T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİS-AKRİDİN LİGANTLARININ SENTEZİ, YAPISAL KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Hayrettin DİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2013

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Hayrettin DİNÇ tarafından yapılan "Bis-Akridin Ligantlarının Sentezi, Yapısal Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	İmza
Başkan:	Prof. Dr. Çetin AYTEKİN	
Üye:	Doç. Dr. Fikret UYAR	
Üye:	Prof. Dr. Murat KIZIL (Danışman)	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 24/06/2013

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2013

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmalarım sırasında sınırsız desteği ile her türlü bilgi birikiminden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında güler yüzü ve pozitif enerjisi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bütün aşamalarında bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Arş.Gör. Bircan ÇEKEN'e teşekkürü borç bilirim.

Bioorganik araştırma grubunda bulunan değerli hocalarım Sevil EMEN ve Sevcan ALTAŞ'a ilgi ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bütün evrelerinde adeta kendi çalışmasıymış gibi yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Veysel GÜZEL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her türlü destekte bulanan değerli dostum Süleyman ÖZAKIN ve çok değerli Murat AZİZOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bir kısmındaki yardımlarından dolayı lisans öğrencimiz Leyla ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Bu çalışmaya laboratuvar imkânı sağlayıp Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Fen Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP 12-FF-106 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde bana duydukları güven ve sonsuz desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

Hayatı boyunca beni güzel yerlerde hayal eden değeri tarifsiz merhum ANNEMİ rahmetle anıp bu çalışmayı ona adıyorum.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
TEŞEKKÜR		**i**
İÇİNDEKİLER		**ii**
ÖZET		**v**
ABSTRACT		**vi**
RESİM LİSTESİ		**vii**
ŞEKİL LİSTESİ		**viii**
TABLO LİSTESİ		**x**
KISALTMA ve SİMGELER		**xi**
1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1.	DNA ve Yapısı	**1**
1.2.	DNA Hasarının Önemi	**4**
1.3.	Küçük Moleküller ve DNA ile Etkileşimleri	**5**
1.3.1.	Elektrofillerin DNA Yapısındaki Farkı Nükleofillerle Etkileşimi	**6**
1.3.2.	Bazı Radikallerin DNA ile Etkileşimi	**8**
1.3.3.	İnterkalasyon	**10**
1.3.4.	Oluklara Bağlanma	**11**
1.3.5.	Elektrostatik Etkileşim	**13**
1.3.6.	Bis-interkalasyon	**13**
1.4.	Akridinler	**14**
1.5.	Antitümör Antibiyotikler	**16**
1.5.1.	Bleomycin	**16**
1.5.1.1.	Fe^{II}(BLM) Kompleksinin DNA Kesim Mekanizması	**19**
1.5.2.	Enediyen Antibiyotikleri	**20**
1.5.2.1.	Neocarzinostatin	**20**
1.5.2.2.	Esperamicin ve Calicheamicin	**21**
1.5.2.3.	Dynemicin A	**23**
1.5.3.	Antibiyotiklerin DNA Kesimindeki Spesifikliği	**23**

2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**	**25**
3.	**MATERYAL ve METOT**	**37**
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	**37**
3.2.	Kullanılan Aletler	**37**
3.3.	Sentez Çalışmaları	**38**
3.3.1.	2,6-bis{[(6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)etil]metilamino metil}piridin (41)	**38**
3.3.2.	[2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester (52)	**39**
3.4.	Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	**40**
3.4.1.	Çalışmada Kullanılan Organizmalar	**40**
3.4.2.	Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	**40**
3.4.3.	Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılması	**40**
3.5.	DNA Kesim Çalışmaları	**41**
3.5.1.	Agaroz Jel Elektroforezi	**41**
3.5.1.1.	Agaroz Jel'in Hazırlanması	**42**
3.5.1.2.	Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması	**42**
3.5.1.3.	Mini Prep Yöntemi ile Plazmid DNA Saflaştırılması	**42**
3.6.	Çözeltilerin Hazırlanması	**43**
3.6.1.	Bakır(II)klorür Çözeltisinin Hazırlanması	**43**
3.7.	Proflavin HCl' in Nötralleştirilmesi (46)	**43**
3.8.	Asetonun Kurutulması	**43**
3.9.	N,N-Dimetil Formamidin Kurutulması	**44**
4.	**ARAŞTIRMA BULGULARI**	**45**
4.1.	Sentez Çalışmaları	**45**
4.1.1.	2,6-bis{[(6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)etil]metilamino metil}piridin (41) sentezi	**45**
4.1.2.	[2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester (52) sentezi	**48**
4.2.	Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	**50**

4.3. DNA Kesim Çalışmaları **51**

4.3.1. Proflavin (10) ve Sentezlenen Ligantların (41), (52) DNA Kesim Aktiviteleri **52**

4.3.2. Proflavin (10) ve Sentezlenen Ligantların (41), (52) Bakır(II) Varlığında DNA Kesim Aktiviteleri **52**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ **59**

6. KAYNAKLAR **63**

ÖZGEÇMİŞ **73**

ÖZET

BİS-AKRİDİN LİGANTLARININ SENTEZİ, YAPISAL KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayrettin DİNÇ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2013

Gelişen bilim ve teknoloji ile beraber kanserle mücadele yolları artmıştır. Bu yollardan bir tanesi küçük moleküllerin tanıma, bağlanma ve spesifik olarak kesim yapma amacıyla DNA ile etkileşmesidir. Bu yol, son zamanlarda biyoorganik kimya, biyokimya, moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve tıpta ilgi odağı olmuştur.

Katyonik halde bulunan düz ve aromatik yapıdaki etidyum bromürün ve proflavinin DNA baz çiftleri arasına girerek interkalasyona neden oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte proflavin halkasına konjuge *N*-metil-pirol, *N*-metil-imidazol ve süksinamit üniteleri gibi poliamit zincirlerinin DNA küçük oluklarına bağlandığı da bilinmektedir. Poliamit zincirinin iki interkalatör halkaya tutturulmasıyla oluşan bis-interkalatif sistemin, monomer haldeki sisteme göre; DNA'ya daha yüksek bağlanma ilgisine sahip olması, biyolojik aktivitenin daha fazla olması ve daha selektif olarak davranması nedeniyle bizi bis-interkalatör molekülün sentezlenmesine yöneltmiştir. Bu amaçla zincir boyları farklı iki bis-interkalatör molekülü (**41** ve **52**) sentezlendi ve karekterize edildi. Sentezlenen bu ligantların DNA kesim ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. DNA kesim çalışmaları Agaroz Jel Elektroforezi tekniği ile bakır (II) varlığında ve yokluğunda belirlendi. Elde edilen verilere göre ligantların artan konsanrasyonlarında DNA kesiminin arttığı gözlemlenmiştir. Ligantların antimikrobiyal aktivite çalışmaları ise Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi ve standart antibiyotiklere göre ligantların mikroorganizmalara karşı ılımlı inhibisyon gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Proflavin, Bis-interkalasyon, Disk Diffüzyon, DNA Kesimi

ABSTRACT

THE SYNTHESIS, STRUCTURAL CHARATERIZATION, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AND DNA INTERACTION OF BIS-ACRIDIN LIGANDS

MSc. THESIS

Hayrettin DİNÇ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2013

The ways of fight against cancer have increased with emerging science and technology. One of these ways is to design a small molecule that can recognize, bind and cleave DNA in specific way. Recently, this way is become one of the most important and interesting subject in the field of bioorganic chemistry, biochemistry, biotechnology, and medicine.

