Eksensel Koordinasyona Sahip Fitalosiyaninlerin Anti-fibrilojenik Ajan Olarak İncelenmeleri ve Amiloid Agregatlarının Tayininde SERS Probları Olarak Kullanımı

Program Kodu: 2512

Proje No: 114Z464

Proje Yürütücüsü:
Doç.Dr. Nuriye AKBAY

Eş Yütürücü:
Dr. Vladyslava B. Kovalska

Araştırmacı(lar):
Prof. Dr. Mustafa ÇULHA
Prof. Dr. Sergiy YARMOLUK
Dr. Mykhaylo LOSYTSKYY
Arş.Gör. Svitlana CHERNII

OCAK 2017
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20'den fazla önemli hastalığın patogenezinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün başlangıç proteini olan öncülü farklıdır. Bu nedenle bu tarz hastalıklarlarda proteinlerden amiloid fibrillere gidiş mekanizmasına etki tedavi araştırmalarının hedefindedir. Nörodejeneretif hastalıkların ilaç tedavisi için geliştirilen yaklaşımlar arasında agregasyonu engelleyen küçük moleküllerin kullanımı söz konusudur. Proje kapsamında eksensel koordinasyona sahip dört makrosiklik metal bileşiğinin insülin amiloid fibrilleri tayininde SERS probu olarak etkinlikleri incelenmiştir. Bileşiklerden üç tanesi hafniyum bir tanesi ise zirkonyum metal bileşiğidir. Yapılan çalışmalar sonucu dört fitalosiyanin bileşiğinin metal ile yüzey zenginleştirilmesi sonucu elde edilen SERS spektrumlarında da şiddet artışının 10^4 mertebede olduğu gözlenmiştir. İncelenen fitalosiyaninlerden klorürür içeren hafniyum bileşiğinin SERS spektrumlarında fibriler insulin eklenmesi sonucu 1310 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1}'deki bantlarında genişleme olduğu gözlenmiştir. Fibriler insulin tayininde bu bantlardan faydalanabilineceği düşünülmektedir. Sinyal artışlarının insulin fibrilinin derişimine bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Bu proje **TÜBİTAK-NASU** ikili işbirlikleri çerçevesinde **114Z464** nolu proje olarak **TÜBİTAK** tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **iii**

TABLO LİSTESİ ..... **vi**

ÖZET ..... **vii**

ABSTRACT ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR **5**

3.1. Reaktif ve çözeltilerin hazırlanması 5

3.2. Kullanılan cihazlar 6

3.3 Gümüş nanopartiküllerin eldesi 6

4. BULGULAR ve TARTIŞMA **8**

4.1. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu 8

4.2. Fitalosiyaninlerin Raman spektrumları 9

4.3. Fitalosiyaninlerin fibriler ve monomer insulin varlığındaki yüzey zenginleştirilmiş Raman spektrumları 14

4.4. $PcHfCl_2$ fitalosiyanin bileşiğinin insülin fibrili ile etkileşimlerinin SERS sinyallerine derişimin etkisi 28

5. SONUÇLAR **29**

7. REFERANSLAR **30**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Amiloid fibrillerin oluşumu 4

Şekil 2.2. Aβ(1-40) fibrillerinin yapısal şekli 4

Şekil 4.1. Lee-Meisel protokolü ile elde edilen AgNP'ler 8

Şekil 4.2. Sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu..... 8

Şekil 4.3. Eksensel ligand olarak kinoliyum stiril (PcHfQStr; sağ, üst), klor atomları ($PcHfCl_2$; sol, üst), stirilsiyanin (Pc-126; sol, alt) içeren hafniyum fitalosiyanin ve iki betaketoenol içeren (Pc-127; sağ, alt) zirkonyum fitalosiyanin bileşiklerinin kimyasal yapıları……9

Şekil 4.4.. $1x10^{-2}$ M PcHfQStr çözeltisinin 830 nm (siyah) ve 514 nm'lerde (kırmızı) Raman saçılma spektrumu. 10

Şekil 4.5. $1x10^{-2}$ M $PcHfCl_2$ çözeltisinin 830 nm (siyah) ve 514 nm'lerde (kırmızı) Raman saçılma spektrumu (514 nm'de elde edilen değerler 10 katsayısı ile genişletilerek kullanıldı). 10

Şekil 4.6. Yığın hafniyum fitalosiyanin kristallerinin 830 nm'de elde edilen Raman saçılma spektrumları; PcHfQStr (siyah) ve $PcHfCl_2$ (kırmızı). 11

Şekil 4.7. Yığın hafniyum fitalosiyanin kristallerinin 514 nm'lerde (sağ) elde edilen Raman saçılma spektrumları; PcHfQStr (siyah) ve $PcHfCl_2$ (kırmızı). 11

Şekil 4.8. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126'nın 830 nm uyrılmada serbest haldeki Raman saçılma spektrumu (Lazer gücü=3 mW). 13

Şekil 4.9. Zirkonyum fitalosiyanin Pc-127'nin 830 nm uyarılmada serbest haldeki Raman saçılma spektrumu (Lazer gücü=0.3 mW). 13

Şekil 4.10. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyanin (PcHfQStr), insulin amiloid fibril (INS[F]) ve insulin-fitalosiyanin (PcHfQStr+INS[F]) örneklerinin 514 nm'de elde edilen SERS spektrumları. 15

Şekil 4.11. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyanin (PcHfQStr), insulin amiloid fibril (INS[F]) ve insulin-fitalosiyanin (PcHfQStr+INS[F]) örneklerinin 830 nm'de elde edilen SERS spektrumları. 15
Şekil 4.12. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 514 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (siyah) ve normal (kırmızı) Raman spektrumları. 16
Şekil 4.13. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 830 nm (sağ) uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (siyah) ve normal (kırmızı) Raman spektrumları. 17
Şekil 4.14. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin (PcHfQStr), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomerik insulinhafniyum (INS[M] + PcHfQStr) örneginin 514 nm uyarılmada SERS spektrumları 19
Şekil 4.15. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin (PcHfQStr), monomeric insülinin (INS[M]) ve monomerik insulinhafniyum (INS[M] + PcHfQStr) örneginin 830 nm uyarılmada SERS spektrumları. 19
Şekil 4.16. DMF ve HCl varlığında kurutulmuş AgNP'lerin 514 nm uyarılmada Raman saçılma spektrumları. 20
Şekil 4.17. DMF ve HCl varlığında kurutulmuş AgNP'lerin 830 nm uyarılmada Raman saçılma spektrumları. 20
Şekil 4.18. Klorür ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 514 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (kırmızı) ve normal (siyah) Raman spektrumları. 22
Şekil 4.19. Klorür ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 830 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (kırmızı) ve normal (siyah) Raman spektrumları. 22
Şekil 4.20. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), insülin amiloid fibrilleri (INS[F] ve fibriler insülin-hafniyum ($PcHfCl_2$ + INS[F]) örneğinin 514 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu. 23

Şekil 4.21. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), insülin amiloid fibrilleri (INS[F] ve fibriler insülin-hafniyum ($PcHfCl_2$ + INS[F]) örneğinin 830 nm uyarılma'da elde edilen SERS spektrumu. 24
Şekil 4.22. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomeric insulin-hafniyum (INS[M] + $PcHfCl_2$) örneginin 514 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu. 24
Şekil 4.23. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomeric insulin-hafniyum (INS[M] + $PcHfCl_2$) örneginin 830 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu. 25
Şekil 4.24. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126'nın serbest ve insülin fibrili varlığında 830 nm uyarılmada SERS spektrumları (Lazer gücü=3 mW; İnsülin fibrilinin SERS spektrumu referans amaçlı olarak alınmıştır). 25
Şekil 4.25. Zirkonyum fitalosiyanin Pc-127'nin serbest ve insülin fibrili varlığında 830nm uyarılmada SERS spektrumları (Lazer gücü=3 mW; İnsülin fibrilinin SERS spektrumu referans amaçlı olarak alınmıştır). 26
Şekil 4.26. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126 bileşiğinin 830 nm uyarılmada yüzey genişletilmiş (siyah) ve normal (kırmızı; 10^{-2} M DMF çözeltisi kurutularak hazırlandı) Raman spektrumları (Lazer gücü=3 mW). 27
Şekil 4.27. Hafniyum fitalosiyanin $PcHfCl_2$'nin (0.5 μM) çeşitli fibril derişimlerinde elde edilen SERS spektrumları; 0.425 μM (INS fibr), 0.142 μM (INS fibr:3), and 0.0425 μM (INS fibr:10). (λ_{uy}= 830 nm; Lazer gücü 0.3 mW). 28
Şekil 4.28. Farklı şekillerde hazırlanan örnekler ile elde edilen hafniyum fitalosiyanin $PcHfCl_2$ (0.5 μM)-insülin fibril SERS spektrumları; önce insülin fibrili eklenerek hazırlanan örnek (siyah) ve önce $PcHfCl_2$ eklenerek hazırlanan örnek (kırmızı), (λ_{uy}= 830 nm; Lazer gücü 0.3 mW). 29

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Amiloid proteinleri ve öncülleri ……..……3

Tablo 2. Fitalosiyaninlerin karakteristik titreşim modları …….....……12

Tablo 3. Fitalosiyanin (PcHfQStr) bileşiğinin 830 nm ve 514 nm uyarılmalarda tahmin edilen analitik genişleme faktörü değerleri ……..……..18

Tablo 4. Fitalosiyanin ($PcHfCl_2$) bileşiğinin 830 nm uyarılmalarda tahmin edilen analitik genişleme faktörü değerleri ……..……..21

Tablo 5. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126 bileşiğinin 830 nm uyarılma dalgaboyunda gözlenen bazı bantlarından hesaplanan analitik genişleme faktörü…….....27

ÖZET

Amiloid, çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatları olarak tanımlanır. Bu şekilde yapılan genel tanıma karşın aydınlatılan amiloid tür sayısı günden güne artmaktadır. Elimizdeki bilgiler ışığında 20'den fazla hastalığın patogenezinde amiloid fibril bulunduğunu söyleyebiliriz. 15 yıl öncesine kadar β tabakaları içermeleri dışında yapıları hakkında çok az şey bilinen amiloidler, günümüzde sebep oldukları hastalıklarla ilişkili olarak tanımlanabilmektedir. Bu kadar kısa sürede bu kadar bilgi elde edilebilmesinin nedeni Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıklara neden olmalarındandır. Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriler yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz-β konformasyonunda β-tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir.

Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün başlangıç proteini olan öncülü farklıdır. Bu nedenle bu tarz hastalıklarlarda proteinlerden amiloid fibrillere gidiş mekanizmasına etki tedavi araştırmalarının hedefindedir. Nörodejeneretif hastalıkların ilaç tedavisi için geliştirilen yaklaşımlar arasında agregasyonu engelleyen küçük moleküllerin kullanımı söz konusudur.

Proje kapsamında eksensel koordinasyona sahip dört makrosiklik metal bileşiğinin insülin amiloid fibrilleri tayininde SERS probu olarak etkinlikleri incelenmiştir. Bileşiklerden üç tanesi hafniyum bir tanesi ise zirkonyum metal bileşiğidir. Hafniyum bileşikleri eksensel ligand olarak kinolinyum stiril, stiril siyanin ve klorür içermektedir. Zirkonyum bileşiği ise iki tane betaketoenol ligandı içermektedir. Yapılan çalışmalar sonucu dört fitalosiyanin bileşiğinin metal ile yüzey zenginleştirilmesi sonucu elde edilen SERS spektrumlarında da şiddet artışının 10^4 mertebede olduğu gözlenmiştir. İncelenen fitalosiyaninlerden klorürür içeren hafniyum bileşiğinin SERS spektrumlarında fibriler insulin eklenmesi sonucu 1310 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1}'deki bantlarında genişleme olduğu gözlenmiştir. Fibriler insulin tayininde bu bantlardan faydalanabilineceği düşünülmektedir. Sinyal artışlarının insulin fibrilinin derişimine bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler : SERS, fitalosiyanin, amiloid fibril, insülin

ABSTRACT

Amyloid is defined as insoluble protein aggregates which is deposited in many tissue and organs during the various clinical disorders. Despite of this general definition, number of clarified amyloid types increase day by day. We can say that amyloid fibrils detected in pathogenesis of more than 20 disorders. 15 years ago nothing was known about amyloid fibrils except their B sheet structures. Today they can be defined with disorders which they cause. The reason of getting enormous information such a short time is that they cause many diseases including Alzheimer's disease (AD), Parkinson disease (PD), Diabetes type II, and spongiform encephalopathies (Mad cow disease), all of which are progressive disorders with associated high morbidity and mortality. The fibrillar assemblies are inherently stable and structural studies have revealed that they are composed predominantly of β-sheet structure in a characteristic cross-β conformation.

Despite the all amyloids have common characteristics, their precursor proteins are different. Thus the aggregation pathway of proteins into amyloid fibrils is an obvious target for therapeutic intervention in such disorders. Among the approaches to the development of therapeutic agents in neurodegenerative diseases is the use of small molecules that specifically and efficiently inhibit the aggregation process.

In this project efficiency of four macrocyclic metal axially coordinated compounds as SERS probe were investigated in the detection of insulin amyloid fibrils. Three of the compounds are hafnium compounds and one of them is zirconium compound. Hafnium compounds contain quinolinium styryl, styryl cyanine and chloride as axial gropus. Zirconium compound contain two betaketoenol as axial group. The obtained results showed that the intensity increase in the metal enhanced Raman spectra (SERS) of all compounds are in order of 10^4. It is thougt that these bands can be used in the determination of insülin. Deviation of this enhancement with the change of the fibrillar insulin concentration was observed.

Keywords: SERS, phthalocyanine, amyloid fibrils, insulin

1. GİRİŞ

Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20'den fazla önemli hastalığın patogenezinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir. Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriler yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz-β konformasyonunda β-tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir. Bu gelişmelerden bekleneceği gibi amiloidler ile ilgili yapılan çalışmalar bir süredir yakından izlenmektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün öncül proteini farklıdır. Öncül proteinlerin birikmesi amiloid oluşumunun ilk basamağıdır. Amiloid agregatlarının birikimi hücreye işlevini kaybettirmekte ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu durum fibril oluşumunu baskılayan ajanlara olan ihtiyaca aciliyet kazandırmıştır.

