrelerine ve pluripotent BM-MS' hücrelerine uygulanan enzim mimik yapılar, hücrelerin morfolojisini osteoblast benzeri bir morfolojiye farklılaştırarak ortamdaki biyomineral birikimini arttırdı. Karbon hibrit enzim mimik yapıların neden olduğu mineral birikimi, Alizarin Kırmızısı boyaması ile gösterildi. SaOS-2 hücrelerine enzim mimik yapının uygulanması mineral birikimi ve kemik benzeri nodüllerin artışı gözlemlenmemizi sağladı (Şekil 45-49).

Mikroskop görüntüleri analiz edildiğinde, fullerenenzim uygulamasının SaOS-2 hücrelerinin kalsiyum mineral birikimini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlenmiştir. Biyomineralizasyon denemeleri esnasında, fullerenenzim ile muamele edilmiş hücreler hem standart kültür ortamında hem de osteogenik ortamda kültürlendi. Yapılan denemelerde fosfataz taklidi fulleren enzimlerin, osteogenik takviyenin yokluğunda bile osteogenik farklılaşmayı indükleyebildiği anlaşılmıştır. Ayrıca, fosfataz taklidi fulleren enzimler, standart kültür ortamında kültürlenen hücrelerde nispeten daha yüksek mineralizasyona neden oldu. Malzeme uygulamasının 3. gününde herhangi bir mineralizasyon indüklemesi ve gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi. Biyomineralizasyon farklılıkları ve olgun osteoblast hücre görüntüsü 7.günde gözlemlenmeye başladı. 7. ve 12. gün mikroskop görüntülerine göre F-His ve F-His/F-Ser, hücresiz mineralizasyon deneyleriyle tutarlı olan benzer biyomineralizasyon seviyelerine neden olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, F-Ser'in katalitik etki için çok önemli olduğunu, ancak yapılan denemelere göre biyomineralizasyon sürecine önemli bir katkısı olmadığını göstermektedir.

SaOS-2 sonuçlarına benzer şekilde, BM-MS'lere uygulanan fulleren enzimler biyomineralizasyonu, malzeme uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde indükledi. BM-MS hücreleriyle SaOS-2 hücrelerinde yapıldığı gibi hem standart kültür ortamında hem de osteogenik ortamda kültürlendiği denemeler yapıldı. Deneme sonuçlarından elde edilen mikroskop sonuçlarına göre osteogenik ortam olmadanda indüksiyonun gerçekleştiğini söylemek mümkündür. Denemeler 7 ve 14 günlük olarak yapıldı. 7. günde kalsiyum mineral birikimi ve kemik benzeri

nodül oluşumu gözlemlendi. 14. günde ise mineral birikimi ve nodül oluşumunun artarak devam ettiği gözlemlendi. Mineralizasyon görselleri akrinin turuncusu floresans boyaması ile desteklendi. Boyama genel hücre görüntüsü, dolaylı olarak oluşan olgun osteoblast hücre görüntüsünü görüntülemek için yapıldı. Bu sayede mineral birikimi ve osteoblast benzeri görüntü floresans ışına ile gösterilmiş oldu. Kontrol grubu ile enzim mimik uygulanan grup arasındaki morfolojik fark, elde edilen 2D ve 3D floresan görüntüleri ile gösterildi. Bu sonuç mineralize olan alanın ve osteoblast benzeri hücre topluluğunu hem 2D hem de 3D olarak gözlemlememizi sağladı. F-His/F-Ser ve F-His ile muamele edilen hücreler, F-Ser grubuna kıyasla daha yoğun kemik benzeri kümelerle yol açar. Bu sonuçlar, F-His grubunun osteogenik indüksiyon için çok önemli bir rolü olduğunu, F-Ser'in *in vitro* biyomineralizasyon üzerinde çok küçük bir etkiye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 50, Şekil 51, Şekil 52, Şekil 53).