Cationic, flat and aromatic ethidium bromide and proflavine bind to DNA by inserting and intercalating between the base pairs of the double helix. However, bis-proflavine conjugated polyamide chain similar to *N*-methyl-pyrrole, *N*-methyl-imidazole and succinamide that bind to minor groove of DNA. Bis-intercalators incorporate two covalently attached intercalating ring systems to a polyamide chain of variable length. Therefore, bis-intercalating agents may offer several advantages according to mono-intercalating agents such as, higher binding affinity, much more biological activity and more selectivity, we became interested to synthesise the bis-intercalating agents. With this aim, two bis-intercalation molecules of different chain lengths (**41** and **52**) have been synthesized and characterized. The DNA cleavage activities were determined by Agarose Jel Electrophoresis in the absence and presence of Copper(II). It was observed that DNA strand scission was increased with the increased concentration of ligands. By comparision the antimicrobial activity of ligands with standart antibiotics, the ligands showed moderate inhibition against tested microorganisms.

Keywords: Proflavine, Bis-intercalation, Disk Diffusion, DNA Cleavage

RESİM LİSTESİ

Resim No		Sayfa No
Resim 4.1.	Ligantların *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi	**55**
Resim 4.2.	Ligantların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi	**55**
Resim 4.3.	Ligantların *Streptecocus pyogenes* ATCC 19615 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi	**56**
Resim 4.4.	Ligantların *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi	**56**
Resim 4.5.	Ligantların *Bacillus subtilis* ATCC 11774 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi	**57**
Resim 4.6.	Ligantların *Candida albicans* ATCC 10231 mantarı üzerindeki inhibisyon etkisi	**57**
Resim 4.7.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (**10**), (**41**) ve (**52**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi	**58**
Resim 4.8.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır(II) klorür varlığında (**10**), (**41**) ve (**52**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi	**58**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 1.1.	1953 yılında Watson ve Crick tarafından önerilen DNA modeli	**1**
Şekil 1.2.	DNA'nın pürin ve pirimidin bazları	**2**
Şekil 1.3.	DNA'nın kimyasal kompozisyonu	**2**
Şekil 1.4.	DNA'nın çift zincir yapısı	**3**
Şekil 1.5.	DNA'nın A-DNA, B-DNA ve Z-DNA yapıları	**4**
Şekil 1.6.	Actinomcyin D antibiyotiğinin yapısı	**5**
Şekil 1.7.	DNA bazlarında ve şeker fosfat iskeletinde nükleofilik kısımlar	**6**
Şekil 1.8.	Elektrofillerin DNA kesim mekanizması	**7**
Şekil 1.9.	Bazı önemli alkilleyici ajan türleri	**8**
Şekil 1.10.	Bazı radikal türlerinin deoksiribozdan hidrojen koparma reaksiyon mekanizması	**9**
Şekil 1.11.	Ligandın DNA ile interkalasyonu	**10**
Şekil 1.12.	Bazı interkalatör türleri	**11**
Şekil 1.13.	Ligandın oluklara bağlanması	**12**
Şekil 1.14.	İyonun DNA dış yüzeyi ile elektrostatik etkileşimi	**13**
Şekil 1.15.	Ligandın DNA ile bis-interkalasyonu	**14**
Şekil 1.16.	Akridin türevleri	**15**
Şekil 1.17.	Bleomycin türevleri ve etkin bölgeleri	**17**
Şekil 1.18.	Bleomycin'nin demir ve kobalt metali ile kompleksleri	**18**
Şekil 1.19.	Bleomycin'nin DNA kesim mekanizması	**19**
Şekil 1.20.	Fe^{II}(BLM) kompleksinin DNA'yı kesme mekanizması	**19**
Şekil 1.21.	Neocarzinostatin'in yapısı	**20**
Şekil 1.22.	Neocarzinostatin'in O_2 ile aktivasyonu	**21**
Şekil 1.23.	Esperamicin ve Calicheamicin antibiyotiklerinin yapıları	**22**
Şekil 1.24.	Dynemicin A antibiyotiğinin yapısı	**23**

Şekil 1.25. Antibiyotiklerin DNA'yı kesme mekanizmaları **24**

Şekil 3.1. 41 nolu ligandın sentez şeması **38**

Şekil 3.2. 52 nolu ligandın sentez şeması **39**

Şekil 3.3. Plazmid DNA'nın formları **41**

TABLO LİSTESİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 4.1.	41, 10 ve 52 ligantlarının bakteriler ve mantarlar üzerinde meydana getirdiği zon çapları (mm)	**54**
Tablo 4.2.	Standart antibiyotiklerin bakteriler ve mantarlar üzerinde meydana getirdiği zon çapları (mm)	**54**

KISALTMALAR

BLM :Bleomycin antibiyotiği

DMF :N,N-Dimetil formamid

DMSO :Dimetil sülfoksit

DNA :Deoksiribonükleik asit

RNA :Ribonükleik asit

ESR :Elektron spin rezonans

HPLC :Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi

MTT :Microculture tetrazolium salt

NADPH :Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

N.C.C.L.S :National Committee for Clinical Laboratory Standarts

NMR :Nükleer manyetik rezonans

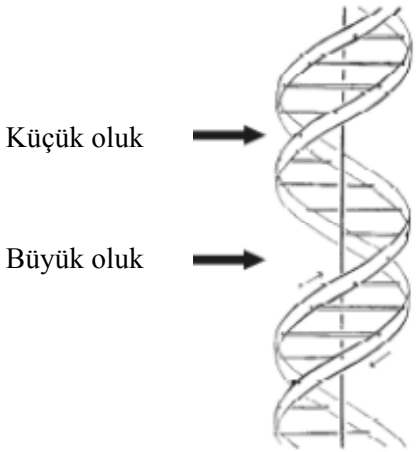
UV-visible :Ultraviyole-görünür spektrofotometre

1. GİRİŞ

1.1. DNA ve Yapısı

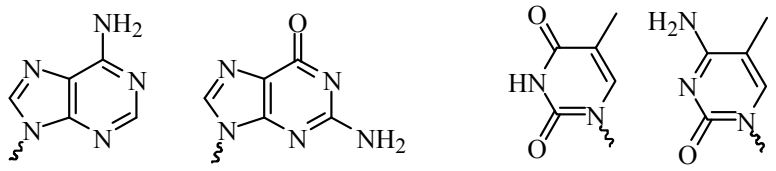
İsveçli kimyager Friederich Meischer 1869 yılında hücrelerin kimyasal kompozisyonunu belirlerken deoksiribonükleik asit yani DNA'yı şans eseri keşfetti. Meischer, bandajdan aldığı irinden beyaz kan hücrelerini izole etmeye çalışırken, deneyler sırasında izole ettiği hücrelerin bulunduğu çözeltiye asit ilave ettiğinde bir çökelmenin olduğunu, baz ilave ettiğinde ise bu çökmenin kaybolduğunu gözlemlemiştir. Bu maddenin hem kompozisyonu hem de özellikleri bakımından proteinlerden farklı olduğunu tespit etmiş ve bu bilinmeyen maddeye çekirdek adını vermiştir. Ancak bu buluşun bir genetik materyal taşıdığını tahmin edememiştir (Dahm 2005). Bu buluşun değeri yaklaşık 80 yıl sonra 1944'te Avery ve arkadaşları tarafından anlaşılmıştır. Hershey ve Chase 1952 yılında viral proteinlerin bakteri hücresine girmemesine karşın viral DNA'nın bakteri hücresine girdiğini tespit ederek Avery'nin bu hipotezini kanıtlamıştır.