Biyolojik çalışmalarda patolojik protein agregasyonlarında metal komplekslerinin inhibisyon etkisi geniş yer bulmaktadır. "Heme-like" makrosiklik fitalosiyanin bileşiklerinin yüksek anti-prion ve anti-fibriler aktivitesi olduğu bulunmuştur. Metalsiz fitalosiyanin tetrasülfonatın (PcTS) alfa-synükleinin fibrilleşme reaksiyonunun yönünü değiştirdiği ve kırpılmış görünümde agregat oluşuma neden olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra PcTS'nin tau filament oluşumunu inhibe ettiği ve toksik olmayan oligomerik türlerin kararlılığını arttırdığı da bulunmuştur. PcTS-[Ni(II)] ve PcTS-[Zn(II)] gibi metal içeren fitalosiyaninlerin ise amorf alfa-synüklein agregatlarının oluşuma neden olduğu gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmalarda düzlem dışı eksensel ligand içeren fitalosiyaninlerin amilodojenik proteinlerin fibrilleşme mekanizmaları üzerine güçlü etkleri olduğunu gözlemlemiş bulunmaktayız. Hafniyum ve zirkonyum içeren fitalosiyaninlerin içerdiği eksensel lihandın türüne göre filament oluşumunu inhibe ettiği veya agregasyon reaksiyonunun yönünü değiştirerek oligomerik türlerin oluşmasınıa neden olduğu gözlenmiştir. Metal komplekslerinin floresan özellik göstermemesi ve UV-görünür absorpsiyon spektrumlarında da fibrillere bağlanma sonucu bir değişiklik olmaması izlenmelerini güçleştirmektedir. Bu nedenle fitalosiyaninlerin amiloid fibriller ile etkileşimlerini incelemek için farklı spektral yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılma (SERS) spektroskopisi alternatiflerine göre çeşitli avantajlar sunan bir analitik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. SERS, lokalize yüzey plazmonları ile molekülün Raman spektrumunun genişletilmesi temeline dayanmaktadır. Bu kapsamda bizim çalışmamızın hedefini fitalosiyaninlerin amiloid fibril ile etkileşimlerinin gümüş nanopartiküllerin SERS etkisinden faydalanarak incelenmesi oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

19. yüzyılın ortalarında önce Schleiden daha sonra Virchow tarafından ortaya atılan amiloid terimi, özellikle son yıllarda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Rambaran, 2008). Bunun şüphesiz en önemli sebebi, Alzheimer hastalığı (AD), tip II diyabet, Parkinson hastalığı ve spongiform encephalopathies (deli dana hastalığı) gibi günümüzün en yaygın hastalıklarında amiloid patogenezinin görülüyor olmasıdır. İlk olarak bir otopside karaciğerde gözlenen iyot ile boyanmış parçacıkların adlandırılmasında kullanılan amiloid terimi çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatlarını tanımlamaktadır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözülemeyen bir yapıdır (Sipe, 2000). Yapılan incelemeler amiloidler ile Kongo Kırmızısı arasında seçimli bir bağlanma olduğunu ve polarize ışık altında mikroskopta elma yeşili renginde görüldüklerini ortaya koymuştur. Tüm amiloid tiplerinde görülen bu karakteristik özellik amiloidin histopatolojik olarak tanısında kullanılmaktadır. Amiloid yapıların çözünmez olmaları yanı sıra fibrillerin beta tabakası oluşturarak uzaması bir diğer karakteristik özelliğidir. Amiloid oluşumu gerçekleşen dokuda, hücreler arası iletişimin bozulmasından dolayı, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku (ya da organ) işlev göremez hale gelmektedir (Taşkıran, 2007; Merlini, 2003).

Bir seri hasarlı dokudan elde edilmiş amiloid fibrillerdeki proteinlerin amino asit içerikleri ve sekans analizleri her bir amiloid hastalığın belirli bir protein veya peptit ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Amiloid proteinleri, depolandıkları doku, organlar ve hastalığa göre farklılık göstermektedir. Amiloid tipleri, yapı itibariyle birbirine benzese de öncül proteinleri birbirinden farklıdır. Örneğin Alzheimer's hastalığına amiloid beta (Aβ) (Chaudhuri, 2006), tip II diyabete amilin (IAPP) (Glenner, 1984), Parkinson hastalığına α-synuclein (Cooper, 1987) ve memeli prion hastalığına ise prion protein (PrP) (Spillantini, 1997) sebep olmaktadır. Öncül proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Aynı amiloid öncül proteinleri bir araya

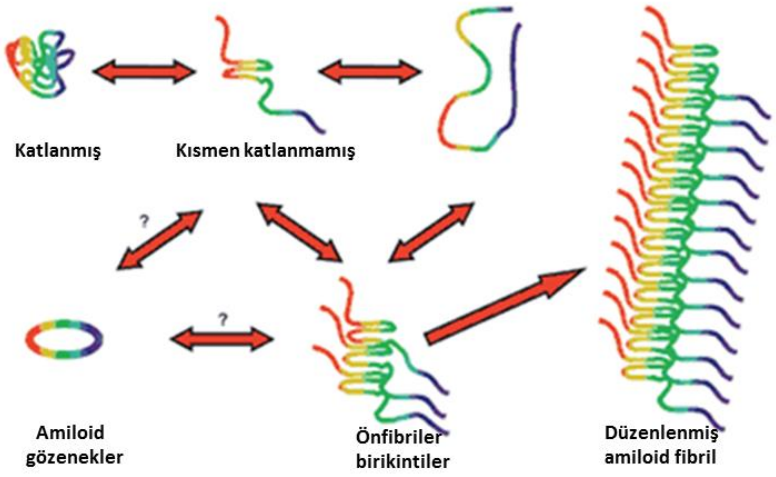
gelerek amiloid fibrillerini oluşturur (Prusiner, 1982). Bu nedenle farklı amiloid tiplerinin içerdiği proteinler birbirinden farklıdır. İnsan hastalıklarında yaygın olarak görülen bazı amiloid tipleri ve öncül proteinleri Tablo 1'de verilmiştir (Westermark, 2005).

Tablo 1. Amiloid proteinleri ve öncülleri

Amiloid proteini	Öncül Protein	Yayılım	Tip	Hastalık veya görüldüğü doku
Aβ	APP (Aβ protein öncüs)	Lokalize	Kazanılmış,kalıtımsal	Alzheimer hastalığı
APrP	Prion proteini	Lokal z	Kazanılmış kalıtımsal	Creutzfeldt-jakob hastalığı
ABri	ABri protein öncüsü	Lokalize	Kalıtımsal	İngiliz ailesel demansı
ACys	Sistatin C	Lok lize	Kalıtımsal	Kalıtımsal serebral amiloid
Aβ2M	Beta2-mikroglobulin	Lokalize,Sistemik	Kazanılmış	Ronik hemodiyaliz
AL	I□münlobulin hafif zincirleri	Lokalize,Sistemik	Kazanılmış	Miyeloma ilişkili primer amiloid
AA	Serum amiloid A	Sistemik	Kazanılmış	Sekonder amiloid inflamsyon
ATTR	Transtire in	Sistemik	Kazanılmış,kalıtımsal	Ailesel amiloid polinöropati
AAp A	Apolipop ote n A-I	Sistemik	Kalıtımsal	Karaciğer,böbrek,kalp
AApoAII	Apolipoprotein A-II	Sistemik	Kalıtımsal	Böbrek,kalp
AGel	Gelsolin	Sis emik	Kalıtımsal	Fin kalıtsal amiloidoz
AFi	Fibrinojen Aα zinciri	Sistemik	Kalıtımsal	Böbrek

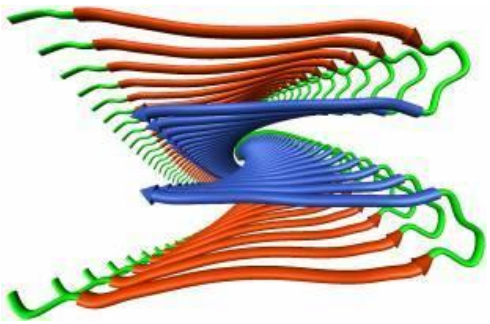
İn vitro ortamda hemen hemen bütün proteinlerden çevre şartları değiştirilerek amiloid elde edilebilmektedir. Ancak *in vivo* ortamda amiloid gelişimi bu kadar kolay gerçekleşmemektedir. 2008 yılına kadar 20'den fazla plazma proteininin amiloid oluşturduğu belirlenmiştir (Westermark, 2005). Amiloid öncülü proteinlerin konsantrasyonu arttığında veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki bir mutasyon ya da polimorfizm sonucunda sentezlenen öncül proteinlerin proteazlar tarafından yeterince yıkılamaması sonucunda amiloid yapısını oluşturacak olan amiloid proteinleri meydana gelmektedir. Bu proteinler kararsız yapıda olup, çevresel faktörlerin etkisiyle (sıcaklık, pH, metal iyonları, okside edici ajanlar gibi) beta tabakası yapısı kazanmaktadır. Beta tabakası oluşturan proteinler biraraya gelerek fibril öncülü agregatları oluşturur. Bu aşamaya çekirdek fazı da denilmektedir. Amiloid çekirdeği veya protofibril olarak tanımlanan bu yapıların, hücreleri apopitozise yönlendirdiği düşünülmektedir. Amiloid uzaması bu aşamanın devamında görülmektedir. Amiloid agregatlarının biyokimyasal analizi sonucunda fibrillerin yanı sıra serum amiloid protein (SAP) ve pretoglikanlarında bulunduğu ortaya çıkmıştır. Glikozaminoglikanların tüm amiloid tiplerinde bulunduğu ve amiloid proteinlerini biraraya getirdikleri, SAP'inin ise amiloidleri kararlı hale getirdiği düşünülmektedir (Hawkins,1988; La Spada,1991). Hücreler

arası bölgede biriken amiloid proteinleri, fibril öncüllerine hızla katılarak uzama fazını sürdürür. Son olarak fibrillere, fibriler yapıda olmayan serum amiloid proteininin (SAP) katılmayla çözünmez yapıdaki amiloid oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Amiloid fibrillerin oluşumu

Muhtemelen en iyi aydınlatılmış fibril yapısı Alzheimer'da oluşan Aβ proteinidir. NMR ve taramalı electron miksroskobu (TEM) ile yapılan analizler Aβ(1-40) tarafından oluşturulan çeşitli yapılar olduğunu göstermiştir (Chan, 2011; Tycko, 2011; Petkova, 2002; Sachse, 2008). *In vitro* fibril eldesinde, fibril morfolojisi ve subunit peptit yapısının inkübasyon şartlarına bağlı olduğu ve belirgin heterojen özelliklerini hem TEM hem NMR analizleri ile ortaya çıkarmıştır. Şekil 2.2'de Aβ(1-40) fibrillerine bir örnek görülmektedir.



Şekil 2.2. Aβ(1-40) fibrillerinin yapısal şekli

Nörodejeneretif hastalıkların olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde en umut vadeden yol fibril oluşum mekanizmasına etki etmek olarak görülmektedir. Farklı kimyasal gruplardan bazı küçük moleküllerin Aβ (Howlett, 1998; Frydman, 2009; Necula, 2007; Ehrnhoefer, 2008), tau (Taniguchi, 2005), huntingtin (Chopra, 2007) ve prion protein (Caughey, 1998; Priola, 2000) gibi amiloid fibrillerin oluşumunu baskıladığı rapor edilmiştir. Örneğin, flavonoid baicaleinin AS oluşumunu inhibe ettiği ve oluşan olgun fibrillerdede ayrışmaya neden olduğu bulunmuştur. Bazı polifenoller, fenotiyazinler, forfirinler, polien makrolidler, Kongo kırmızısı ve türevlerinin ise ASN, Aβ ve tau filamentlerinin oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Halkalı tetrapiol-forfirinlerde ve fitalosiyaninlerde yüksek anti-prion aktivite gözlenmiştir. Metalsiz fitalosiyanin tetrasulfonatta (PcTS) ise tau filamentlerini parçalama (Taniguchi, 2005) ve Aβ peptit agregasyonunu (Howlett, 1998) inhibe etme özelliği bulunmuştur. Bu makrosiklik kompleksin alfa-synucleine yüksek afinitesi tespit edilmiştir. PcTS'nin bu proteine bağlanması amiloid fibril oluşumunu baskılar ve kısa protein agregatlarının oluşumuna neden olur. Fitalosiyaninin alfa-synucleine bağlanmasının metal kompleksinin aromatik sistemi ile aminoasitin aromatik kısımları arasındaki hidrofobik etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lamberto, 2009). Fitalosiyanin komplekslerinin kendiliğinden toplanmaya yatkınlıkları ile gösterdikleri yüksek anti-fibrilojenik ve anti-prion aktiviteleri bu öneriyi desteklemektedir (Lamberto, 2011).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Reaktif ve çözeltilerin hazırlanması

- Tüm çalışma çözeltileri günlük olarak, stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Çalışmalarda sulu çözeltilerde çift destile su kullanıldı. Bütün reaktifler analitik saflıkta olup ileri saflaştırma yapılmadan kullanıldı.

  - $1x10^{-2}$ M'lık fitalosiyanin çözeltileri DMF (%99.8, Sigma) içerisinde hazırlandı.
  - Monomerik veya fibriler proteinlerin (Insulin human, $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ Sigma) çözeltileri 0.1 M HCl (36.5-38.0%, BioReagent, moleküler biyoloji için, Sigma) içerisinde hazırlandı.
  - Ag nanopartiküllerin (AgNP) sulu çözeltileri deneysel çalışmalarda kullanıldı.

3.2. Kullanılan cihazlar

- Ölçümlerde 830 nm diod lazer ve 514 nm'de argon-iyon lazerli bir Raman mikroskopi (InVia Reflex, Renishaw, UK) sistemi kullanıldı.

  - Bütün SERS ölçümleri 50X objektif ile alındı.
  - Sistem 520 cm^{-1}'deki silikon wafer pike karşılık otomatik olarak kalibre edilmiştir.
  - Spektrumlarda Wire 3.2 programı ile zemin düzeltmesi otomatik olarak yapılmıştır.
  - PeakFit 4.12 (SeaSolve Software Inc.) hızlı Fourier dönüştürücü filtre ile veriler işlenmiştir.
  - 830 nm'de alınan bütün ölçümler için lazer gücü 3-15 mW olarak kullanıldı.
  - 514 nm'de alınan bütün ölçümler için ise lazer gücü 0.3-1.5 mW olarak kullanıldı.
  - Örnekler üzerinde lazerin spot genişliği ~1µm'dir.