Osteogenez, fizyolojik değişimlere cevap olarak düzenleyici sinyallerin gen aktivasyonunu gerektirir. Osteoprogenitor hücrelerin osteoblast soyuna bağlılığı çeşitli sinyaller tarafından yönetilir. Runx2 ve COL-I, osteoblast farklılaşmasını izlemek için kullanılan osteoblastta özgü belirteçlerden bazılarıdır. Runx2 osteoblast farklılaşma süreci esnasında gen ekspresyonunun programlanmasını kontrol eden bir transkripsiyonel aktivatör olarak işlev görür. Bu nedenle Runx2, osteogenik farklılaşma ve ilgili genlerin düzenlenmesi ile bağlantılı gen bölgesidir. Col I, ise mineralizasyonun başladığını yükselmesi ile doyumluk aşamasına geldiği belirten osteoindüksiyonla ilişkili bir gen bölgesidir.

Tasarlanan fulleren enzim yapıların hücreler üzerine muamele edilmesiyle oluşan gen ekspresyon profilleri, hücrelerin gen ekspresyonunda ne yönde bir değişiklik oluşturduğunu daha iyi anlamak için qRT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Yapılan mineralizasyon ve qRT-PCR deneyleriyle enzim mimik yapıların, hücrelerin osteoblastlara yönelimini kolaylaştırdığı ve hücre yüzeyinde matris mineralizasyonunun indüklendiği gösterildi. 3. günün osteoblastta özgü transkripsiyon belirteçlerinin aktivasyonu için çok erken olduğu saptandı. 7. günde F-His/Ser ve F-Ser için, osteoblast farklılaşmasının erken belirteci olan Runx2 ifadenmesinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi. 7. günde gözlemlenen ekspresyondaki artış, osteoblast bağlılığının ve olgunlaşmamış osteoblast oluşumunun indüksiyonu olarak yorumlanabilir. F-His/F-Ser, 7. gün

verilerinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında en yüksek Runx2 ekspresyon seviyesini veren grup oldu. Ayrıca, 12. günde histidin içeren grupların Runx2 ekspresyon seviyesinin, malzeme uygulanmayan kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi. Ekspresyon seviyesindeki bu azalma, osteoblast matris olgunlaşmasına bağlanabilir. Aynı zamanda olgunlaşma sonrasında ALP enzimidaki gibi 'feedback' mekanizmasının çalıştığını düşündürmektedir. 12. gün deneylerindeki F-Ser grubundaki Runx2 ekspresyon seviyelerindeki artışın devam etmesi osteoblast farklılaşmasının henüz başlangıç aşamasında olduğunu düşündürmektedir. Bu, histidin grubu olmayan grup F-Ser grubunun yavaş katalizleme performansından kaynaklandığını göstermektedir.

COL-I, osteoblast farklılaşması için bir başka kritik faktördür. Kollajen, kemik dokusu oluşumu için biyomineralize edilebilir bir yapı iskeleti görevi gördüğünden, hücre dışı matris olgunlaşma süreci sırasında yüksek oranda ifade edilmektedir. Bu nedenle, COL-I, osteoblast olgunlaşmasının için temel bir transkripsiyon faktörüdür. 7. günde, COL-I ekspresyonu, osteoblast farklılaşmasını gösteren ekspresyon artışları gözlemlendi ile Runx-2 gen bölgesine benzer bir profil sergiledi. 12. günde, devam eden biyomineralizasyon sürecinin bir sonucu olarak COL-I ekspresyonundaki artış aktif şekilde devam etmekteydi. 12. günde F-His içeren gruplardaki COL-I ekspresyonundaki artışın yanında Runx2 ifadesindeki azalma matriks mineralizasyonun son aşamalarında olduğunu anlamamızı sağlamaktadır.

SaOS-2 için yapılan gen ekspresyon analizinin devamında BM-MSC hücre içinde analiz yapıldı. BM-MSC hücreleriyle yapılan Alizarin Kırmızısı boyama sonuçlarına göre, uygulanan malzeme kaynaklı biyomineralizasyon ve hücre dışı matris olgunlaşmasının 7. günde başladığı görülmektedir. Biyomineralizasyon sonuçlarına göre, kemik doku oluşumunu yeterince uyarma kapasitesi F-His ve F-His/F-Ser grupları için önemli ölçüde bir farklılık tespit edilememiştir. SaOS-2 ile karşılaştırıldığında, BM-MSC'ler, enzim mimik uygulamasına yanıt olarak gecikmiş ekspresyon profili sergiledi. Osteoblasta özgü genlerin ekspresyon seviyeleri, herhangi bir osteogenik indükleyici olmadan 14. günde artış göstermeye devam etmektedir. Bu nedenle sadece fulleren enziminin uygulaması kök hücreleri osteoblast başkalaşımına yönlendirmek için yeterlidir. F-His ve F-His/F-Ser, Runx2 ve COL-I'de 14. günde istatistiksel olarak anlamlı bir yukarı regülasyon göstermiştir (Şekil 56). 7. günde önemli mineral birikimine rağmen, kök hücrelerin gen

düzeyinde osteogenik farklılaşması henüz aktive edilememiştir. Bu sonuç, BM-MSC hücrelerine uygulanan malzemenin SaOS-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında gecikmiş bir profil sergilediğini göstermektedir.