Her ne kadar 1800'lü yılların sonlarında DNA'nın kompozisyonu bilinse de 1953 yılına kadar DNA yapısı bilinmemekteydi (Watson ve Crick 1953). Watson ve Crick (Şekil 1.1.) klasik olarak DNA'nın çift sarmallı olduğunu keşfetmişler ve bu çalışmadan dolayı 1962 Nobel Tıp Ödülü'ne layık görülmüşler.



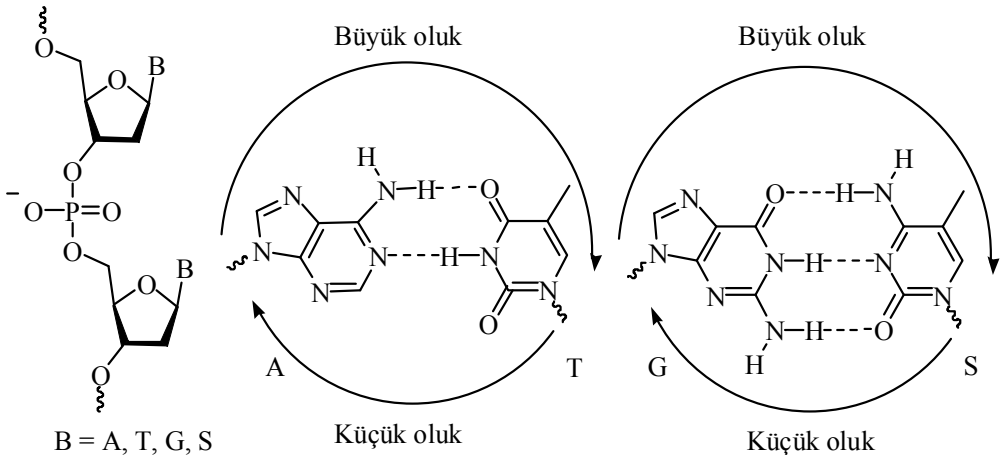
Şekil 1.1. 1953 yılında Watson ve Crick tarafından önerilen DNA modeli

DNA, birbirine zıt iki polinükleotit zincirden oluşan ve ortak eksen etrafında dönen heliks yapısındadır. Heliksin dış kısmında deoksiriboz şekerlerini birbirine bağlayan fosfat grupları vardır. Nükleotitler heliksin iç kısmında bulunan şeker ile kovalent olarak bağ yapar. Deoksiribonükleik asit iki pürin ve iki pirimidin bazı olmak üzere toplam dört farklı baz içerir. Pirün bazları; Adenin ve Guanin (Şekil 1.2.a.), pirimidin bazları ise Timin ve Sitozin'dir (Şekil 1.2.b.) (Todd ve ark. 1953).



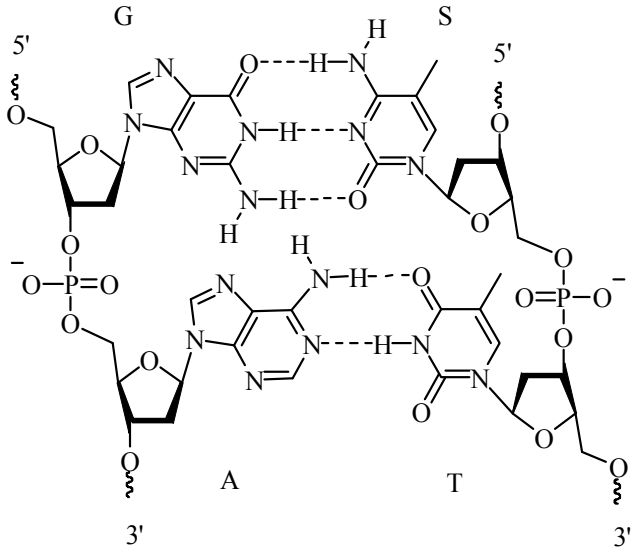
Şekil 1.2. DNA'nın pürin ve pirimidin bazları

Adenin (A) her zaman Timin (T) ile iki hidrojen bağı, Guanin (G) ise Sitozin (S) ile üç hidrojen bağı yaparak bağlanır (Şekil 1.3.). Gerek zıt nükleotit zincirlerdeki bazlar arası hidrojen bağı gerekse aynı nükleotit zincirinde bulunan komşu bazların kendi aralarında olan π–π etkileşimi DNA'nın sıkı istiflenmesine ve sağ el heliks yapısının oluşmasına neden olur. Sağ el heliksin bir tur dönmesi 10 baz çiftine denk gelir. DNA'nın sağ el heliks yapısında küçük ve büyük oluk olmak üzere iki farklı bölge oluşur (Şekil 1.3.) (Hanlon 1966, Beak 1977).



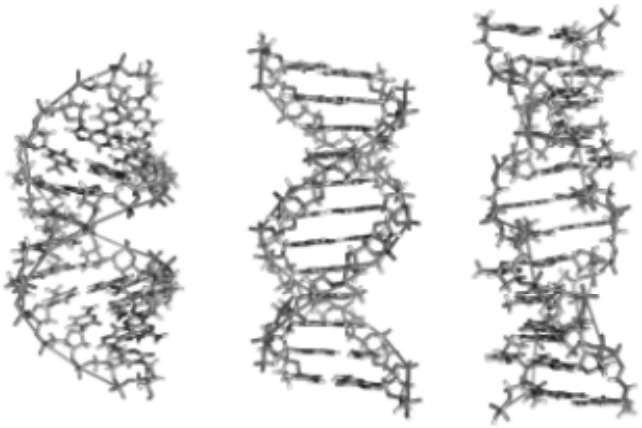
Şekil 1.3. DNA'nın kimyasal kompozisyonu

Baz çiftleri arasındaki glikozidik bağlar tamamıyla zıt değildirler. Belli bir açı ile bir araya gelirler (Şekil 1.4.) (Stryer 1988). Bazlar ve şekerdeki lokal sapmalardan dolayı DNA farklı formlarda izomerleşebilir. En önemli formlar A-DNA, B-DNA (sağ el heliks) ve Z-DNA'dır (sol el heliks) (Neidle 1999). 1950 yılından önce DNA'nın hem A-DNA hem de B-DNA formlarını içeren X-ray desenleri vardı, ancak doğru bir yapı belirtmek çok zordu. Franklin'in, DNA'nın birkaç formdan oluşabileceğini belirtmesinden (Franklin ve ark. 1953) sonra Wilkins ilk defa çok net bir desen keşfetti (Wilkins ve ark. 1953). Bundan sonra Watson ve Crick B-DNA formunu ilk keşfedenler oldular (Watson ve Crick 1953).



Şekil 1.4. DNA'nın çift zincir yapısı

Her bir konformasyon iki tane antiparalel polinükleotid zincirlerinin hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanması sonucu oluşur, fakat heliks şekilleri farklıdır. En baskın form olan B-DNA'nın tek zincirindeki komşu baz çiftlerinin arası 0.34 nm'dir. B-DNA'da her dönüşte 10 baz çifti bulunur. Bu formda sarmalın dış kısmında düzenli olarak sıralanmış bir büyük ve bir küçük oluk vardır. A-DNA, B-DNA'ya göre biraz daha düzensiz ve sıkışık bir formdur. Sarmalın bir tur dönüşü 11 baz içerir. Z-DNA'da ise 12 baz çifti bulunur. Bu formda diğer formların aksine sadece küçük oluk vardır ve bazlar zikzak çizmiş gibi görünürler (Şekil 1.5.) (Silverman 1991).