- Sentezlenen kolloidal nanopartiküller dinamik karaketizasyonu için ışık saçılma (DLS) ve Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis Spektrometre ile karakterize edildi. Yüzey görüntüleri FEI marka QUANTA FEG 250 taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilmiştir.

3.3 Gümüş nanopartiküllerin eldesi

- ***Lee-Meisel Yöntemi:*** Bu yöntem gümüş katyonlarının sitrat ile indirgenmesine dayanır. AgNP'lerin eldesi için 50 ml, $1x10^{-3}$ M $AgNO_3$ (BioXtra, >99%, Sigma) kaynama noktasına kadar ısıtılırak üzerine 10 ml, 1% trisodyum sitrat ($C_6H_5O_7Na_3$, Sigma) çözeltisi eklendi. 1 saat kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakılan çözelti daha sonra santrifüjlenerek çözeltisinden ayrıldı (Lee, 1982). Ayırma işleminin ardından 2 kez deiyonize su ile yıkanarak sulu süspansiyon halinde karanlıkta muhafaza edildi. Elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 3'de görülmektedir.

- ***Leopold ve Lendl Yöntemi:*** AgNP'ler $1.5x10^{-2}$ M, 10 mL hidroksilamin hidroklorür (99.995 %, Sigma) ve $3x10^{-2}$ M sodyum hidroksit (≥98, Sigma) karışımının $1.11x10^{-3}$ M, 90 mL $AgNO_3$ (BioXtra, >99%, Sigma) çözeltisine eklenerek 15 dakika karıştırılması ile Leopold ve Lendl tarafından tarif edilen yönteme göre hazırlandı (Leopold, 2003). Sentezlenen kolloidal nanopartiküller dinamik ışık saçılma (DLS) ve UV-Vis spektroskopileri ile karakterize edildi. Bu çözelti 1X olarak adlandırıldı. Kolloidler 5500

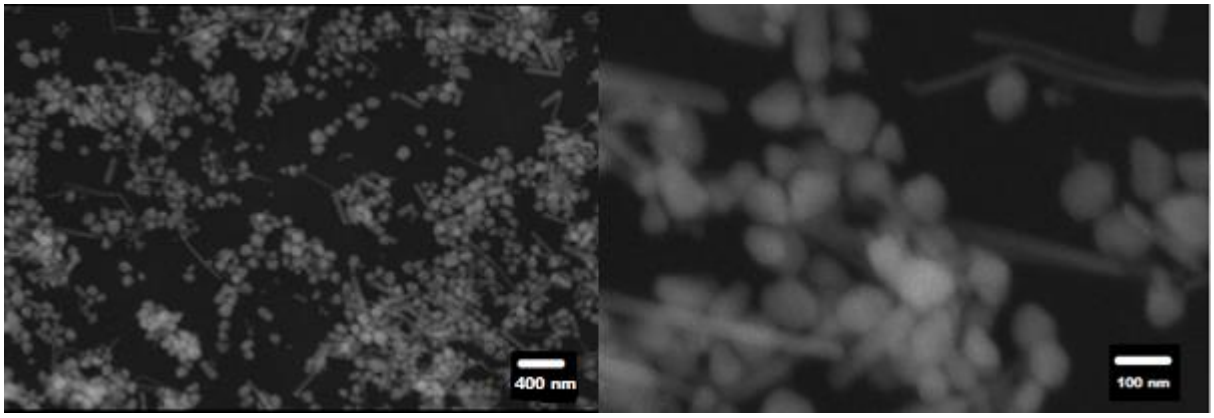
rpm hızla 30 dakika santrifüjlenerek çözeltiden ayrıldı. Uygun miktarda su eklenerek istenen derişim elde edildi (16X).

- ***Ölçüm örneklerinin hazırlanması:*** Ölçümler için örnekler DMF içerisinde hazırlanan fitalosiyaninlerin stok çözeltilerinden (kontrol örnekleri için eşit miktarda DMF), monomerik veya fibriler proteinlerin 0.1 M HCl içerisinde hazırlanan çözeltilerinden belirli miktarlar Ag nanopartiküllerin (AgNP) sulu çözeltisine eklenerek hazırlandı. Elde edilen ve 0.5 μM fitalosiyanin (veya DMF) ve/veya 0.425 μM fibriler/monomerik protein (HCl) içeren AgNP çözeltileri cam yüzeyler üzerinde kurutuldu ve ölçüm için kullanıldı. Fitalosiyanin veya protein içermeyen kontrol örnekleri hazırlandı (Avcı, 2014).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu

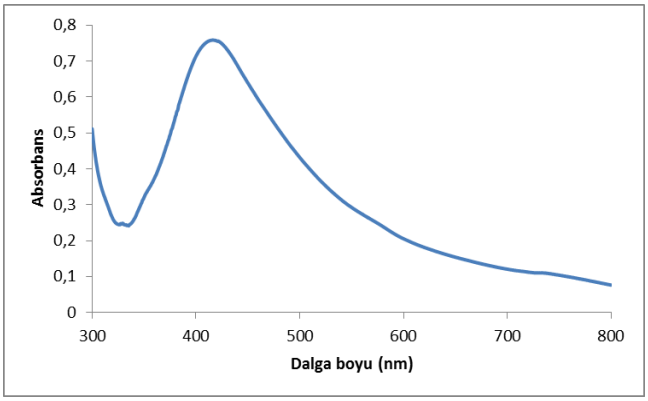
İlk olarak proje önerimizde bulunan Lee-Meisel yöntemi ile AgNP eldesi gerçekleştirildi. Bu yöntem gümüş katyonlarının sitrat ile indirgenmesine dayanır. Bu yöntem ile elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri alınarak partikül şekil ve ortama boyutları saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Lee-Meisel protokolü ile elde edilen AgNP'ler

Lee- Meisel yöntemi ile elde edilen AgNP'lerin büyük yüzdesi küresel yapılar olmakla beraber gümüş çubuklarda içerdiği gözlendi. Tanecik büyüklüğü ortalama 40-50 nm olarak saptandı. Verimli ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla beraber heterojen ürün eldesi nedeni ile proje ekibimizin daha önce kullanmış olduğu AgNP sentez yöntemi tercih edildi.

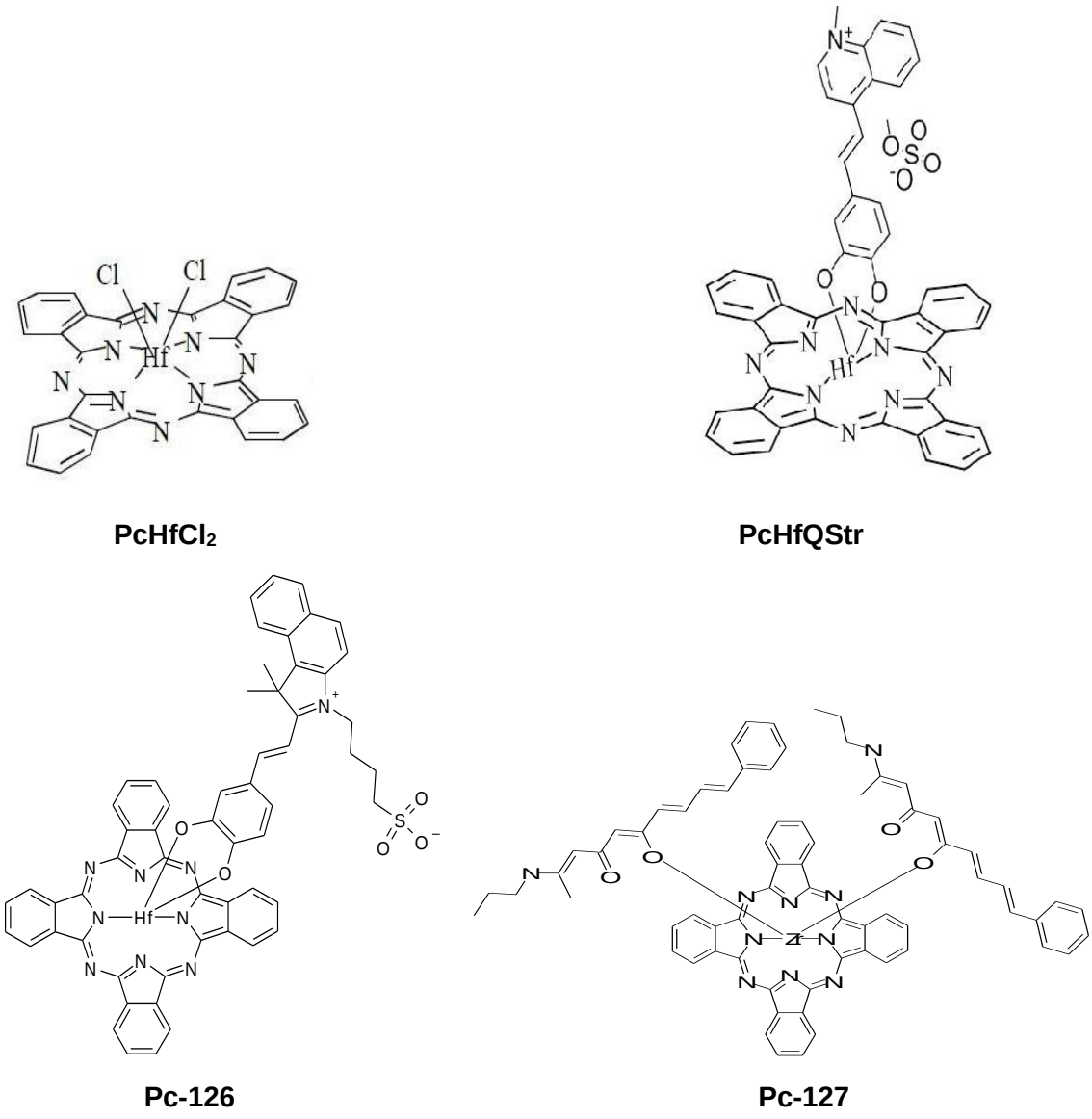
Lee-Meisel yöntemi verimli ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla beraber heterojen ürün eldesi nedeni ile proje ekibimizin daha önce kullanmış olduğu ve Leopold ve Lendl tarafından bulunmuş olan AgNP sentez yöntemi tercih edildi. Sentezlenen kolloidal nanopartiküller dinamik ışık saçılma (DLS) ve UV-Vis spektroskopileri ile karakterize edildi ve ortalama parçacık çapı 40 nm olarak saptandı. Kullanılan AgNP'in UV-abs spektrumu Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu

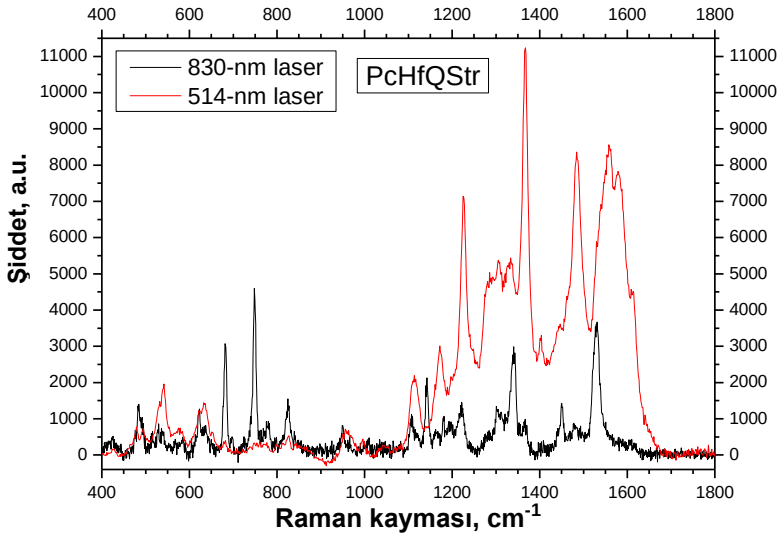
4.2. Fitalosiyaninlerin Raman spektrumları

Deneysel çalışmalarda eksensel ligand olarak kinoliyum stiril (PcHfQStr), klor atomları ($PcHfCl_2$) ve stirilsiyanin içeren (Pc-126) üç hafniyum fitalosiyanin bileşiği ve eksensel ligand olarak iki betaketoenol içeren (Pc-127) bir zirkonyum fitalosiyanin bileşiğinin amiloid fibriller için anti-fibrilojenik özelliği incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan 4 bileşiğin yapısı Şekil 4.3'de görülmektedir.

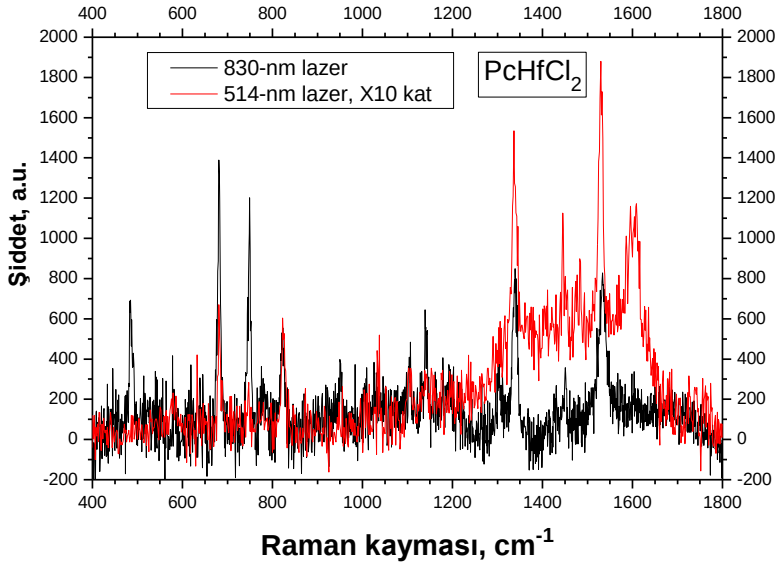


Şekil 4.3. Eksensel ligand olarak kinoliyum stiril (PcHfQStr; sağ, üst), klor atomları ($PcHfCl_2$; sol, üst), stirilsiyanin (Pc-126; sol, alt) içeren hafniyum fitalosiyanin ve iki betaketoenol içeren (Pc-127; sağ, alt) zirkonyum fitalosiyanin bileşiklerinin kimyasal yapıları.