Osteorejenerasyon çalışmalarında, farklılaşmayı desteklemek için yaygın olarak osteogenik kültür kullanılır. Kullanılan hücre kültürü koşullarının gen ekspresyon seviyelerine olan etkisi, bir fosfat kaynağı olarak tek başına  $\beta$ -gliserofosfat ile desteklenen osteogenik ortam, normal ortam ve deksametazon, ascorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat içeren osteogenik ortam ile ayrıca analiz edildi (Şekil 55). Osteoblast farklılaşma faktörlerinin ifadesi, her kültür koşulu için yakın düzeyde olduğu bulundu. Bu, kullanılan fosfataz mimiklerinin osteogenik takviyelerin yokluğunda osteoblast farklılaşmasını indükleyebildiğini göstermektedir. Ayrıca,  $\beta$ -gliserofosfatın biyomineralizasyon üzerindeki etkisi, kalsiyum boyama ile araştırıldı ve daha yüksek fosfat konsantrasyonunun bir sonucu olarak yoğun mineral birikimleri gözlemlendi (Şekil 46). Bu sonuç, 7. günde  $\beta$ -gliserofosfat varlığında yükselen COL-I ekspresyonu ile tutarlıdır.

Bu çalışmada, alkalen fosfataz enzim mimikleri olarak aminoasitlerle fonksiyonlandırılmış kendi kendine toparlanıp çoklu aktif bölge oluşturabilen fulleren nanokatalistler kullanıldı. Fulleren bazlı enzim mimikleri, yapılan enzim kinetiği çalışmalarında yüksek katalitik verimliliklerle monoesteraz ve diesteraz aktivitesini mimik edebildi. Gözlemlenen katalitik aktivite sonucunda osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerin ispatı için hücre kültürü deneyleri yapıldı. Hücre kültürü deneyleri kinetik deneylerinin sonuçlarını destekleyen seviyede sonuçlandı. Tasarlanan enzim mimik yapıların gen düzeyinde bir etkisinin olup olmadığını gözlemek için qRT-PCR deneyleri yapıldı. Uygulanan malzeme dışında ek bir biyokimyasal desteğe ihtiyaç duymadan hücrelerin gen seviyelerinin osteogenik yolağa başarıyla yönlendirildiği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, alkalen fosfataz enzimin aktif bölgelerinden ilham alınarak fulleren molekülleri fonksiyonlandırılmasıyla biyoyumlu bir nanokatalist geliştirilmiş oldu. Tasarlanan bu yeni molekül, fulleren enzim mimiklerinin sadece yapay enzim çalışmaları alanında değil, bu çalışmada olduğu gibi biyorejeneratif uygulamalarda da potansiyel kullanımının olabileceğini göstermiş oldu.