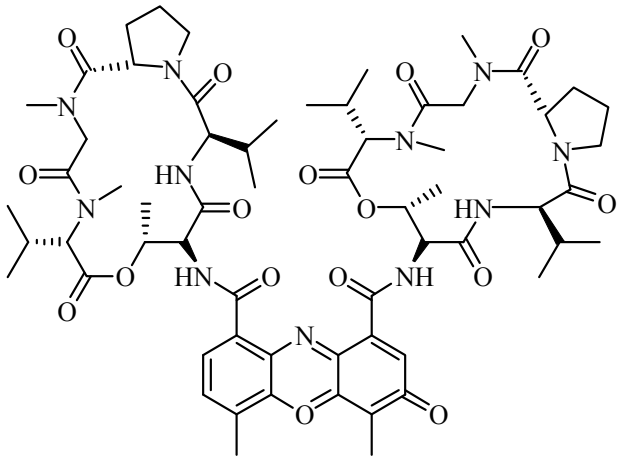
Şekil 1.5. DNA'nın A-DNA, B-DNA ve Z-DNA yapıları

1.2. DNA Hasarının Önemi

Hücresel işlemleri tasarlayan ve düzenleyen çift sarmal deoksiribonükleik asit (DNA) içindeki heterosiklik bazların dizisi genetik kodu oluşturur (Watson ve Crick 1953, Alberts ve ark. 2002). Hücresel DNA transkripsiyonu sırasında genlerin doğru okunması fonksiyonel proteinler için gereklidir (Alberts ve ark. 2002). Buna ek olarak, genetik kodun birebir kopyasını içeren dişi hücrelerin meydana gelmesi için DNA'nın hatasız replikasyonu gereklidir (Alberts 2002, 2003). Bu söylemle beraber, apoptotik veya nekrotik mekanizma ile hücre ölümüne veya hücre büyümesinin inhibisyonuna, DNA'nın kimyasal modifikasyonunun öncülük etmesi şaşırtıcı değildir (Zhou 2000, Norbury 2001, Rouse 2002, Green 2005). Bazı hücresel sistemler DNA hasarını tamir eder (Lindahl 1999, Hoeijmakers 2001, Scharer 2003, Friedberg 2003). Bu aşamada genetik koddaki hatalı bir okuma, DNA'nın hatalı eşleşmesine neden olur (Hemminki 1993, O'Neill 2000, Luch 2005). Bu sebeplerden dolayı biyoteknoloji, toksikoloji, karsiyogenez, ve medisinal kimya gibi alanlarda DNA hasarı çalışmaları temelde ve pratikte büyük önem taşır.

1.3. Küçük Moleküller ve DNA ile Etkileşimleri

1953 yılında Watson ve Crick, genetik materyal olduğu bilinen DNA'nın yapısal olarak çift sarmal heliks olduğunu (Watson ve Crick 1953) belirttikten sonra DNA'nın yapısal özellikleri ve bu özelliklerin replikasyonda ve transkripsiyonda ne tür bir rol üstlendiği merak konusu olmuştur. Özellikle kanser gibi genetik orijinli hastalıkların tanısı ve tedavisi için büyük önem kazanmıştır. Bilim insanları 40 yılı aşkın bir süredir antikanser ilaç dizaynında küçük moleküllerin nükleik asitlerle etkileşme modu üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Rauen ve Reich 1960'lı yıllarda actinomcyin D antibiyotiğinin (Şekil 1.6.) DNA baz çifleri arasında interkalayon yaptığını göstererek hücresel metabolizmanın bozulması için DNA'yı güçlü bir hedef haline getirmişlerdir (Kersten 1960, Reich 1964).

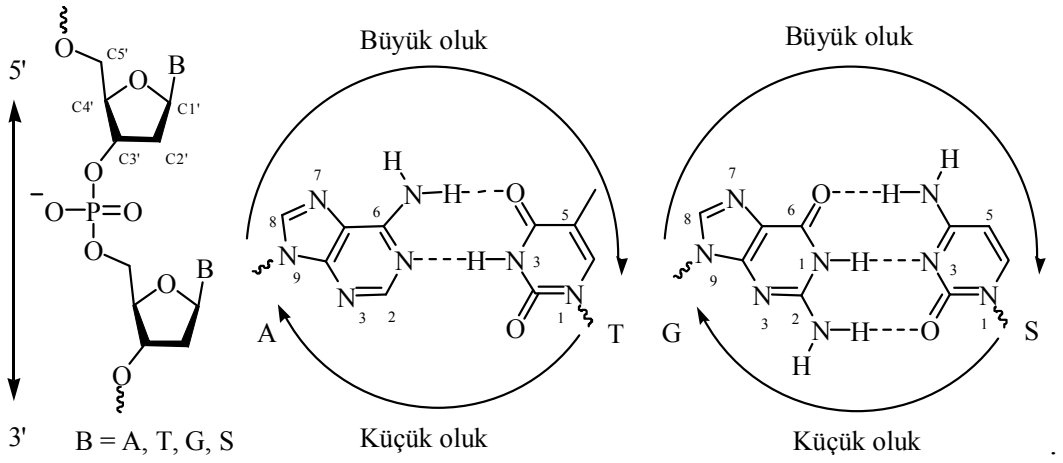


Şekil 1.6. Actinomcyin D antibiyotiğinin yapısı

Küçük moleküller DNA ile kovalent ve kovalent olmayan iki farklı modifikasyon mekanizması ile etkileşirler. Kovalent modifikasyon; küçük moleküllerin elektrofil kısımları ile DNA'nın nükleofil kısımlarının etkileşme reaksiyonu veya küçük moleküllerdeki radikallerin DNA ile etkileşme reaksiyonu olmak üzere iki farklı mekanizma üzerinden yürüyebilir. Kovalent olmayan etkileşim mekanizması ise küçük organik moleküller ve iyonların DNA ile interkalasyon, DNA oluklarına bağlanma ve DNA ile elektrostatik etkileşim olmak üzere üç temel mekanizma üzerinden gerçekleşir.

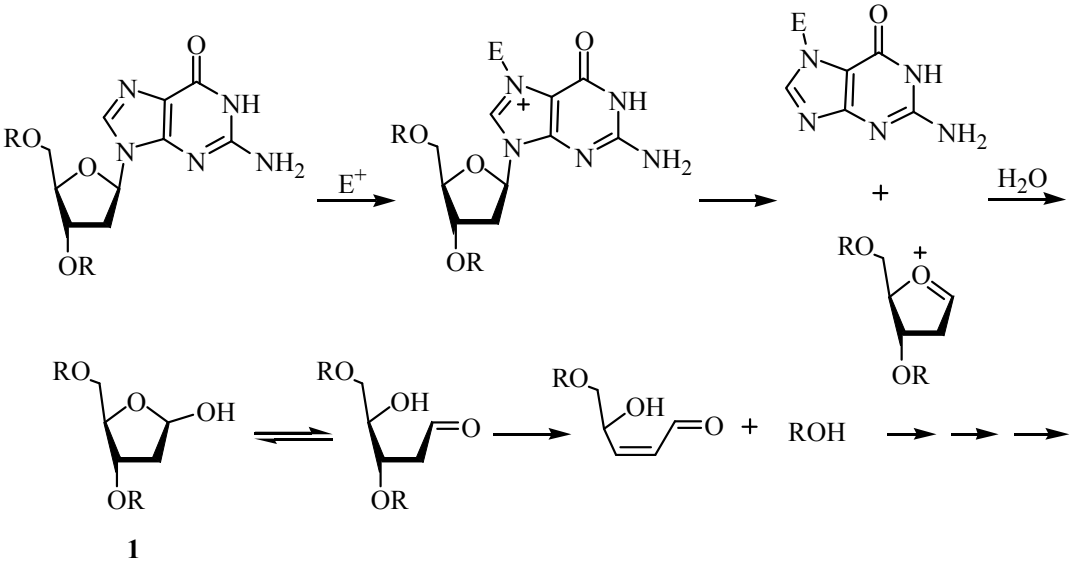
1.3.1. Elektrofillerin DNA Yapısındaki Farklı Nükleofillerle Etkileşimi