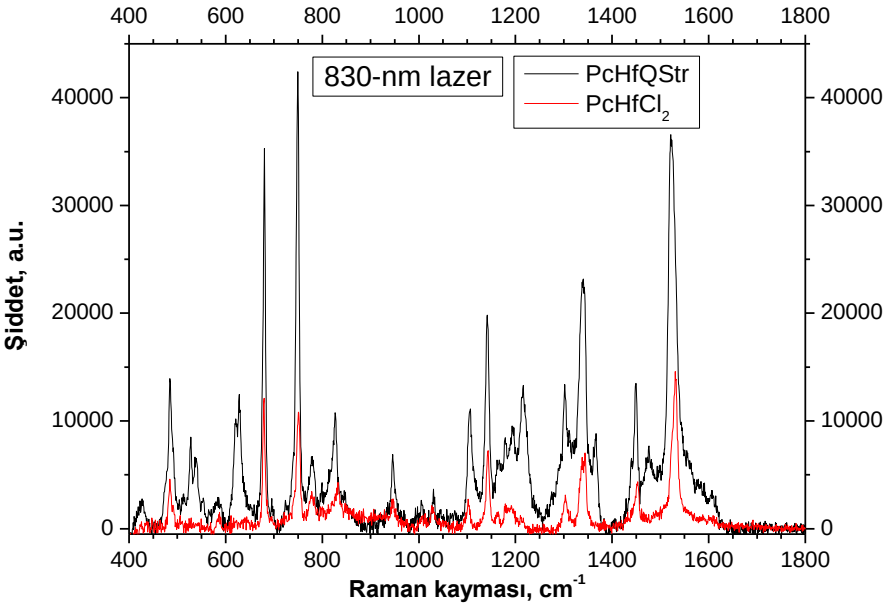
Çalışmada ilk olarak fitalosiyaninlerin protein ve yüzey zenginleştirilmesi için kullanılan gümüş yüzeyler olmadan Raman saçılma spektrumları incelendi. Bu bölümde DMF içerisinde hazırlanan $1x10^{-2}$ M'lık fitalosiyanin çözeltileri kullanıldı. Ölçüm örnekleri deneysel kısımda anlatılan yöntem ile cam yüzeyler üzerinde hazırlandı. PcHfQStr ve $PcHfCl_2$ örneklerinden elde edilen Raman spektrumları sırası ile Şekil 4.4 ve 4.5'de görülmektedir. Ayrıca yığın fitalosiyanin kristallerinin de Raman saçılma spektrumları ölçüldü. Şekil 4.6 ve 4.7 bu örneklerin Raman spektrumlarını göstermektedir.



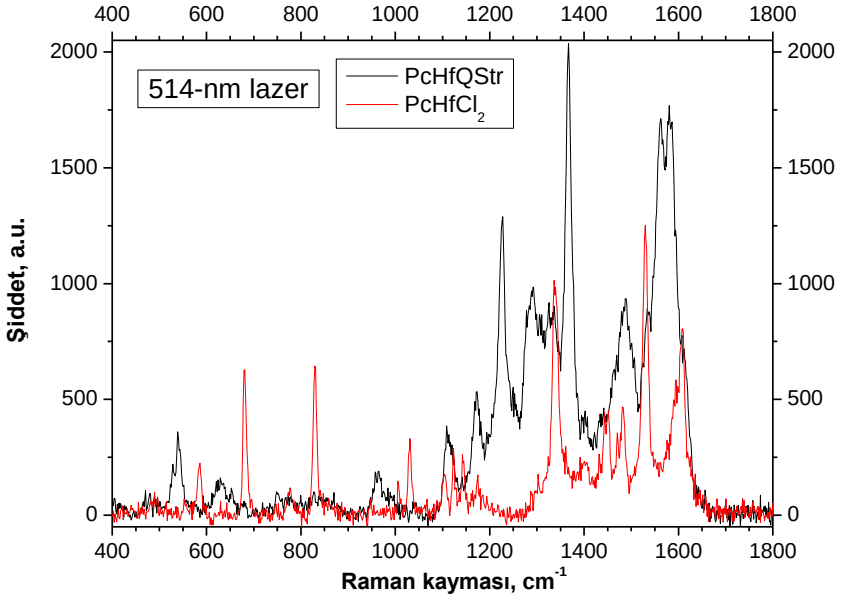
Şekil 4.4. $1x10^{-2}$ M PcHfQStr çözeltisinin 830 nm (siyah) ve 514 nm'lerde (kırmızı) Raman saçılma spektrumu.



Şekil 4.5. $1x10^{-2}$ M $PcHfCl_2$ çözeltisinin 830 nm (siyah) ve 514 nm'lerde (kırmızı) Raman saçılma spektrumu (514 nm'de elde edilen değerler 10 katsayısı ile genişletilerek kullanıldı).



Şekil 4.6. Yığın hafniyum fitalosiyanin kristallerinin 830 nm'de elde edilen Raman saçılma spektrumları; PcHfQStr (siyah) ve $PcHfCl_2$ (kırmızı).



Şekil 4.7. Yığın hafniyum fitalosiyanin kristallerinin 514 nm'lerde (sağ) elde edilen Raman saçılma spektrumları; PcHfQStr (siyah) ve $PcHfCl_2$ (kırmızı).

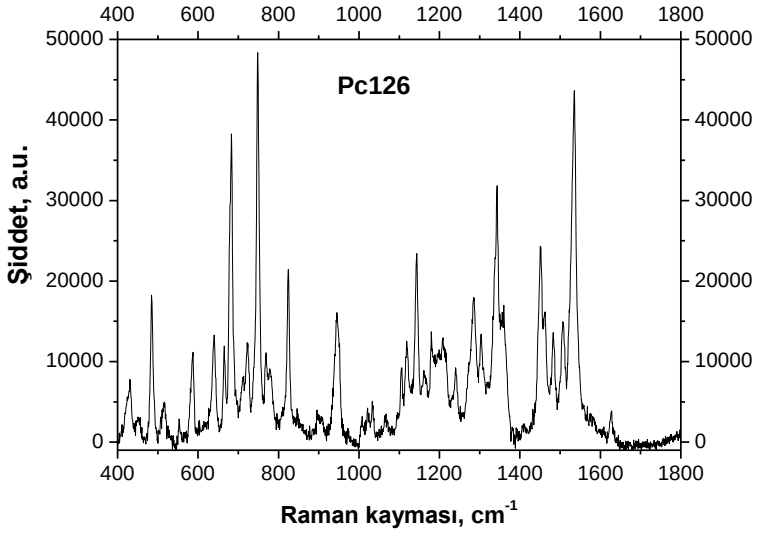
Yüzey zenginleştirme için kullanılan metal ve protein içermeyen ortamlarda PcHfQStr ve $PcHfCl_2$ bileşiklerinden elde edilen spektrumların uyarılma dalgaboyu, fitalosiyanin bileşiğinde bulunan düzlem dışı ligand türü (stiril içeren (PcHfQStr) veya Cl_2 içeren ($PcHfCl_2$))

ve sentez yöntemine göre (yığın kristal veya çözelti uzaklaştılmış) farklılık gösterdiği gözlendi. Bunun yanısıra fitalosiyaninin karaktestik titreşim modları olduğu düşünülen bazı bantların bütün spektrumlarda veya çoğunda tekrarlandığı gözlendi (Jennings, 1984). Elde edilen spektrumlarda gözlenen ve fitalosiyaninlerin karakteristik titreşimleri olduğu düşünülen türler ve gözlendikleri dalgasayıları Tablo 2'de özetlenmiştir. Ölçümlerde gözlenen 485 cm^{-1} ve 585 cm^{-1}'deki Raman bantları büyük olasılıkla izoindol halkasındaki deformasyondan kaynaklanmaktadır. 16'lı iç halkanın nefes alma (breathing) titreşimi yaklaşık olarak 682 cm^{-1}'de gözlendi. 749 cm^{-1}'de gözlenen bantlar makrohalkanın asimetrik deformasyonu ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda 778 cm^{-1} ve 825 cm^{-1} civarında gözlenen bantların makrohalkanın azo gruplarındaki C-N gerilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. 1037 cm^{-1} ve 1105 cm^{-1} civarında ise büyük olasılıkla izoindol gruptan kaynaklanan C-H eğilme titreşimleri görülmektedir. 1140 cm^{-1} ve 945 cm^{-1} civarında gözlenen bantların sırası ile pirol ve benzen gruplarının nefes alma (breathing) tireşimlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 1342 cm^{-1}'de gözlenen belirgin Raman pikinin pirolün C_α-C_β gerilme titreşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. C-N gerilme titreşim pikleri 1450 cm^{-1}'de görülmektedir. Fitalosiyaninin Raman spektrumunda gözlenen en belirgin bantlardan bir tanesi olan 1528 cm^{-1}'deki bandın pirol grubunun C_β-C_β bağının simetrik gerilme titreşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kuru PcHfQStr örneğinde 514 nm'deki uyarılma ile elde edilen kuvvetli bantlar (örneğin 1173 cm^{-1}, 1226 cm^{-1}, 1367 cm^{-1}, 1484 cm^{-1} ve 1558 cm^{-1}'deki bantlar) büyük ihtimalle stiril ligandının titreşimlerinden kaynaklanmaktadır.

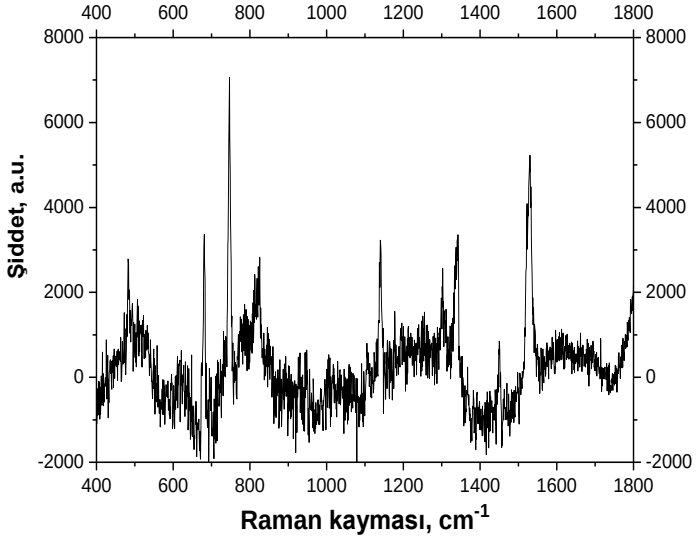
Tablo 2. Fitalosiyaninlerin karakteristik titreşim modları

Raman bant dalgasayısı, cm^{-1}	**Titreşim türü**
485 ve 585	izoindol halkası deformasyonu
682	16'lı iç halkanın nefesl alma titreşimi (breathing)
749	asimetrik halkanın deformasyonu
778 ve 825	makrohalkanın azo gruplarındaki C-N gerilme titreşimi
945	benzen grubunun nefes alma titreşimi (breathing)
1140	pirol grubunun nefes alma titreşimi (breathing)
1105 ve 1307	İzoindol grubundan kaynaklanan C-H gerilme titreşimi
1342	pirolün C_α-C_β gerilme titreşimi
1450	C-N gerilme titreşim
1528	pirol grubunun C_β-C_β bağının simetrik gerilme titreşimi

Pc-126 ve Pc-127 örneklerinin Raman saçılma spektrumları ise Şekil 4.8 ve 4.9'da görülmektedir. Pc-127 bileşiğinde zemin sinyali çok kuvvetli olduğu için lazer gücü 0.3 mW olarak, Pc-126 bileşiğinde ise 3 mW olarak kullanıldı.



Şekil 4.8. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126'nın 830 nm uyrılmada serbest haldeki Raman saçılma spektrumu (Lazer gücü=3 mW).

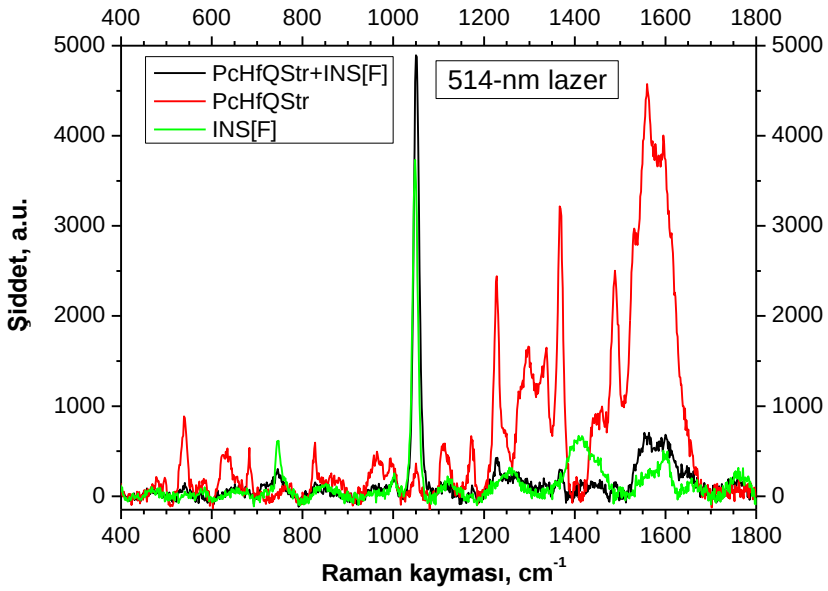


Şekil 4.9. Zirkonyum fitalosiyanin Pc-127'nin 830 nm uyarılmada serbest haldeki Raman saçılma spektrumu (Lazer gücü=0.3 mW).