## KAYNAKÇA

- Aehle, W. (2007). *Enzymes in industry: production and applications*: John Wiley & Sons.
- Aksay, I. A., Trau, M., Manne, S., Honma, I. I., Yao, N., Zhou, L., et al. Gruner, S. M. (1996). Biomimetic Pathways for Assembling Inorganic Thin Films. *Science*, 273(5277), 892-898.
- Ali, S. S., Hardt, J. I., Quick, K. L., Kim-Han, J. S., Erlanger, B. F., Huang, T. T., et al. Dugan, L. L. (2004). A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic Biol Med*, 37(8), 1191-1202.
- Ali, S. Y., Sajdera, S. W., & Anderson, H. C. (1970). Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(3), 1513-1520.
- Andrievsky, G., Klochkov, V., Bordyuh, A., & Dovbeshko, G. (2002). Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C60 fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 364(1-2), 8-17.
- Anilkumar, P., Lu, F., Cao, L., G Luo, P., Liu, J.-H., Sahu, S., et al. Sun, Y.-P. (2011). Fullerenes for applications in biology and medicine. *Current medicinal chemistry*, 18(14), 2045-2059.
- Arbogast, J. W., Darmany, A. P., Foote, C. S., Diederich, F., Whetten, R., Rubin, Y., et al. Anz, S. J. (1991). Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C60). *The Journal of Physical Chemistry*, 95(1), 11-12.
- Astefanei, A., Núñez, O., Galceran, M. T., Kok, W. T., & Schoenmakers, P. J. (2015). Aggregation behavior of fullerenes in aqueous solutions: a capillary electrophoresis and asymmetric flow field-flow fractionation study. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(26), 8035-8045.
- Avdeev, M., Khokhryakov, A., Tropin, T., Andrievsky, G., Klochkov, V., Derevyanchenko, L., et al. Korobov, M. (2004). Structural features of molecular-colloidal solutions of C60 fullerenes in water by small-angle neutron scattering. *Langmuir*, 20(11), 4363-4368.
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 744-764.
- Blakemore, R. P. (1982). Magnetotactic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 36(1), 217-238.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 8 - Enzymes. In A. Blanco ve G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 153-175): Academic Press.
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., & Prato, M. (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European journal of medicinal chemistry*, 38(11-12), 913-923.
- Boyce, S., & Tipton, K. (2001). Enzyme Classification and Nomenclature. In.
- Bracher, P. J., & Schuster, D. I. (2002). Electron Transfer in Functionalized Fullerenes. In D. M. Guldi ve N. Martin (Eds.), *Fullerenes: From Synthesis to Optoelectronic Properties* (pp. 163-212). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Brès, E. F., & Hutchison, J. L. (2002). Surface structure study of biological calcium phosphate apatite crystals from human tooth enamel. *J Biomed Mater Res*, 63(4), 433-440.
- Breslow, R., & Overman, L. E. (1970). "Artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity. *Journal of the American Chemical Society*, 92(4), 1075-1077.
- Catry, M. A., & Madder, A. (2007). Synthesis of functionalised nucleosides for incorporation into nucleic acid-based serine protease mimics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(1), 114-129.
- Chen, T., Li, Y.-Y., Zhang, J.-L., Xu, B., Lin, Y., Wang, C.-X., et al. Xu, S.-Q. (2011). Protective effect of C60-methionine derivate on lead-exposed human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of applied toxicology : JAT*, 31, 255-261.
- Chen, Z., Ma, L., Liu, Y., & Chen, C. (2012). Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics. *Theranostics*, 2(3), 238-250.
- Clarke, K. G. (2013). *Bioprocess engineering: An introductory engineering and life science approach*: Elsevier.
- Cowan, J. A. (2001). Chemical nucleases. *Current opinion in chemical biology*, 5(6), 634-642.
- Dai, X. Y., Zhao, M. M., Cai, Y., Guan, Q. C., Zhao, Y., Guan, Y., et al. Wang, X. (2013). Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney Int*, 83(6), 1042-1051.
- Deguchi, S., Alargova, R. G., & Tsujii, K. (2001). Stable dispersions of fullerenes, C60 and C70, in water. Preparation and characterization. *Langmuir*, 17(19), 6013-6017.
- Del Fattore, A., Teti, A., & Rucci, N. (2012). Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 2302-2321.
- Dev, A., Srivastava, A. K., & Karmakar, S. (2018). New Generation Hybrid Nanobiocatalysts: The Catalysis Redefined. In *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 217-231): Elsevier.
- Dong, L., Miao, Q., Hai, Z., Yuan, Y., & Liang, G. (2015). Enzymatic Hydrogelation-Induced Fluorescence Turn-Off for Sensing Alkaline Phosphatase in Vitro and in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6475-6478.
- Dorozhkin, S. V., & Epple, M. (2002). Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(17), 3130-3146.
- Dugan, L. L., Gabrielsen, J. K., Yu, S. P., Lin, T. S., & Choi, D. W. (1996). Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis*, 3(2), 129-135.
- Dugan, L. L., Turetsky, D. M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almlı, C. R., et al. Lin, T. S. (1997). Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17), 9434-9439.
- Fendri, A., Louati, H., Sellami, M., Gargouri, H., Smichi, N., Zarai, Z., et al. Gargouri, Y. (2012). A thermoactive uropygial esterase from chicken: purification, characterisation and synthesis of flavour esters. *International journal of biological macromolecules*, 50(5), 1238-1244.
- Gao, L., & Yan, X. (2016). Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology. *Science China Life Sciences*, 59(4), 400-402.
- Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., et al. Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2(9), 577-583.