Elektrofiller DNA yapısındaki farklı nükleofilik kısımlarla reaksiyona girebilir. Her ne kadar aktivite elekrofillerin kimyasal yapılarına bağlı olsa da elektrofiller genellikle DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına karşı seçicilik gösterirler (Brookes ve ark 1961, Lawley 1963, Singer 1976). Elektrofilik doğal ürünler ile guaninin N-7, adeninin N-3 ve N-7 kısımlarının yanı sıra ekzosiklik N^2 amino grubu ile adeninin N-7 ve guaninin N-3 kısımları en çok modifikasyona uğrayan kısımlardır (Şekil 1.7) (Brookes ve ark 1961, Pullman ve ark. 1981, Lawley 1963).



Şekil 1.7. DNA bazlarında ve şeker fosfat iskeletinde nükleofilik kısımlar

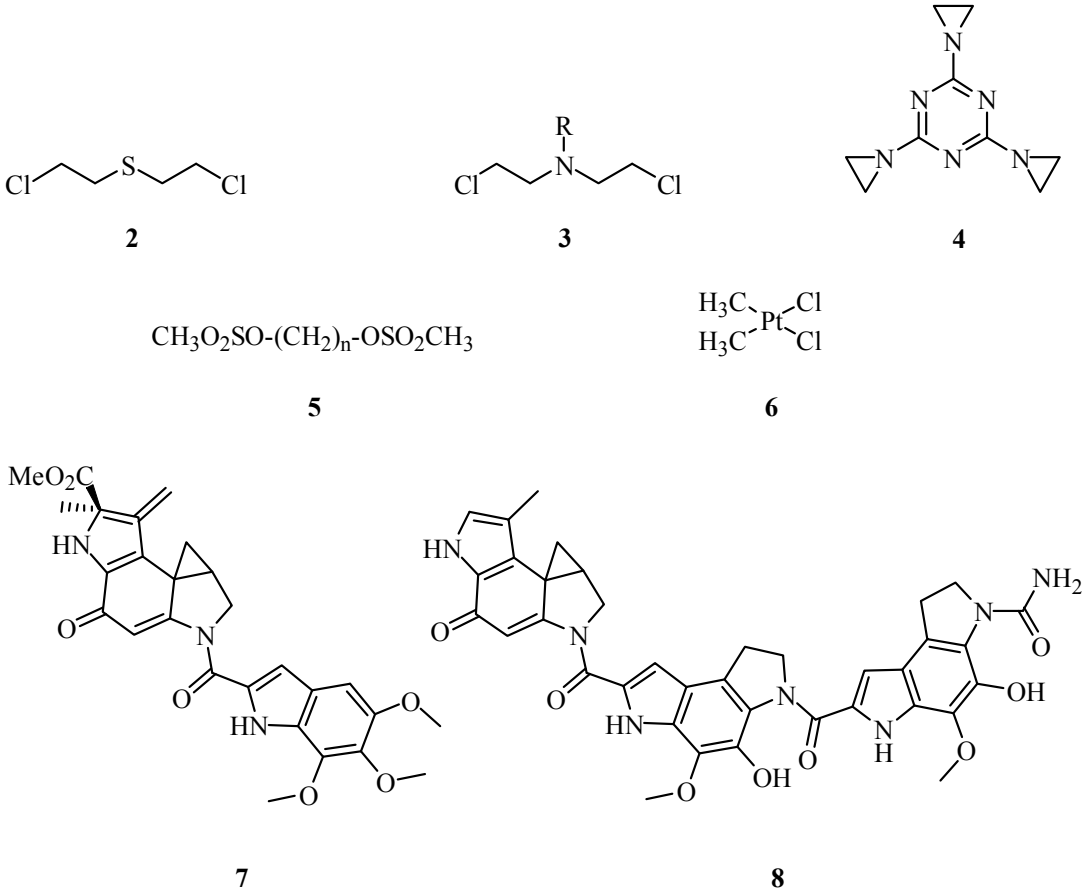
Pürin kalıntılarının N-7 ya da N-3 pozisyonunda meydana gelen elektrofilik modifikasyon sonucu glikozidik bağ zayıflar (Lawley 1963, Mattes 1986). Bunun sonunda abazik bölge (**1**) oluşur ve nötral şartlarda bu bölgeler hidrolizlenerek DNA kesimi gerçekleşir (Şekil 1.8) (Bennett ve ark. 1993, Lindahl ve ark. 1972). Abazik bölge alkali şartlarda hızlı bir şekilde zincir kırıklarına neden olur (Maxam 1980, Mattes ve ark. 1986, Sugiyama 1994). Elektrofilik türlerin DNA bazlarındaki ekzosiklik azotları ve karbonil oksijenleriyle veya DNA iskeleti üzerinde bulunan fosfat oksijenleriyle reaksiyonu genellikle kararlı ürünler oluştururlar ve bu ürünler ortalama pH koşullarında kendiliğinden DNA zincirinde kırığa neden olmazlar (Wong ve ark. 1994, Singer 1978).



Şekil 1.8. Elektrofillerin DNA kesim mekanizması

Bu tür mekanizma ile yürüyen küçük moleküller alkil ajanları olarak bilinirler ve bunların sebep olduğu reaksiyona da alkilasyon denir. Bu reaksiyonlar S_N1 ve S_N2 mekanizması üzerinden yürür ve bu tür ajanların en reaktif oldukları kısım Adenin ve Guaninin N-7 ve N-3 kısımlarıdır (Lawley 1963; 1996, Beranek 1990). DNA'nın olası alkilasyon çeşitlerinin olması, çoğu alkilasyon ajanlarının mutajenik ve/veya karsiyojenik olmaları, genellikle DNA sentezini bloke etmeleri, diğer biyomoleküllerle reaksiyona girebilmesi (yan etki) ve Hem mono-fonksiyonel hem de bis-fonksiyonel (çapraz bağlayıcılar) ajan olabilme gibi özellikleri vardır.

Kanser terapisinde kullanılan en önemli alkilleyici ajanlar; I. ve II. Dünya Savaşı sırasında kullanılan sinir gazı olarak da bilinen sülfür hardallarından (**2**) esinlenerek sentezlenen azot hardalları (**3**), etileniminler (**4**), metanosülfonik asit esterleri (**5**), platin komplekleri (**6**), siklopropan halkasına sahip (+)-CC-1065 (**7**), Duocarmycin antibiyotikleri (**8**) ve bunların analoglarıdır.