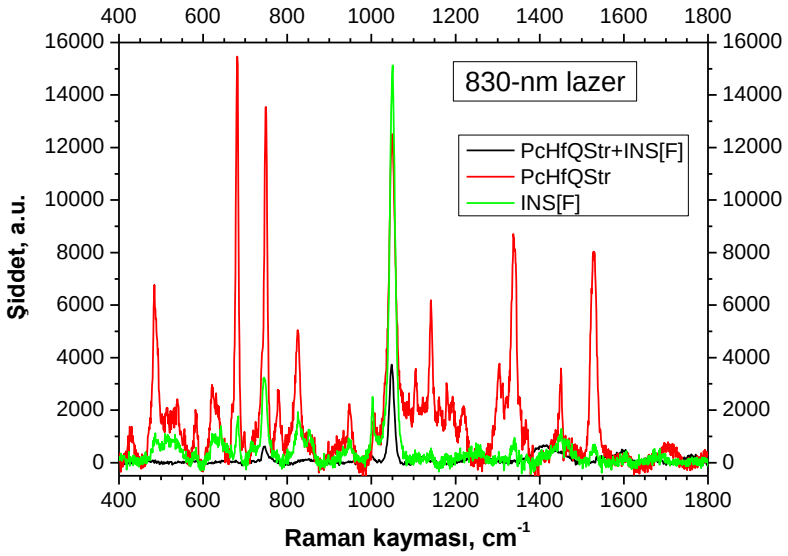
Her iki fitalosiyanine ait spektrumda da gözlenen bantlar PcHfQStr ve $PcHfCl_2$ örneklerinden elde edilen bantlar ile örtüşmektedir. Pc-126 bileşiğinin Raman spektrumunda 484 cm^{-1} ve 586 cm^{-1}'de gözlenen bantların izoindol halkasındaki değişikler ile ilişkilendirilmesi olasıdır. 16'lı iç halkanın nefes alma titreşim bandı 684 cm^{-1}'de gözlendi. 747 cm^{-1}'de gözlenen bant makro halkanın antisimetrik deformasyonu ile ilişkili olabilir. Aynı zamanda 778 cm^{-1} ve 824 cm^{-1} civarında gözlenen bantların makro halkanın azo gruplarının C-N gerilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir. 1037 cm^{-1} ve 1105 cm^{-1}'de gözlenen bantlar ise büyük olasılıkla izoindol grubun C-H eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1144 cm^{-1} ve 945 cm^{-1} civarında gözlenen bantlar ise sırası ile pirol ve benzen gruplarının nefes alma titreşimlerinden kaynaklanıyor olabilir. 1342 cm^{-1}'de gözlenen şiddetli Raman piki ise C_α-C_β gerilme titreşimi ile ilişkilendirilebilir. C-N gerilme titreşim piki 1452 cm^{-1}'de gözlendi. Fitalosiyaninin Raman spektrumunda gözlenen en şiddetli bantlardan biri 1534 cm^{-1}'de gözlendi ve pirol grubundaki C_β-C_β bağındaki simetrik gerilme titreşiminden kaynaklandığına inanılmaktadır. Pc-126 örneğinden elde edilen Raman spektrumunda daha şiddetli bantlar 640 cm^{-1} ve 1285 cm^{-1}'de gözlendi. Bu bantlar fitalosiyanin halkasından kaynaklanan bantlar arasında tanımlanmadığı için (Jennings, 1984) sitirilsiyanin ligandının titreşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Pc-127 örneğinden elde edilen Raman spektrumunda gözlenen en şiddetli bantlar ise 681 cm^{-1}, 746 cm^{-1}, 1139 cm^{-1}, 1340 cm^{-1}, 1452 cm^{-1} ve 1530 cm^{-1}'de konumlanan fitalosiyanin halkasının titreşimlerinden kaynaklanan bantlardır.

4.3. Fitalosiyaninlerin fibriler ve monomer insulin varlığındaki yüzey zenginleştirilmiş Raman spektrumları

İlk olarak PcHfQStr bileşiğinin yüzey zenginleştirilmiş Raman spektrumları (SERS) serbest formda ve insülin varlığında (monomerik veya fibriler) incelendi. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.10 ve 4.11'de görülmektedir. Monomerik ve fibriler insülinin SERS spektrumları elde edilerek referans olarak kullanıldı. Bu ölçümler için örnekler deneysel kısımda belirtilen yöntem ile hazırlandı. Aynı zamanda fitalosiyanin veya protein içermeyen kontrol örneklerinin ölçümleri de alındı.



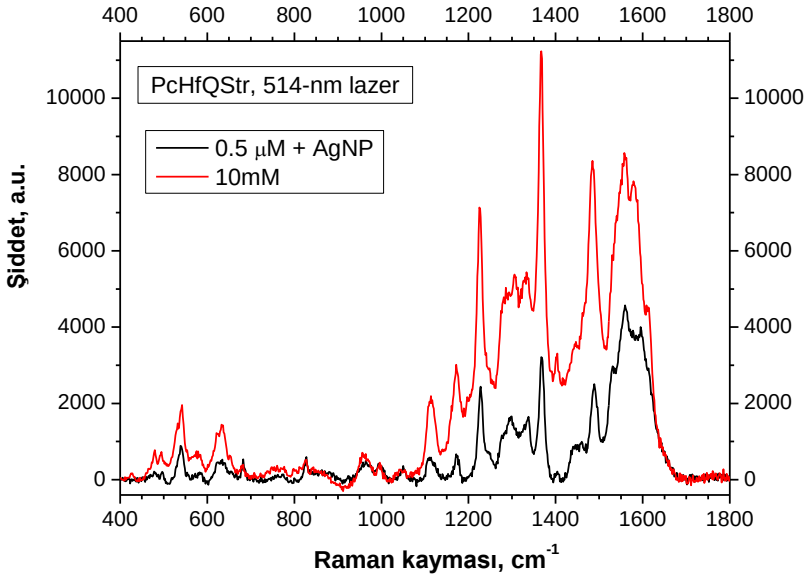
Şekil 4.10. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyanin (PcHfQStr), insulin amiloid fibril (INS[F]) ve insulin-fitalosiyanin (PcHfQStr+INS[F]) örneklerinin 514 nm'de elde edilen SERS spektrumları.



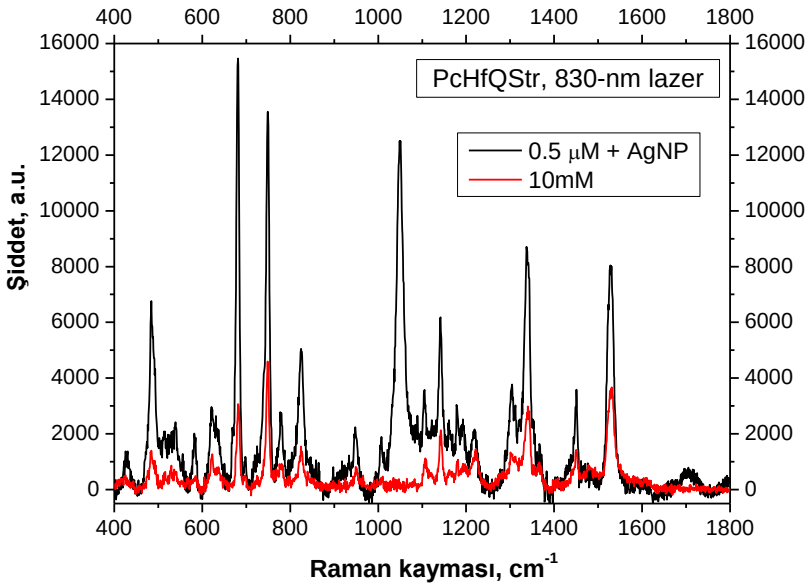
Şekil 4.11. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyanin (PcHfQStr), insulin amiloid fibril (INS[F]) ve insulin-fitalosiyanin (PcHfQStr+INS[F]) örneklerinin 830 nm'de elde edilen SERS spektrumları.

Şekil 4.12 ve 4.13'de her iki uyarma dalgaboyu içinde PcHfQStr bileşiğinin AgNP'ler varlığında elde edilen SERS spektrumlarının fitalosiyanin bileşiğinin yüzey zenginleştirilme

kullanılmadan (AgNP olmayan ortamda) alınan Raman saçılma spektrumları ile karşılaştırılması görülmektedir. Her iki durumda da bant pozisyonlarının aynı olduğu görülmektedir. Buna karşın SERS spektrumlarında 0.5 μM'lık PcHfQStr, normal Raman saçılma spektrumlarında ise 10 mM'lık PcHfQStr çözeltisinin kullanılmıştır. Gözlenen bantlardan bazılarının fitalosiyaninlere ait olduğu tanımlanabilmektedir (Jennings, 1984). 514 nm'de uyarılma sonucu elde edilen sonuçlarda bu bantlar; 683 cm^{-1} (16'lı iç halkanın nefes alma bandı), 827 cm^{-1} (makrohalkalı yapının azo grupların C-N gerilme titreşimleri), 1110 cm^{-1} (izoindol grubun C-H eğilme titreşimleri), 1335 cm^{-1} (pirol grubun C_α-C_β gerilme titreşimleri) ve 1533 cm^{-1} (pirol grubun C_β-C_β bağının simetrik titreşimleri)'dir. Büyük olasılıkla stiril ligandının titreşimlerinden kaynaklanan 1173 cm^{-1}, 1226 cm^{-1}, 1367 cm^{-1}, 1489 cm^{-1} ve 1559 cm^{-1}'de gözlenen şiddetli bantlar her iki tür Raman saçılma spektrumunda da gözlendi.



Şekil 4.12. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 514 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (siyah) ve normal (kırmızı) Raman spektrumları.



Şekil 4.13. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 830 nm (sağ) uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (siyah) ve normal (kırmızı) Raman spektrumları.

830 nm uyarılmada elde edilen bantlar; 485 cm^{-1} ve 579 cm-1 (izoindol grubun deformasyonu), 679 cm^{-1} (16'lı iç halkanın nefes alma titreşimi), 748 cm^{-1} (makrosiklik yapının antisimetrik deformasyonu), 778 cm^{-1} ve 822 cm^{-1} (makrosiklik yapının azo grubunun C-N gerilmesi), 949 cm^{-1} ve 1141 cm^{-1} (sırası ile benzen ve pirol grupların nefes alma titreşimleri), 1337 cm^{-1} (pirol grubun Cα-Cβ gerilme titreşimi), 1448 cm^{-1} (C-N gerilme titreşim piki) ve 1526 cm^{-1} (pirol grubun C_β-C_β bağının gerilme titreşimi)'dir (Jennings, 1984).

Şekil 4.12 ve 4.13'de 0.5 μM PcHfQStr bileşiğinin AgNP'ler varlığında elde edilen Raman saçılma şiddetlerinin aynı fitalosiyanin bileşiğinin yüzey zenginleştirilme kullanılmadan (AgNP olmayan ortamda) 10 mM'lık çözeltisinden elde edilen Raman saçılma şiddeti ile aynı mertebede olduğu gözlendi. Bu sonuç fitalosiyaninlerin Raman saçılma şiddetlerine metallerin genişletme etkisinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. EF = (I_{SERS}/N_{Surf}) / (I_{RS}/N_{Vol}) olarak tanımlanan SERS'nın ortalama genişleme faktörünü metal yüzeyine bağlı fitalosiyanin molekül sayısını (gümüş adacıklar arasında doğrudan cam üzerinde bulunan moleküller hariç) bilmediğimiz için hesaplamamız mümkün değildir. Bunun yanısıra fitalosiyaninlerin metal üzerinde bir katman mı yoksa üst üste birkaç katman mı yapmış oldukları hakkında da net bir bilgiye sahip değiliz. Burada N_{Surf} ve N_{Vol} sırası ile metal yüzeyinde bulunan ve saçılma hacminde bulalnan molekül sayılarını ifade etmektedir. Buna

karşılık analitik genişleme faktörünü (AEF) hesaplayabiliriz (Le Ru, 2007). AEF aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır.

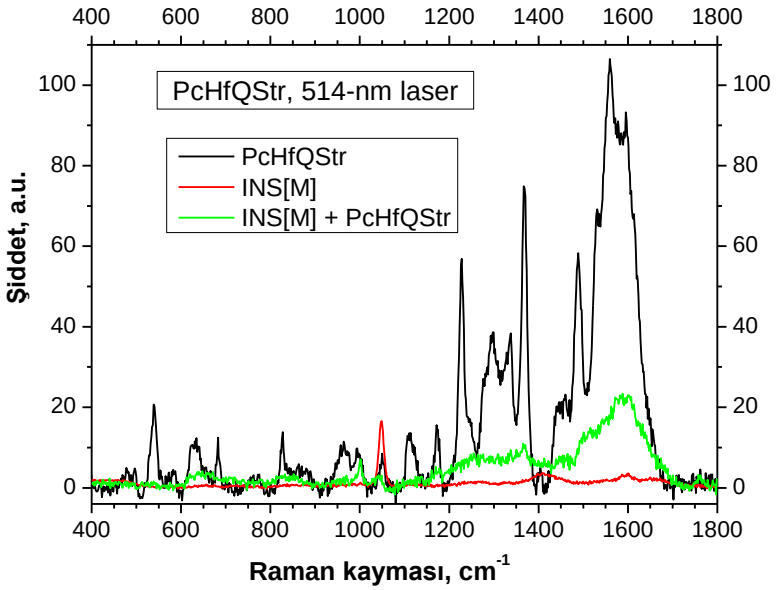
$AEF = (I_{SERS}/c_{SERS}) / (I_{RS}/c_{RS})$

I_{SERS}, I_{RS}, c_{SERS} ve c_{RS} SERS ve RS ölçümlerindeki saçılma şiddetleri (I) ve derişimleri (c) ifade etmektedir. Çeşitli Raman bantları için Şekil 12 ve 13'de görülen spektrumlardan AEF tahmin edilebilir. Elde edilen AEF değerleri 830 nm uyarılmada 10^4-10^5 mertebesindedir. 514 nm'deki uyarılma ile kıyaslandığında belirgin bir şekilde daha yüksek oldukları görülmektedir. Elde edilen AEF değerleri Tablo 3'de görülmektedir.