- Gharbi, N., Pressac, M., Hadchouel, M., Szwarc, H., Wilson, S. R., & Moussa, F. (2005). [60]Fullerene is a Powerful Antioxidant in Vivo with No Acute or Subacute Toxicity. *Nano Letters*, 5(12), 2578-2585.
- Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., et al. Aikawa, E. (2016). Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1323-1336.
- Golub, E. E. (2011). Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*, 33(5), 409-417.
- Goodarzi, S., Da Ros, T., Conde, J., Sefat, F., & Mozafari, M. (2017). Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today*, 20(8), 460-480.
- Gulseren, G., Yasa, I. C., Ustahuseyin, O., Tekin, E. D., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2015). Alkaline Phosphatase-Mimicking Peptide Nanofibers for Osteogenic Differentiation. *Biomacromolecules*, 16(7), 2198-2208.
- Haarhaus, M., Brandenburg, V., Kalantar-Zadeh, K., Stenvinkel, P., & Magnusson, P. (2017). Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat Rev Nephrol*, 13(7), 429-442.
- Herries, D. G. (1981). Alkaline phosphatase: by R B McComb, G N Bowers, Jr and S Posen. pp 986. Plenum Press, New York and London. 1979. \$75 ISBN 0-306-40214-9. *Biochemical Education*, 9(2), 76.
- Hildén, K., Hakala, T. K., & Lundell, T. (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology letters*, 31(8), 1117-1128.
- Hou, L., Jiang, G., Sun, Y., Zhang, X., Huang, J., Liu, S., et al. Zhao, S. (2019). Progress and Trend on the Regulation Methods for Nanozyme Activity and Its Application. *Catalysts*, 9(12), 1057.
- Hu, L., Zhang, C., Zeng, G., Chen, G., Wan, J., Guo, Z., et al. Liu, J. (2016). Metal-based quantum dots: synthesis, surface modification, transport and fate in aquatic environments and toxicity to microorganisms. *RSC Advances*, 6(82), 78595-78610.
- Hughes, J. M. (1996). Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates By J. C. Elliot (The London Hospital Medical College). Elsevier: Amsterdam. 1994. xii + 389 pp. ISBN 0-444-81582-1. *Journal of the American Chemical Society*, 118(12), 3072-3072.
- Injac, R., Prijatelj, M., & Strukelj, B. (2013). Fullerenol Nanoparticles: Toxicity and Antioxidant Activity. In D. Armstrong ve D. J. Bharali (Eds.), *Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols* (pp. 75-100). Totowa, NJ: Humana Press.
- Jaeger, K.-E. (2004). Protein technologies and commercial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(15), 269-271.
- Jafvert, C. T., & Kulkarni, P. P. (2008). Buckminsterfullerene's (C60) octanol- water partition coefficient (K<sub>ow</sub>) and aqueous solubility. *Environmental science & technology*, 42(16), 5945-5950.
- James, A. W., & Péault, B. (2019). Perivascular Mesenchymal Progenitors for Bone Regeneration. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(6), 1221-1228.
- Kadish, K. M., & Ruoff, R. S. (2000). *Fullerenes: chemistry, physics, and technology*: John Wiley & Sons.
- Kamanina, N. (2018). *Introductory Chapter: Why the Study of Fullerenes is so Important?*