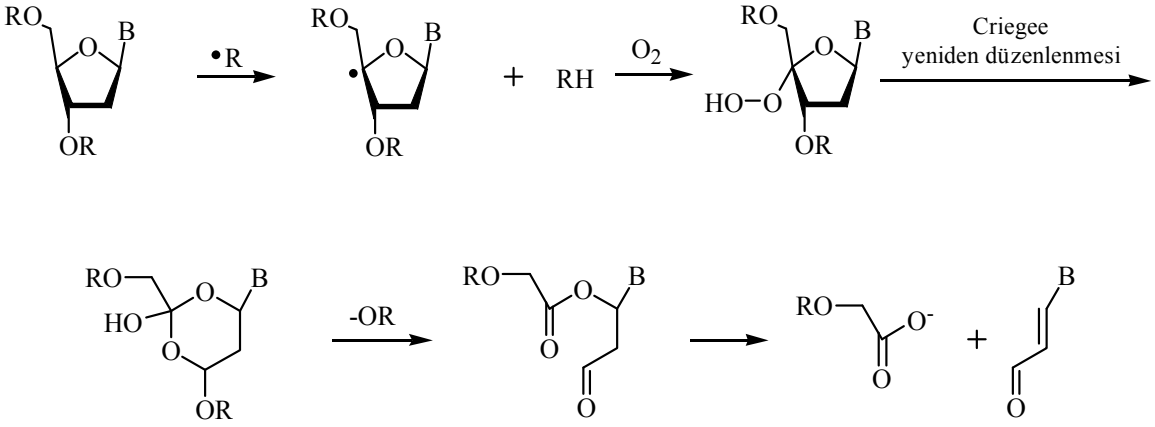


Şekil 1.9. Bazı önemli alkilleyici ajan türleri

1.3.2. Bazı Radikallerin DNA ile Etkileşimi

Birçok radikal türü DNA ile değişik pozisyonlarda reaksiyona girebilir. Yoğun araştırmaların konusu olan DNA hasarının önemli bir mekanizması, radikaller tarafından DNA iskeletinde bulunan deoksiriboz şekerden bir hidrojen koparmasıdır (Breen 1995, Sonntag ve ark. 1981). Deoksiriboz şekerden bir hidrojen atomu koparılarak kesimle sonuçlanan reaksiyonun bütün basamakları tamamıyla bilinmektedir (Şekil 1.10) (Pratviel ve ark. 1995, Sonntag ve ark. 1981). Radikaller, şeker-fosfat iskeleti dışında, DNA bazlarıyla da reaksiyona girebilirler (Zady 1980, Barvian 1995). Bu tür reaksiyonlar deoksiriboz iskeletinde kesime neden olmazken DNA'da modifikasyona neden olurlar. Böyle modifikasyonlar biyolojik öneme sahiptirler. Radikaller veya öncü radikaller DNA'ya spesifik olarak bağlanmadığı zaman, DNA kesimi küçük dizilerle veya baz spesifikliği ile meydana gelir (Tullius 1987). Bunun aksine alkilleyici ajanlarla DNA kesimi bir veya daha fazla DNA bazı

için selektivite gösterir. DNA hasarı; oksijen merkezli (süper oksit radikali, hidroksi radikali vb.) (Breen 1993; 1995, Sonntag ve ark. 1981), karbon merkezli (aril radikali) (Zady 1980, Nicolaou 1991), azot merkezli radikaller ve hidrojen radikali (Sonntag ve ark. 1981) ile gerçekleşir.

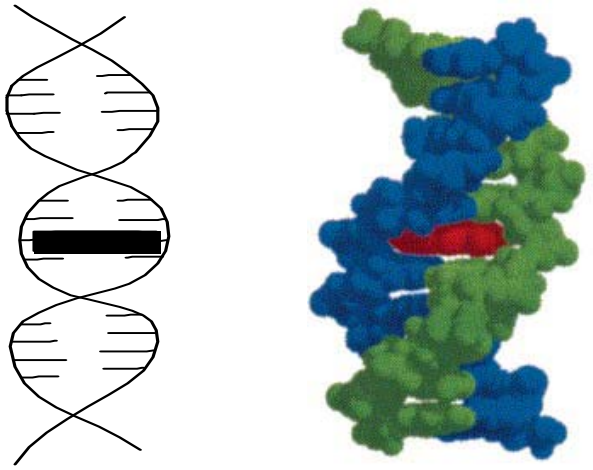


Şekil 1.10. Bazı radikal türlerinin deoksiribozdan hidrojan koparma reaksiyon mekanizması

Deoksiribozdan hidrojen koparma reaksiyonun kolaylığı tamamıyla C-H bağının kuvvetine bağlıdır (Miaskiewicz 1994). Deoksiribozun 1', 2', 3' ve 4' pozisyonlarından koparılan hidrojenlerin hesaplanan entalpileri, 1', 4' ve 3' pozisyonlarındaki C-H bağının kuvvetiyle doğru orantılıdır. Bu durumda karbon merkezli radikaller bir komşu oksijen ile kararlı olurlar (Miaskiewicz 1994). 2' pozisyonundaki C-H bağının enerjisi diğer C-H bağının enerjilerine göre kısmen de olsa daha yüksektir. Bütün pozisyonlardaki C-H bağ enerjileri 87.3 ile 91.2 kcal/mol arasındadır (Miaskiewicz 1994). Bu hesaplama tetrahidrofurandaki α-hidrojeni için deneysel olarak hesaplanan (92 kcal/mol) bağ enerjisi ile kıyaslanmıştır (Golden 1969). Pratikte oldukça reaktif olan hidroksi radikali (HO•), DNA iskeletinin her pozisyonundan hidrojen atomu koparabilir ancak reaksiyon esnasında her pozisyondaki C-H bağının kuvvetine nazaran o pozisyondaki sterik engel önemlidir (Balasubramanian 1998). DNA'daki deoksiriboz hidrojenlerin sterik engeli; H5'>H4'>>H3'>>>>>H2'>>>>>H1' şeklinde sıralanabilir (Balasubramanian 1998).

1.3.3. İnterkalasyon

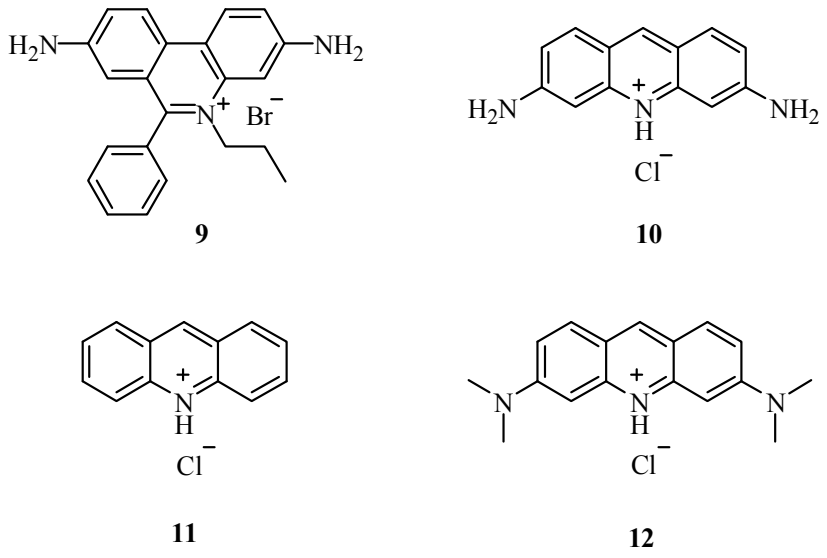
1961 yılında Lerman, klasik interkalasyon modeli için yeni ufuklar açan çalışmalar yapmıştır. Lerman, DNA çözeltisine akridin (**11**), proflavin (**10**) ve akridin orange (**12**) gibi rijit ve aromatik ligantları (Şekil 1.12.) ilave ettiğinde DNA çözeltisinin çökme katsayısında azalma, viskozitesinde ise artma olduğunu gözlemlemiştir. Bu gözlemler sonucunda akridinlerin DNA sarmalında yapısal karışıklık meydana getirdiğini ve bunun interkalasyon mekanizması ile olduğunu önermiştir (Şekil 1.11.) (Lerman 1961). Bununla birlikte, Lerman, akridinlerin düzlemsel yapısının DNA sarmalına dik ve baz çiftlerine paralel bir şekilde etkileştiğini yaptığı diklorizm ve polarizlenmiş flouresans çalışmalarıyla göstermiştir (Lerman 1963). Daha sonra, Neville ve Davies interkalasyon mekanizması ile proflavin-DNA ve akridin orange-DNA komplekslerinin X-ray motiflerini belirtmişler (Neville 1966).