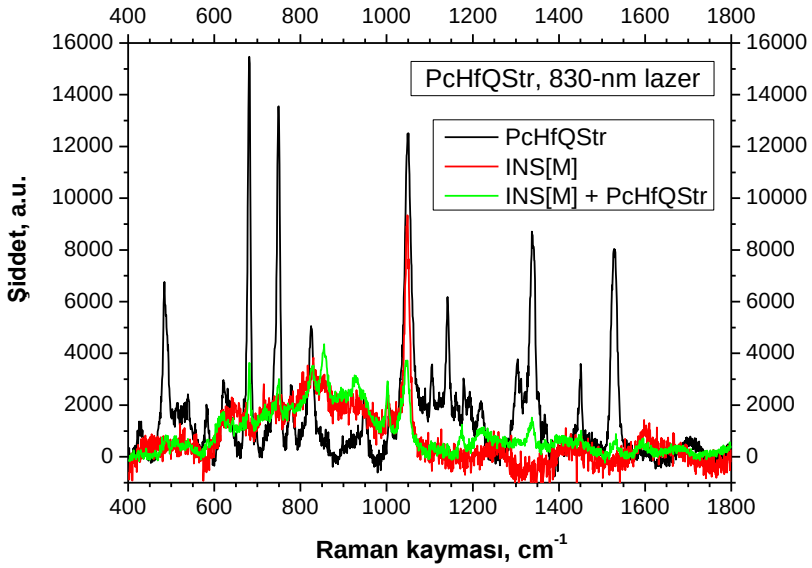
Tablo 3. Fitalosiyanin (PcHfQStr) bileşiğinin 830 nm ve 514 nm uyarılmalarda tahmin edilen analitik genişleme faktörü değerleri.

Uyarılma dalgaboyu, nm	Raman bant dalgasayısı, cm^{-1}	AEF
514	1226	0.7×10^4
	1367	0.6×10^4
	1489	0.6×10^4
830	679	10^5
	1337	5.8×10^4
	1526	4.4×10^4

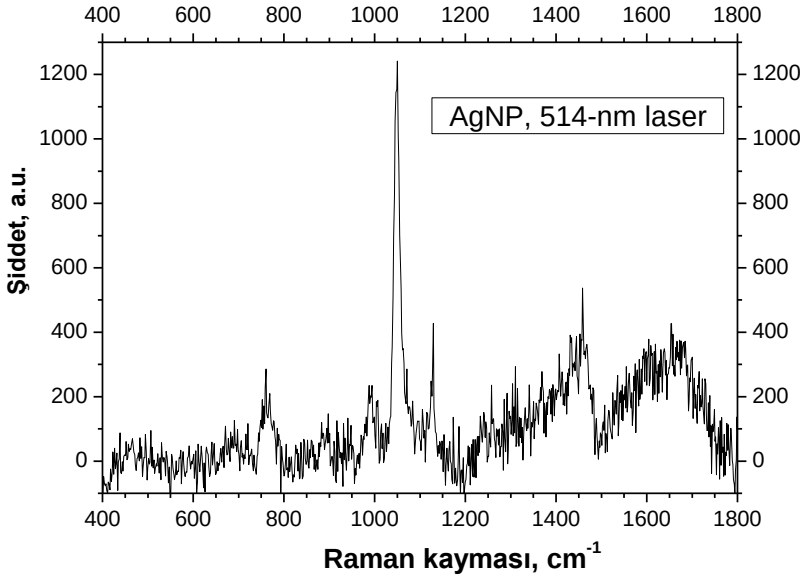
Fibriler insulin varlığında PcHfQStr fitalosiyaninin SERS şiddetinde belirgin bir düşme gözlendi. Bunun nedeninin büyük olasılıkla metal yüzeyi ile mesafenin fibriller nedeni ile artmış olması veya uyarılma dalgaboyunun bir kısmının fibriller nedeni ile saçılması olduğu düşünülmektedir. Fitalosiyaninde monomer insulin varlığında da aynı etki gözlendi. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.14 ve 4.15'de görülmektedir. Ayrıca serbest PcHfQStr, fibril içeren PcHfQStr ve yalnızca fibril içeren örneklerde gözlenen 1051 cm^{-1}'deki kuvvetli bant AgNP'lerin kontrol ölçümlerinde de gözlendi. Kontrol ölçümleri eşdeğer miktarlarda DMF (fitalosiyanin stok çözeltileri için çözücü olarak kullanıldı) ve HCl (fibril çözeltileri içermektedir) kullanılarak yapıldı. Kontrol örneklerinin Raman spektrumları Şekil 4.16 ve 4.17'de görülmektedir. Bu nedenle bu pikin fitalosiyaninlerlede proteinlerlede ilgili olmadığı düşünülmektedir.



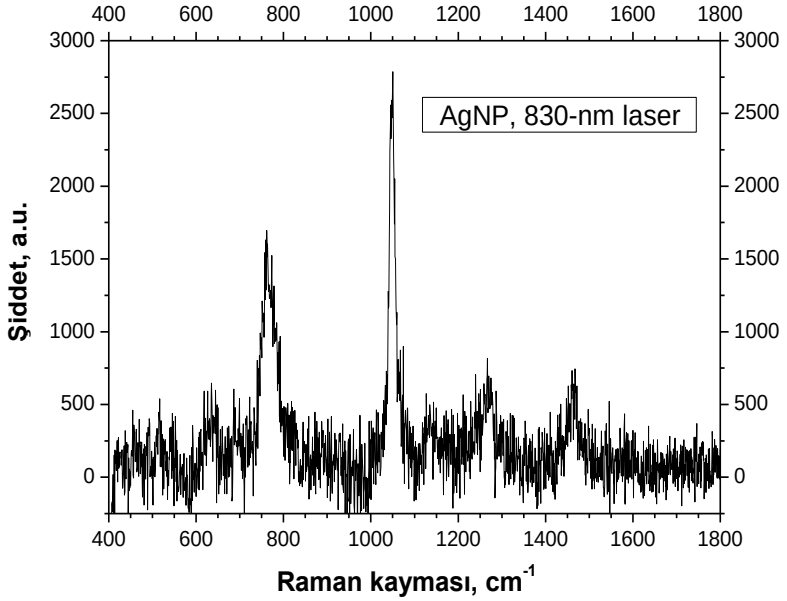
Şekil 4.14. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin (PcHfQStr), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomerik insulinhafniyum (INS[M] + PcHfQStr) örneginin 514 nm uyarılmada SERS spektrumları



Şekil 4.15. Kinolinyum stiril ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin (PcHfQStr), monomeric insülinin (INS[M]) ve monomerik insulinhafniyum (INS[M] + PcHfQStr) örneginin 830 nm uyarılmada SERS spektrumları.



Şekil 4.16. DMF ve HCl varlığında kurutulmuş AgNP'lerin 514 nm uyarılmada Raman saçılma spektrumları.



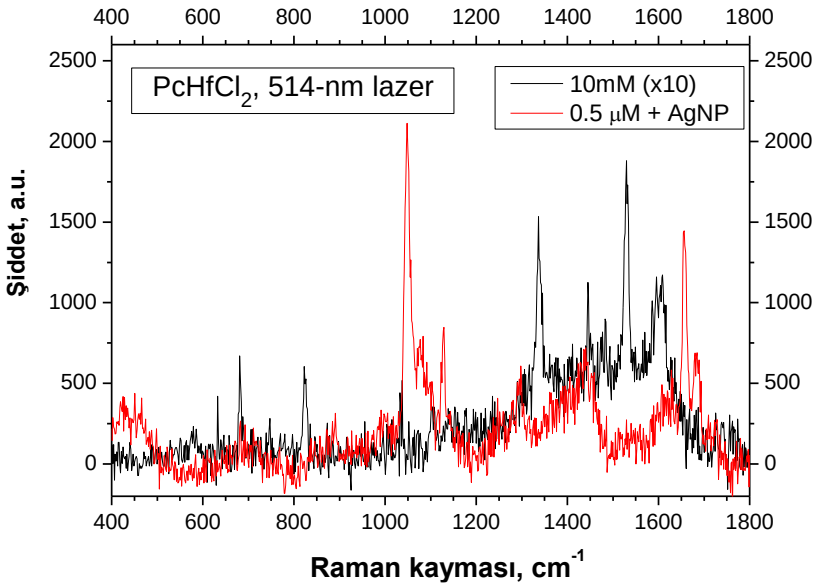
Şekil 4.17. DMF ve HCl varlığında kurutulmuş AgNP'lerin 830 nm uyarılmada Raman saçılma spektrumları.

Klorürür atomları içeren hafniyum fitalosiyanin için, 0.5 μM $PcHfQCl_2$ bileşiğinin AgNP'ler varlığında elde edilen Raman saçılma şiddetlerinin aynı fitalosiyanin bileşiğinin yüzey

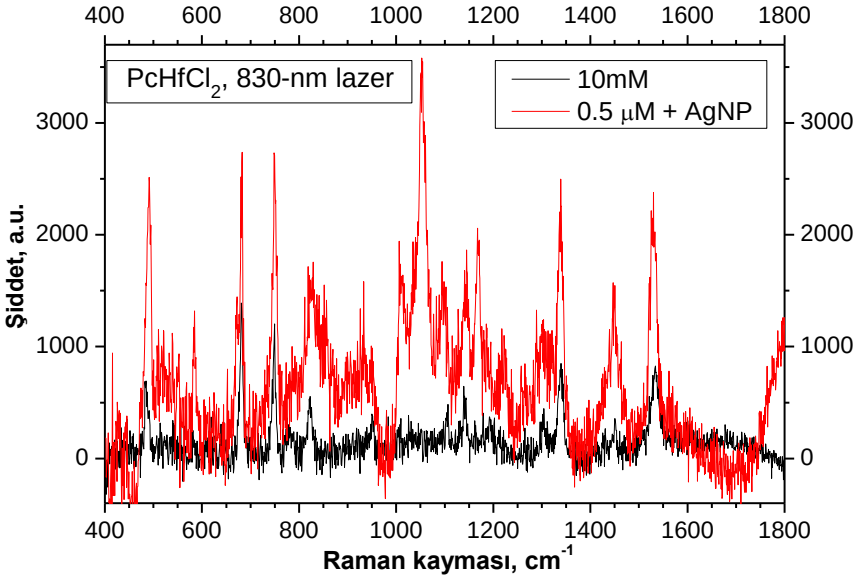
zenginleştirilme kullanılmadan (AgNP olmayan ortamda) 10 mM'lık çözeltisinden elde edilen Raman saçılma şiddeti ile aynı mertebede olduğu gözlendi (Şekil 4.18 ve 4.19). Raman saçılma şiddetlerine metal zenginleştirme etkisinin 10^4 mertebesinde olduğu söylenebilir. 830 nm dalgaboyunda uyarılma sonucu gözlenen bantların pozisyonlarına göre her iki tür spekrtumda da bulunduğu tespit edildi. 514 nm dalgaboyunda uyarılma ile elde edilen SERS spektrumunun ise yüzey zenginleştirme kullanılmayan Raman saçılma spektrumundan önemli oranda farklı olduğu gözlenmiştir. $PcHfCl_2$ bileşiğinin spektrumu PcHfQStr bileşiğinin spektrumu ile kıyaslandığında çok daha düşük sinyal/gürültü oranına sahip olduğu belirlendi. Elde edilen AEF değerleri Tablo'de görülmektedir.

Tablo 4. Fitalosiyanin ($PcHfCl_2$) bileşiğinin 830 nm uyarılmalarda tahmin edilen analitik genişleme faktörü değerleri.

Uyarılma dalgaboyu, nm	Raman bant dalgasayısı, cm^{-1}	AEF
830	681	4.0×10^4
	748	4.5×10^4
	1337	5.9×10^4
	1446	8.8×10^4
	1529	5.8×10^4



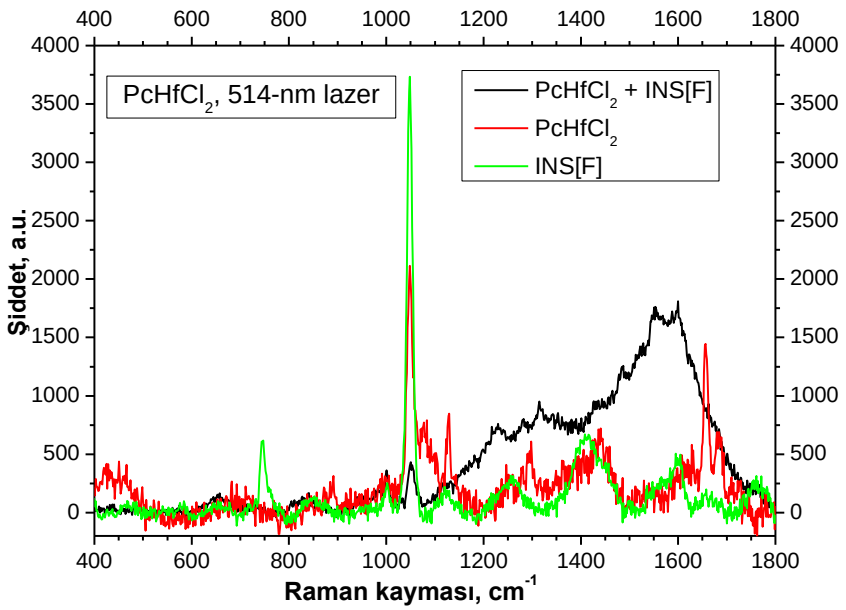
Şekil 4.18. Klorür ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 514 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (kırmızı) ve normal (siyah) Raman spektrumları.



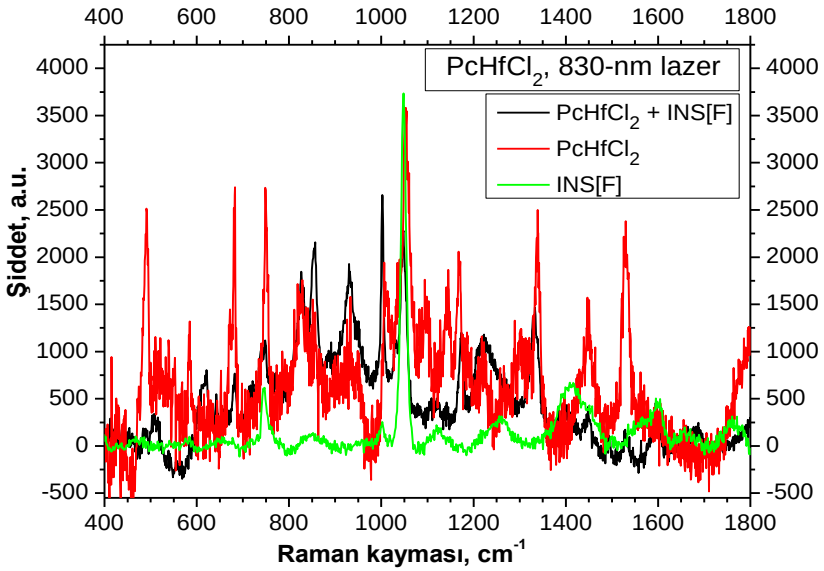
Şekil 4.19. Klorür ligandı içeren hafniyum bileşiğinin 830 nm uyarılma dalgaboyunda yüzey zenginleştirilmiş (kırmızı) ve normal (siyah) Raman spektrumları.