- Kim, E. E., & Wyckoff, H. W. (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 218(2), 449-464.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kirkham, G., & Cartmell, S. (2007). Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. *Topics in Tissue Engineering*, 3.
- Komoda, T., & Matsunaga, T. (2015). Chapter 3 - Constituents of the Human Body. In T. Komoda ve T. Matsunaga (Eds.), *Biochemistry for Medical Professionals* (pp. 7-24). Boston: Academic Press.
- Kozlenkov, A., Manes, T., Hoylaerts, M. F., & Millán, J. L. (2002). Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 277(25), 22992-22999.
- Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos, K., & Huffman, D. R. (1990). Solid C60: a new form of carbon. *Nature*, 347(6291), 354-358.
- Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., & Smalley, R. E. (1985). C60: Buckminsterfullerene. *Nature*, 318(6042), 162-163.
- Krusic, P. J., Wasserman, E., Keizer, P. N., Morton, J. R., & Preston, K. F. (1991). Radical Reactions of C<sub>60</sub>. *Science*, 254(5035), 1183.
- Labille, J., Masion, A., Ziarelli, F., Rose, J., Brant, J., Villieras, F., et al. Bottero, J.-Y. (2009). Hydration and dispersion of C60 in aqueous systems: The nature of water– fullerene interactions. *Langmuir*, 25(19), 11232-11235.
- Lao, F., Li, W., Han, D., Qu, Y., Liu, Y., Zhao, Y., & Chen, C. (2009). Fullerene derivatives protect endothelial cells against NO-induced damage. *Nanotechnology*, 20(22), 225103.
- Lee, J., Mackeyev, Y., Cho, M., Li, D., Kim, J.-H., Wilson, L. J., & Alvarez, P. J. J. (2009). Photochemical and Antimicrobial Properties of Novel C60 Derivatives in Aqueous Systems. *Environmental science & technology*, 43(17), 6604-6610.
- Liszka, M. J., Clark, M. E., Schneider, E., & Clark, D. S. (2012). Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 3, 77-102.
- Liu, B., & Liu, J. (2017). Surface modification of nanozymes. *Nano Research*, 10(4), 1125-1148.
- Liu, G. F., Filipović, M., Ivanović-Burmazović, I., Beuerle, F., Witte, P., & Hirsch, A. (2008). High catalytic activity of dendritic C60 monoadducts in metal-free superoxide dismutation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(21), 3991-3994.
- Lowe, D., Sanvictores, T., & John, S. (2017). Alkaline phosphatase.
- Luetz, S., Giver, L., & Lalonde, J. (2008). Engineered enzymes for chemical production. *Biotechnology and bioengineering*, 101(4), 647-653.
- Ma, Y., Chen, X., Sun, M., Wan, R., Zhu, C., Li, Y., & Zhao, Y. (2008). DNA cleavage function of seryl-histidine dipeptide and its application. *Amino Acids*, 35(2), 251-256.
- Madder, A., Li, L., De Muynck, H., Farcy, N., Van Haver, D., Fant, F., et al. De Clercq, P. J. (2002). Evaluation of a Two-Stage Screening Procedure in the Combinatorial Search for Serine Protease-Like Activity. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 4(6), 552-562.
- Mahamid, J., Aichmayer, B., Shimoni, E., Ziblat, R., Li, C., Siegel, S., et al. Addadi, L. (2010). Mapping amorphous calcium phosphate transformation into

- crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), 6316-6321.
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12748.
- Makha, M., Purich, A., Raston, C. L., & Sobolev, A. N. (2006). Structural diversity of host-guest and intercalation complexes of fullerene C<sub>60</sub>. *European journal of inorganic chemistry*, 2006(3), 507-517.
- Manea, F., Houillon, F. B., Pasquato, L., & Scrimin, P. (2004). Nanozymes: gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(45), 6165-6169.
- Mann, S. (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332(6160), 119-124.
- Margadonna, S., & Prassides, K. (2001). Fullerenes. In K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilshner, E. J. Kramer, S. Mahajan, & P. Veyssi re (Eds.), *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* (pp. 3379-3383). Oxford: Elsevier.
- McCarthy, A. D., Cortizo, A. M., Segura, G. G., Bruzzone, L. C., & Etcheverry, S. B. (1998). Non-enzymatic glycosylation of alkaline phosphatase alters its biological. *Molecular and cellular biochemistry*, 181(1), 63-69.
- Meng, H., Xing, G., Blanco, E., Song, Y., Zhao, L., Sun, B., et al. Zhao, Y. (2012). Gadolinium metallofullerenol nanoparticles inhibit cancer metastasis through matrix metalloproteinase inhibition: imprisoning instead of poisoning cancer cells. *Nanomedicine*, 8(2), 136-146.
- Millán, J. L. (2013). The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*, 93(4), 299-306.
- Nakamura, E., & Isobe, H. (2003). Functionalized Fullerenes in Water. The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience. *Accounts of Chemical Research*, 36(11), 807-815.
- Nakano, T., Yagi, Y., Miyahara, M., Kaminura, A., Kawatsura, M., & Itoh, T. (2011). Chemo-enzymatic synthesis of a multi-useful chiral building block molecule for the synthesis of medicinal compounds. *Molecules*, 16(8), 6747-6757.
- Nomura, A., & Sugiura, Y. (2004). Sequence-selective and hydrolytic cleavage of DNA by zinc finger mutants. *J Am Chem Soc*, 126(47), 15374-15375.
- Nothling, M. D., Xiao, Z., Hill, N. S., Blyth, M. T., Bhaskaran, A., Sani, M.-A., et al. Connal, L. A. (2020). A multifunctional surfactant catalyst inspired by hydrolases. *Science advances*, 6(14), eaaz0404-eaaz0404.
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M. J., et al. Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), 77-116.
- Osuna, S., Swart, M., & Sol , M. (2010). On the mechanism of action of fullerene derivatives in superoxide dismutation. *Chemistry*, 16(10), 3207-3214.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., et al. Owen, M. J. (1997). Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell*, 89(5), 765-771.
- Parker, A. R., & Townley, H. E. (2007). Biomimetics of photonic nanostructures. *Nat Nanotechnol*, 2(6), 347-353.