Şekil 1.11. Ligandın DNA ile interkalasyonu

İnterkalasyonda kromofor madde DNA baz çiftleri arasına girerek çift sarmalda yaklaşık 3.4 Å'luk bölgesel açılmalar oluşturur. Bilindiği gibi normal bir DNA'nın B-formunda her 360^{o}'lik dönüş 10 baz çiftinine denk gelir. İnterkalasyon bölgesinde bu dönüşte bir azalma meydana gelir. Bununla birlikte baz çiftleri arasındaki açılma açısı DNA-ligant kompleksinin geometrisine bağlı olarak değişiklik gösterir. Örneğin etidyum bromürün (**9**) fenantradiniyum halkasının baz çiftleri arasına girmesiyle bir baz çiftinin 36^{o} olan açısı 10^{o} düşer, dolayısıyla aralanma açısı 26^{o} olurken, sırasıyla akridin orange ve proflavinin neden olduğu aralanma açısı 17^{o} ve 11^{o}'dir (Wilson 1996). Çift

sarmalın açılmasıyla sonuçlanan bu etkileşimde fosfat grupları arasındaki mesafe artar bölgesel yük yoğunluğu azalır, bu da fosfat gruplarına yakın olan sodyum iyonu gibi zıt yüklerin ayrılmasını kolaylaştırır. Daha sonra hidrofobik etkileşime uygun nonpolar aromatik halka içeren interkalatör, kendisi gibi hidrofobik baz çiftleri arasına gömülür (Boresch 1995). Üstelik katyonik interkalatörler, Manning ve Record tarafından tanımlanan polielektrot teorisi ile ortama fazladan zıt yük salınımı yapar (Manning 1978) (Record 1978). Yeni oluşan kompleks; hidrofobik, van der Walls, π-π etkileşimi, hidrojen bağı ve kolombik itmenin azalmasıyla kararlı hale gelir (Boresch 1995). Üstelik interkalatörlerin sahip oldukları sübstitüentler DNA küçük oluklarında van der Walls etkileşimi ve A-T baz çifti ile hidrojen bağı yaparak, (Actionomycin gibi Şekil 1.6.) bağlanmada selektivite gösterebilirler. Etidyum bromür ve proflavin bilinen ilk interkatörlerdir (Wang 1992, Krugh 1994).

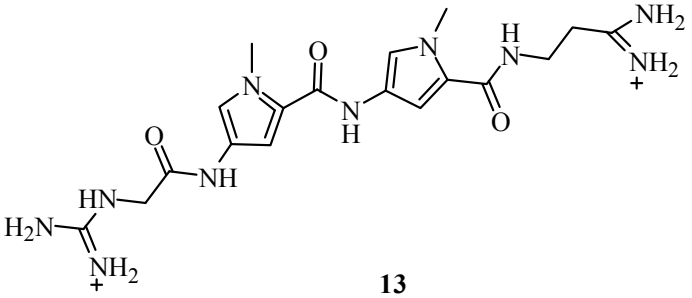


Şekil 1.12. Bazı interkalatör türleri

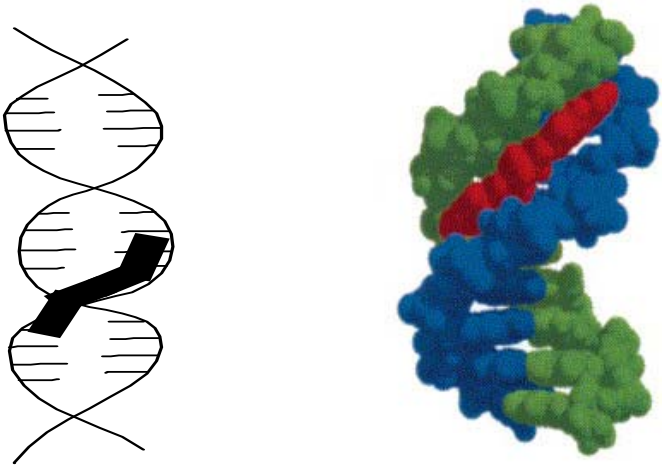
1.3.4. Oluklara Bağlanma

İnterkalatörlerin aksine ligand kayda değer bir sterik engelle karşılaşmadan ve DNA yapısını bozmadan bir hilal şeklini alarak oluklardaki bükülmelere spesifik olarak bağlanır (Şekil 1.13.). Poliamid yapısında bulunan bu ligand oluk duvarı ile van der Waals ve komşu baz çiftleriyle de hidrojen bağı olmak üzere kovalent olmayan etkileşim içerisindedir (Chaires 1997). Bu etkileşimin diğer özelliği de, bir çok baz

çiftlerini kapsayacak şekilde nükleik asitlerle oldukça yüksek selektivite sağlanabilinir olmasıdır (Wilson 1996). Netropsin antibiyotiği DNA oluğunda A-T bölgesine spesifik olarak bağlanan ilk ajandır (Wartell 1974).



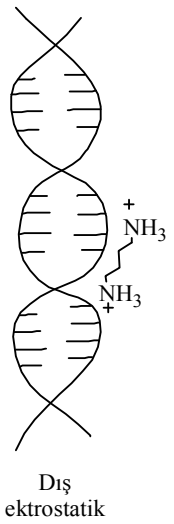
13



Şekil 1.13. Ligandın oluklara bağlanması

1.3.5. Elektrostatik Etkileşim

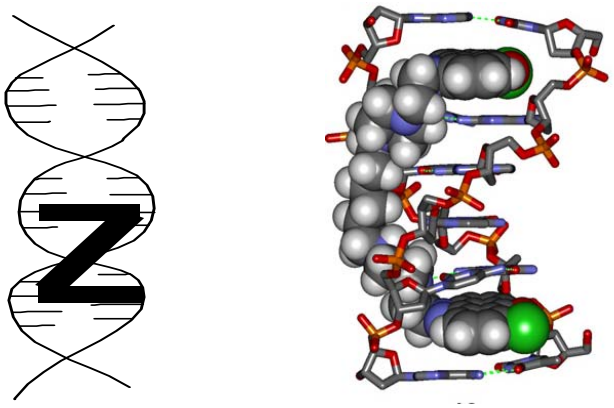
DNA dış yüzeyi boyunca genellikle spesifik olmayan bir etkileşim şeklidir (Şekil 1.14.). Katyonik iyonlar DNA iskeletinde bulunan negatif yüklü fosfat grupları ile etkileşerek entropi artışına neden olurlar. Bu etkileşimin sonucunda DNA fonksiyonu ve yapısı bozulur.