$PcHfCl_2$ fitalosiyanin bileşiğinin de fibriler ve monomerik protein varlığında SERS-prob özellikleri incelendi. Fibriler insülin varlığında 514 ve 830 nm uyarılma dalgaboylarına göre

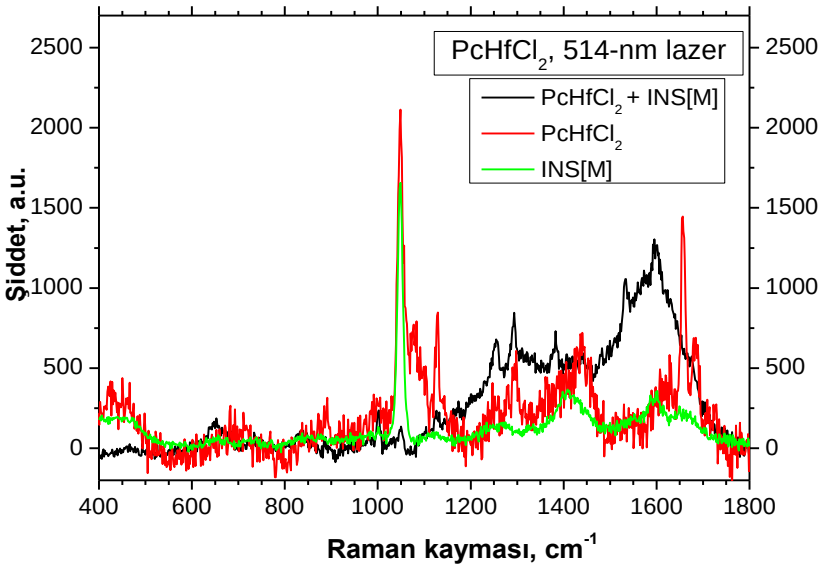
elde edilen spektrumlar sırası ile Şekil 4.20 ve 4.21'de görülmektedir. Şekil 23'de 830 nm dalgaboyunda uyarılma ile elde edilen SERS spektrumunda AgNP'lerin eklenmesi ile fitalosiyanin titreşim bantlarının şiddetinde azalma gözlendi (örneğin; 490 cm^{-1}, 681 cm^{-1}, 748 cm^{-1}, 137 cm^{-1}, 1446 cm^{-1}, 1529 cm^{-1}). Aynı zamanda 852 cm^{-1} ve 929 cm^{-1}'de gözlenen bantların gürültü oranları düştü. Fibriler insulin eklendiğinde 514 nm dalgaboyu uyarması ile elde edilen spektrumda 1310 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1}'de gözlenen bantlarda genişleme gözlenirken diğer bantlar kayboldu. 1310 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1} bantlarının ilerleyen çalışmalarda fibriler insulin tayini için kullanılabileceği düşünüldü. Monomerik insulin eklenmesi her iki dalgaboyunda uyarma (514 nm ve 830 nm) ile elde edilen spektrumlarda da karakteristik fitalosiyanin bantları üzerinde aynı sönüm etkisini gösterdi. Momomerik insülin varlığında elde edilen spektrumlar Şekil 4.22 ve 4.23'de görülmektedir.



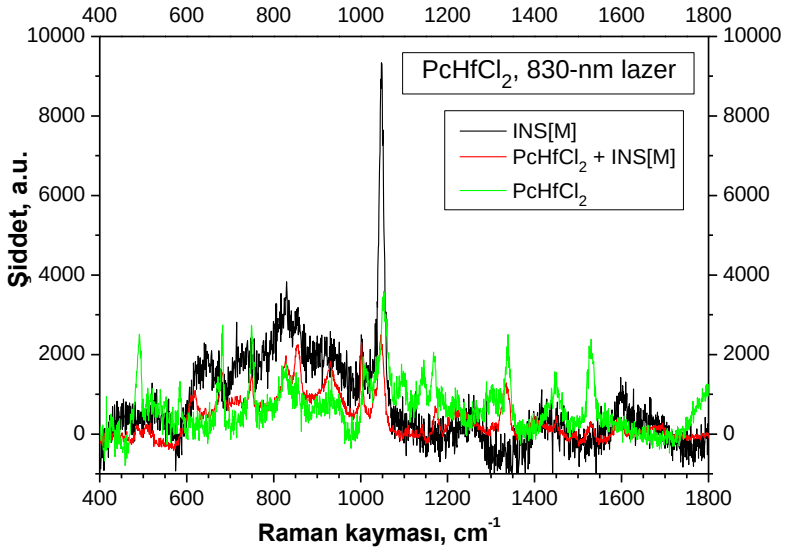
Şekil 4.20. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), insülin amiloid fibrilleri (INS[F] ve fibriler insülin-hafniyum ($PcHfCl_2$ + INS[F]) örneğinin 514 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu.



Şekil 4.21. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), insülin amiloid fibrilleri (INS[F] ve fibriler insülin-hafniyum ($PcHfCl_2$ + INS[F]) örneğinin 830 nm uyarılma'da elde edilen SERS spektrumu.

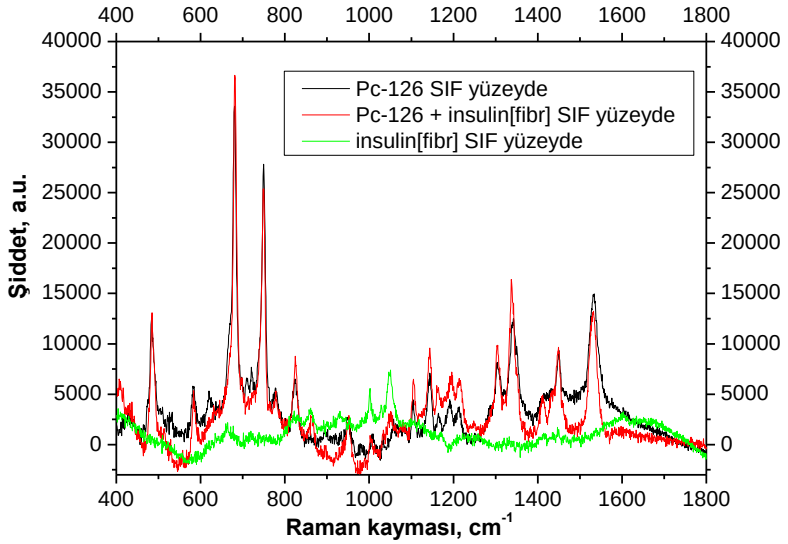


Şekil 4.22. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomeric insulin-hafniyum (INS[M] + $PcHfCl_2$) örneginin 514 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu.

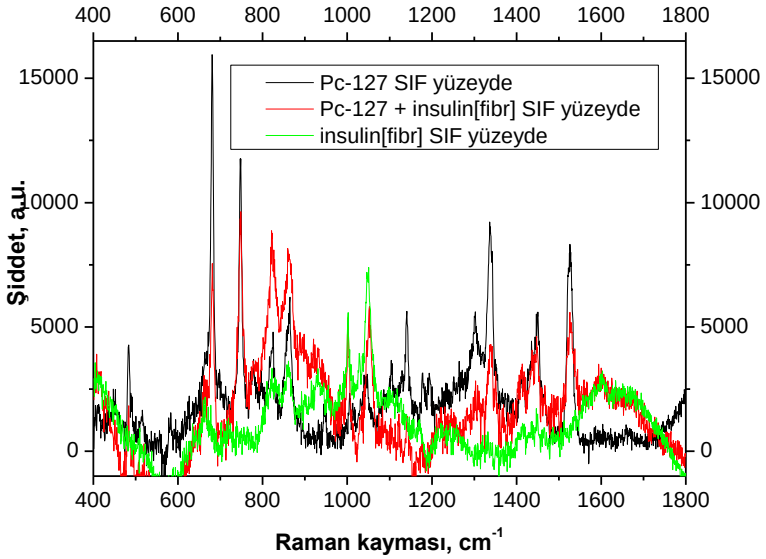


Şekil 4.23. Klorür ligandı içeren hafniyum fitalosiyaninin ($PcHfCl_2$), monomerik insülinin (INS[M]) ve monomeric insulin-hafniyum (INS[M] + $PcHfCl_2$) örneginin 830 nm uyarılmada elde edilen SERS spektrumu.

Pc-126 ve Pc-127 bileşiklerinin serbest halde ve insülin fibrili varlığında yüzey-zenginleştirilmiş Raman spektrumları (SERS) aynı örnek hazırlama yöntemi ile elde edildi. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.24 ve 4.25'de görülmektedir.



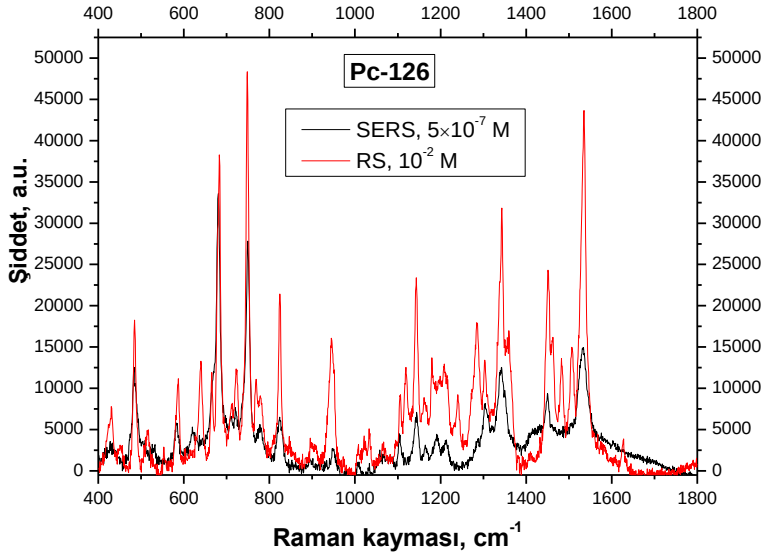
Şekil 4.24. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126'nın serbest ve insülin fibrili varlığında 830 nm uyarılmada SERS spektrumları (Lazer gücü=3 mW; İnsülin fibrilinin SERS spektrumu referans amaçlı olarak alınmıştır).



Şekil 4.25. Zirkonyum fitalosiyanin Pc-127'nin serbest ve insülin fibrili varlığında 830nm uyarılmada SERS spektrumları (Lazer gücü=3 mW; İnsülin fibrilinin SERS spektrumu referans amaçlı olarak alınmıştır).

Spektrumlarda da görüldüğü üzere insülin fibrili eklenmesi Pc-126 ve Pc-127 bileşiklerinin SERS spektrumları üzerinde farklı etki göstermektedir. Pc-126 spektrumunda belirgin değişiklikler görülmemekle beraber Pc-127 spektrumunda bantların yerlerinde ve şiddetlerinde değişiklikler görülmekledir. İnsülin fibrili eklenmesi ile 16'lı iç halkanın nefes alma titreşiminden kaynaklandığı düşünülen 682 cm^{-1}'deki bandın şiddetinde yaklaşık yarı yarıya azalma olmuştur. Bununla beraber 748 cm^{-1} gözlenen ve makrosiklik yapının antisimetrik deformasyonundan kaynaklandığı düşünülen bandın şiddetinde bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuç Pc-126 ve Pc-127 bileşiklerinin fibriler yapı ile etkileşim modlarının farklı olabileceğine işaret etmektedir.

Elde edilen sonuçlarda 0.5 μM Pc-126 örneğinin SERS ölçümlerinden elde edilen mutlak Raman saçılma şiddetinin 10 mM'lık Pc-126 örneğinin normal Raman saçılma spektrumunda gözlenen şiddetle aynı mertebede olduğu gözlendi (Şekil 4.26). Bu sonuç fitalosiyanin bileşiğinin Raman saçılma şiddetlerine yüzey zenginleştirmenin kuvvetli etkisini göstermektedir.



Şekil 4.26. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126 bileşiğinin 830 nm uyarılmada yüzey genişletilmiş (siyah) ve normal (kırmızı; 10^{-2} M DMF çözeltisi kurutularak hazırlandı) Raman spektrumları (Lazer gücü=3 mW).

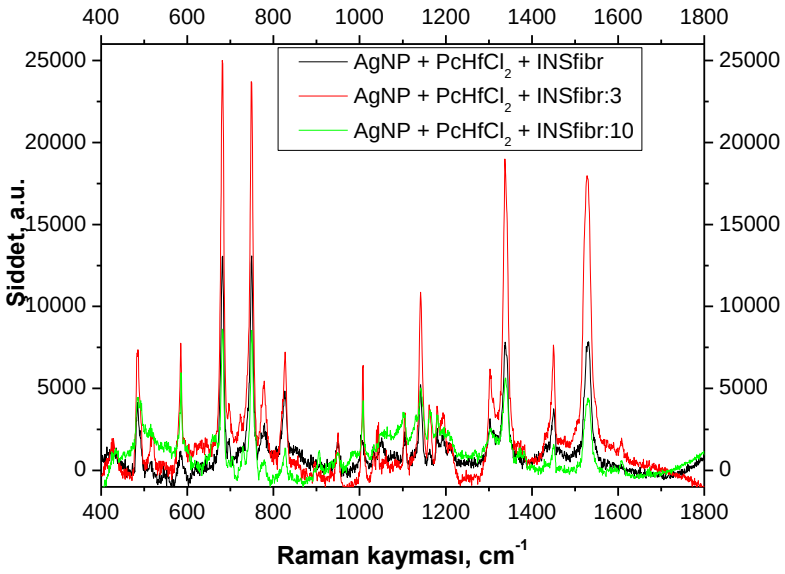
Pc-126 bileşiğinin çeşitli Raman bantları kullanılarak AEF değerleri tahmin edildi. SERS spektrumlarında 0.5 μM'lık, normal Raman saçılma spektrumlarında ise aynı bileşiğin 10 mM'lık çözeltisi kullanıldı (Şekil 28). Sonuçların 10^4 mertebesinde olduğu gözlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. Hafniyum fitalosiyanin Pc-126 bileşiğinin 830 nm uyarılma dalgaboyunda gözlenen bazı bantlarından hesaplanan analitik genişleme faktörü.