- Prylutskiy, Y. I., Petrenko, V., Ivankov, O., Kyzyma, O., Bulavin, L., Litsis, O., et al. Ritter, U. (2014). On the origin of C60 fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*, 30(14), 3967-3970.
- Remko, M., Fitz, D., & Rode, B. M. (2010). Effect of metal ions (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>) and water coordination on the structure and properties of l-histidine and zwitterionic l-histidine. *Amino Acids*, 39(5), 1309-1319.
- Richardson, C. F., Schuster, D. I., & Wilson, S. R. (2000). Synthesis and characterization of water-soluble amino fullerene derivatives. *Org Lett*, 2(8), 1011-1014.
- Rondags, A., Yuen, W. Y., Jonkman, M. F., & Horváth, B. (2017). Fullerene C60 with cytoprotective and cytotoxic potential: prospects as a novel treatment agent in Dermatology? *Experimental Dermatology*, 26(3), 220-224.
- Rossi, M., Battafarano, G., De Martino, V., Scillitani, A., Minisola, S., & Del Fattore, A. (2021). Looking for new anabolic treatment from rare diseases of bone formation. *J Endocrinol*, 248(2), R29-r40.
- Roubaty, C., & Portmann, P. (1988). Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate, D-glucose, and D-glucose-6-phosphate. *Pflügers Archiv*, 412(5), 482-490.
- Ruoff, R., Tse, D. S., Malhotra, R., & Lorents, D. C. (1993). Solubility of fullerene (C60) in a variety of solvents. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(13), 3379-3383.
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast differentiation at a glance. *Medical science monitor basic research*, 22, 95.
- Sarikaya, M. (1999). Biomimetics: Materials fabrication through biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14183.
- Schröder, H. C., Kurz, L., Müller, W. E., & Lorenz, B. (2000). Polyphosphate in bone. *Biochemistry (Mosc)*, 65(3), 296-303.
- Shui, C., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (2003). Changes in Runx2/Cbfa1 Expression and Activity During Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(2), 213-221.
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEY reports*, 3.
- Sun, Y.-P., Lawson, G. E., Huang, W., Wright, A. D., & Moton, D. K. (1999). Preparation and characterization of highly water-soluble pendant fullerene polymers. *Macromolecules*, 32(26), 8747-8752.
- Suzuki, O. (2010). Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3379-3387.
- Tao, J., & Xu, J.-H. (2009). Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current opinion in chemical biology*, 13(1), 43-50.
- Taylor, R., Hare, J. P., Abdul-Sada, A. a. K., & Kroto, H. W. (1990). Isolation, separation and characterisation of the fullerenes C60 and C70: the third form of carbon. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*(20), 1423-1425.
- Tenenbaum, H., Torontali, M., & Sukhu, B. (1992). Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone*, 13(3), 249-255.

- Tokuyama, H., Yamago, S., Nakamura, E., Shiraki, T., &Sugiura, Y. (1993). Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 115(17), 7918-7919.
- Villa-Bellosta, R., Wang, X., Millán, J. L., Dubyak, G. R., &O'Neill, W. C. (2011). Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(1), H61-H68.
- Wang, J., Huang, R., Qi, W., Su, R., Binks, B. P., &He, Z. (2019). Construction of a bioinspired laccase-mimicking nanozyme for the degradation and detection of phenolic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 254, 452-462.
- Wang, Q., Wei, H., Zhang, Z., Wang, E., &Dong, S. (2018). Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 218-224.
- Wang, X., Guo, W., Hu, Y., Wu, J., &Wei, H. (2016). Carbon-Based Nanomaterials for Nanozymes. In (pp. 7-29).
- Wang, X., Hu, Y., &Wei, H. (2016). Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 3(1), 41-60.
- Wang, Z., Liu, H., Yang, S. H., Wang, T., Liu, C., &Cao, Y. C. (2012). Nanoparticle-based artificial RNA silencing machinery for antiviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12387.
- Wei, H., &Wang, E. (2008). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2250-2254.
- Wei, H., &Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(14), 6060-6093.
- Wu, H.-C., Chang, X., Liu, L., Zhao, F., &Zhao, Y. (2010). Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(6), 1036-1052.
- Wu, J., Wang, X., Wang, Q., Lou, Z., Li, S., Zhu, Y., et al. Wei, H. (2019). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II). *Chemical Society Reviews*, 48.
- Wu, M., Chen, G., &Li, Y.-P. (2016). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research*, 4(1), 16009.
- Xiong, X., Huang, Y., Lin, C., Liu, X. Y., &Lin, Y. (2019). Recent advances in nanoparticulate biomimetic catalysts for combating bacteria and biofilms. *Nanoscale*, 11(46), 22206-22215.
- Xu, G., Yao, N., Aksay, I. A., &Groves, J. T. (1998). Biomimetic Synthesis of Macroscopic-Scale Calcium Carbonate Thin Films. Evidence for a Multistep Assembly Process. *Journal of the American Chemical Society*, 120(46), 11977-11985.
- Yadav, B., &Kumar, R. (2008). Structure, properties and applications of fullerenes. *International Journal of Nanotechnology and Applications*, 2(1), 15-24.
- Yadav, J. (2018). *Fullerene: Properties, Synthesis and Application*.
- Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z., &Zhao, Y. (2011). Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*, 3(2), 362-382.

- Zhang, C., Xue, X., Luo, Q., Li, Y., Yang, K., Zhuang, X., et al. Liang, X. J. (2014). Self-assembled Peptide nanofibers designed as biological enzymes for catalyzing ester hydrolysis. *ACS Nano*, 8(11), 11715-11723.
- Zhang, F., Inganäs, O., Zhou, Y., & Vandewal, K. (2016). Development of polymer–fullerene solar cells. *National Science Review*, 3(2), 222-239.
- Zhou, X., Cui, Y., Zhou, X., & Han, J. (2012). Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models. *International Journal of Biological Sciences*, 8(6), 778-790.



## **EK 1**

### **Telif Hakkı İzinleri**

Şekil 1, “Telif hakkı, Experimental Dermatology Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 9, “Telif hakkı, MDPI, Catalysis Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 10, “Telif hakkı, Free Radical Biology and Medicine Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 11, “Telif hakkı, Free Radical Biology and Medicine Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 12, “Telif hakkı, Amino Acids Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 16, “Telif hakkı, Nature Reviews Nephrology Dergisi izniyle alınmıştır.”

Şekil 17, “Telif hakkı, Elsevier Books Yayınlarının izniyle alınmıştır.”

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: D\*\*\*\*a Y\*\*\*\*\*İ

Doğum Yeri ve Tarihi: K\*\*\*\*a, 1\*\*4

Lise: Erbil Kuru Lisesi (2008-2012)

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü (2012-2016)

Yüksek Lisans: Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2019-2022)

Staj Yapılan Yerler: Selçuk Üniversitesi Hastahanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı yirmi iş günü

Selçuk Üniversitesi Bitki Biyoteknoloji Bölümünde yirmi iş günü

Bursiyer Olarak Yürüttüğü Proje: Fosfataz Taklidi Fullerenenzim Nanoyapıların Geliştirilmesi ve Rejeneratif Uygulamaları isimli 218Z021 nolu 3501 TÜBİTAK projesinde 2 sene bursiyerlik (2019-2021)