Uyarılma dalgaboyu, nm	Raman bant dalgasayısı, cm^{-1}	AEF
830	684	1.8×10^4
	747	1.2×10^4
	1144	0.6×10^4
	1342	0.8×10^4
	1452	0.8×10^4
	1533	0.7×10^4

4.4. $PcHfCl_2$ fitalosiyanin bileşiğinin insülin fibrili ile etkileşimlerinin SERS sinyallerine derişimin etkisi

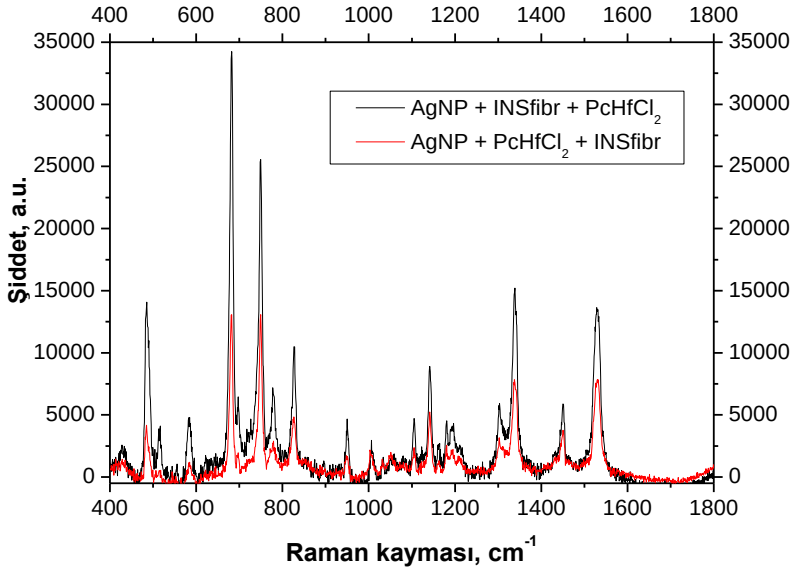
Fibril konsantrasyonunun $PcHfCl_2$'nin SERS spektrumu üzerine etkisi incelendi. Şekil 4.27'da 0.425, 0.142 ve 0.0425 μM fibril varlığında elde edilen spektrumlar görülmektedir. En şiddetli sinyal 0.142 μM fibril varlığında elde edildi. Daha yüksek ve daha düşük derişimlerde elde edilen sinyallerin şiddetlerinde yarı yarıya veya daha fazla azalma olduğu gözlendi. Bu sonucun fitalosiyanin-fibril bağlanmasının bir özelliği sonucu ortaya çıktığı düşünülebilir. Fibriler proteinin bağlanma kısım sayısı bilinmediği için herhangi bir stokiyometrik oran çıkarmak mümkün değildir.



Şekil 4.27. Hafniyum fitalosiyanin $PcHfCl_2$'nin (0.5 μM) çeşitli fibril derişimlerinde elde edilen SERS spektrumları; 0.425 μM (INS fibr), 0.142 μM (INS fibr:3), and 0.0425 μM (INS fibr:10). (λ_{uy}= 830 nm; Lazer gücü 0.3 mW).

Aynı zamanda örnek hazırlarken fibril veya fitalosiyanin bileşiğinin AgNP'ler ile etkileşim sıralamasının SERS spektrumu üzerinde bir etkisi olup olmadığı incelendi. Bir örnekte AgNP üzerine önce insülin fibrili eklenip daha sonra $PcHfCl_2$ eklenirken diğer örnekte önce $PcHfCl_2$ çözeltisi eklenip üzerine insülin fibrili eklendi. Her iki durumda da bantların aynı dağılımda gözlenmesi örnek hazırlamada sıralamanın bir önemi olmadığını ortaya koydu. Buna karşılık bantların şiddetlerinde farklılık olduğu saptandı. Bant şiddetleri aynı mertebede olmakla beraber önce fibril eklenmesi durumunda bant şiddetlerinde yaklaşık 2 kat artış olduğu

gözlendi. İki farklı sıralama ile hazırlanan örneklerden elde edilen spektrumların karşılaştırılmaları Şekil 4.28'de görülmektedir.



Şekil 4.28. Farklı şekillerde hazırlanan örnekler ile elde edilen hafniyum fitalosiyanin $PcHfCl_2$ (0.5 μM)-insülin fibril SERS spektrumları; önce insülin fibrili eklenerek hazırlanan örnek (siyah) ve önce $PcHfCl_2$ eklenerek hazırlanan örnek (kırmızı), (λ_{uy}= 830 nm; Lazer gücü 0.3 mW).

5. SONUÇLAR

1. Dört fitalosiyanin bileşiğinin metal ile yüzey zenginleştirilmesi sonucu elde edilen SERS spektrumlarında şiddet artışının 10^4 mertebede olduğu gözlendi.

2. Fibriler insulin eklenmesi ile elde edilen SERS spektrumlarında, fitalosiyaninlerin bant şiddetlerinde azalma olduğu gözlendi. Bunun sebebinin fitalosiyanin-fibril bağlanmasından dolayı fitalosiyanin ile metal arasındaki mesafenin artması olabileceği düşünüldü.

3. Klorür atomları içeren fitalosiyaninlerin SERS spektrumlarında fibriler insulin eklenmesi sonucu 1310 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1}'deki bantlarında genişleme olduğu gözlendi. Fibriler insulin tayininde ilerleyen çalışmalarda bu bantlardan faydalanabilineceği düşünüldü.

4. İnsülin fibrili Pc-126 ve Pc-127 bileşiklerinin SERS spektrumları üzerinde farklı etkiler gösterdi. Pc-126 bileşiğinin SERS spektrumunda kayda değer bir değişiklik gözlenmezken, Pc-127 bileşiğinin bant konumlarında ve şiddetlerinde farklılıklar gözlendi. Bunun Pc-126 ve Pc-127'nin fibriler yapı ile farklı etkileşim mekanizmalarına sahip olmalarından kaynaklandığı düşünüldü.
5. Fibril varlığında elde edilen hafniyum fitalosiyanin $PcHfCl_2$ SERS spektrumlarında şiddetlerin fibril derişimine bağlı olduğu gözlendi. En yüksek şiddetin gözlendiği derişim saptandı.

7. KAYNAKLAR

Avci, E., Culha, M. 2014. "Influence of Protein Size on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectra in Binary Protein Mixtures", Applied Spectroscopy, 68 (8), 890-899.

Caughey, W.S., Raymond, L.D., Horiuchi, M., Caughey, B. 1998. "Inhibition of proteaseresistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95, 12117-12122.

Chan, J.C. 2011. "Solid-State NMR Techniques for the Structural Determination of Amyloid Fibrils", Topics in Current Chemistry, 2011, 1.

Chaudhuri, T.K., Paul, S. 2006. "Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches" FEBS Journal, 273, 1331-1349.

Chopra, V., Fox, J.H., Lieberman, G., Dorsey, K., Matson, W., Waldmeier, P., Housman, D.E., Kazantsev, A., Young, A.B., Hersch, S. 2007. "A small-molecule therapeutic lead for Huntington's disease: Preclinical pharmacology and efficacy of C2–8 in the R6/2 transgenic mouse", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 104 (42), 16685-16689.

Cooper, G.J., Willis, A.C., Clark, A., Turner, R.C., Sim, R.B., Reid, K.B. 1987. "Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84 (23), 8628-8632.

Ehrnhoefer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., Wanker, E. 2008. "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers", Nature Structural and Molecular Biology, 15, 558-566.

Frydman-Marom, A., Rechter, M., Shefler, I., Bram, Y., Shalev, D., Gazit, E. 2009. "Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies", Angewandte Chemie International Edition, 48 (11), 1981-1986.

Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein", Biochemical and Biophysical Research Communications, 120 (3), 885-90.

Hawkins, P.N., Myers, M.J., Lavender, J.P. 1988. "Diagnostic radionuclide imaging of amyloid: biological targeting by circulating human serum amyloid P component", Lancet, 1, 1413- 1418.

Howlett, D., Cutler, P., Heales, S., Camilleri, P. 1997. "Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation", FEBS Letters, 417, 249-251.

Jennings, C., Aroca, R., Hor, A.M., Loutfy, R. O. 1984. "Raman spectra of solid films 3—Mg, Cu and Zn phthalocyanine complexes", Journal of Raman Spectroscopy, 15 (1), 34–37.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., 1991. "Androgen receptor gene mutations in X- linked spinal and bulbar muscular atrophy", Nature, 352, 77-79.

Lamberto, G.R., Binolfi, A., Orcellet, Ma.L. 2009. "Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α-synuclein amyloid fibril formation", PNAS, 106 (50), 21057–21062.

Lamberto, G.R., Torres-Monserrat, V., Bertosecini, C.W., Salyatella, X., Zweckestetter, M., Griesinger, C., Fernández, C.O. 2011. "Toward the discovery pf effective polycyclic inhibitors of alpha-synucleine amyloid assembly", J Biol Chem., 286 (37), 32036-32044.

Le Ru, E.C., Blackie, E., Meyer, M., Etchegoin, P.G. 2007. "Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study", J. Phys. Chem. C., 111 (37), 13794-13803.

Lee, P.C., Meisel, D. 1982. "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols", J. Phys. Chem., 86, 3391–3395.

Leopold, N., Lendl, B. 2003. " A new method for fast preparation of highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroylamine hydrochloride", J. Phys. Chem. B., 107 (24), 5723-5727.

Merlini, G., Bellotti, V. 2003, "Molecular mechanisms of amyloidosis", The New England Journal of Medicine, 349, 583-96.

Necula, M., Kayed, R., Milton, S., Glabe, C.G. 2007. "Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are

independent and distinct", Journal of Biological Chemistry, 282, 10311-10324.

Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., Tycko, R. 2002. "A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99 (26), 16742-167477.

Prusiner, S.B. 1982. "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie", Science, 216 (4542), 136-144.

Rambaran, R.N., Serpell, L.C. 2008. "Amyloid Fibrils", Prion, 2 (3), 112-117.

Sachse, C., Fandrich, M., Grigorieff, N. 2008. "Paired beta-sheet structure of an Abeta (1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (21), 7462-7466.

Sipe, J.D., Cohen, A.S. 2000. "History of the amyloid fibril", Journal of Structural Biology, 130, 88-98.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. Goedert, M. 1997. "Alpha-synuclein in Lewy bodies", Nature, 388(6645), 839-840.

Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert, M., Hasegawa, M. 2005. "Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins", Journal of Biological Chemistry, 280, 7614-7623.

Taşkıran, E.Z., Yılmaz, E. 2007. "Amiloid birikiminin moleküler temeli ve yeni tedavi yaklaşımları", Hacettpe Tıp Dergisi, 2007, 38, 20-25.

Tycko, R. 2011. "Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure", Annual Reviews of Physical Chemistr, 62, 279-299.

Westermark, P. 2005. "Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides", FEBS Journal, 272, 5942-59499.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. NURİYE AKBAY
Proje No:	114Z464
Proje Başlığı:	Study Of Axially Coordinated Phthalocyanines as Anti-Fibrilogenic Agents and Sers-Probes For Amyloid Aggregates Detection
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	MUSTAFA ÇULHA
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL MEDENİYET Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2014 - 01/12/2016
Onaylanan Bütçe:	15000.0
Harcanan Bütçe:	11401.48
Öz:	Amiloid, çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatları olarak tanımlanır. Bu şekilde yapılan genel tanıma karşın aydınlatılan amiloid tür sayısı günden güne artmaktadır. Elimizdeki bilgiler ışığında 20?den fazla hastalığın patogenezinde amiloid fibril bulunduğunu söyleyebiliriz. 15 yıl öncesine kadar ? tabakaları içermeleri dışında yapıları hakkında çok az şey bilinen amiloidler, günümüzde sebep oldukları hastalıklarla ilişkili olarak tanımlanabilmektedir. Bu kadar kısa sürede bu kadar bilgi elde edilebilmesinin nedeni Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıklara neden olmalarındandır. Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriler yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz-? konformasyonunda ?-tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün başlangıç proteini olan öncülü farklıdır. Bu nedenle bu tarz hastalıklarlarda proteinlerden amiloid fibrillere gidiş mekanizmasına etki tedavi araştırmalarının hedefindedir. Nörodejeneretif hastalıkların ilaç tedavisi için geliştirilen yaklaşımlar arasında agregasyonu engelleyen küçük moleküllerin kullanımı söz konusudur. Proje kapsamında eksensel koordinasyona sahip dört makrosiklik metal bileşiğinin insülin amiloid fibrilleri tayininde SERS probu olarak etkinlikleri incelenmiştir. Bileşiklerden üç tanesi hafniyum bir tanesi ise zirkonyum metal bileşiğidir. Hafniyum bileşikleri eksensel ligand olarak kinolinyum stiril, stiril siyanin ve klorür içermektedir. Zirkonyum bileşiği ise iki tane betaketoenol ligandı içermektedir. Yapılan çalışmalar sonucu dört fitalosiyanin bileşiğinin metal ile yüzey zenginleştirilmesi sonucu elde edilen SERS spektrumlarında da şiddet artışının 104 mertebede olduğu gözlenmiştir. İncelenen fitalosiyaninlerden klorürür içeren hafniyum bileşiğinin SERS spektrumlarında fibriler insulin eklenmesi sonucu 1310 cm -1 ve 1572 cm-1?deki bantlarında genişleme olduğu gözlenmiştir. Fibriler insulin tayininde bu bantlardan faydalanabilineceği düşünülmektedir. Sinyal artışlarının insulin fibrilinin derişimine bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır.
Anahtar Kelimeler:	SERS, fitalosiyanin, amiloid fibril, insülin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Use of SERS for characterization of interaction between phthalocyanine complex and amyloid fibrils (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),

TÜBİTAK