Şekil 1.14. İyonun DNA dış yüzeyi ile elektrostatik etkileşimi

1.3.6. Bis-interkalasyon

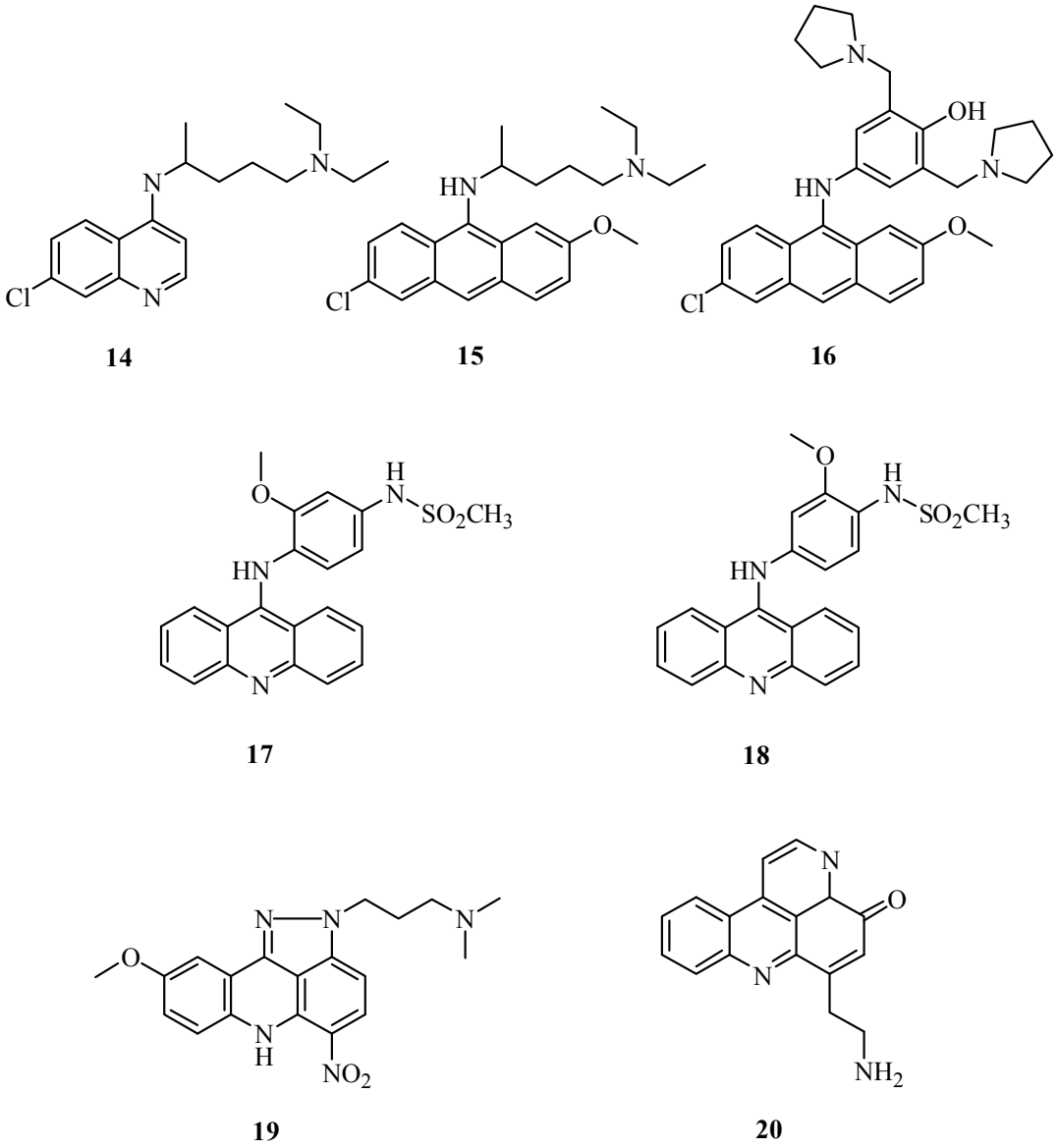
Bis-interkalasyon sisteminde ligand, DNA ile aynı anda farklı iki etkileşim modu ile etkileşir. Oluklara bağlanabilen poliamid zincirinin iki interkalatör halkaya tutturulmasıyla oluşan bir sistemdir (Şekil 1.15). Bis-interkalatif sistemin mono-interkalatif sisteme göre; daha yüksek bağlanma ilgisine sahip olması (Teorik olarak bis-interkalatörün bağlanma katsayısı, monomer interkalatörün bağlanma katsayısının karesi kadar olabilir.), bağlanma ilgisinin artmasının bir fonksiyonu olarak biyolojik aktivitenin artması, bis-interkalatörün bağlanma bölgesinin büyüklüğü baz sıra dizi spesifikliğinin artmasına neden olması ve bağlayıcı zincir, yapısal tasarım için birçok iyileştirme sağlayabilme gibi birkaç avantajı vardır.



Şekil 1.15. Ligandın DNA ile bis-interkalasyonu

1.4. Akridinler

İlk olarak boya amaçlı kullanılan akridinler, 20. yüzyılın başlarından itibaren farmakolojik özellikleri bakımından değerlendirilmiştir. O dönemlerde proflavin antimikrobiyal ve antifungal ajan olarak kullanılmıştır (Albert 1966). 1940'lı yıllardan beri akridinler (chloroquine (**14**), mepacrine (**15**) ve pyronaridine (**16**)) antimalaryal ilaç olarak kullanılmıştır (Greenwood 1995). 1970'lı yıllarda kanser terapisi için özel olarak dizayn edilen akridin kaynaklı terapötik ajanlar geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda 1976 yılında 9-anilinoacridin olarak da bilinen *m*-amsacrine (**17**) anti kanser ilacı klinik olarak kullanılmıştır (Grove 1982). Bu akridin türevi klinik olarak tek başına veya akut lenfositik, nonlenfositik (Van Mouwerik 1987, Jehn 1989) ve ilik kanseri tedavilerinde kullanılan diğer antineoplastik ilaçlarla beraber kullanıldı (Harousseau ve ark 1997) (Brown 1997). Buna karşın *m*-amsacrine katı tümörlerin tedavisinde genellikle etkili değildir (Jelic 1997). Son zamanlardaki akridin türevlerinin (Şekil 1.16.) anti kanser aktivite çalışmaları pyrazoloacridin (**19**) (Denny 2004) ve denizdeki organizmadan izole edilen pyrodoacridin (**20**) alkoloidleri üzerine odaklanmıştır (Demeunynck 2001).



Şekil 1.16. Akridin türevleri

Akridinlerin DNA interkalasyonu ve DNA bağlanma ilgileri sitotoksisite ile ilişkilendirilirken yeni bulgular, interkalatif ajanın DNA-topoizomeraz II kompleksinin tersiyer yapısını bozarak hücresel süreçleri aksattığını ve hatta hücre ölümü ile sonuçlandığını göstermiştir. Ökaryotik DNA topoizomerazları (I ve II) transkripsiyon, rekombinasyon, kromotin ayrılması ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılması gibi topolojik süreçleri içeren enzimlerdir (Wang 1996, Pommier 1993). Özellikle topoizomeraz I enzimi, DNA çift sarmalının bir zincirindeki fosfodiester bağın kırılmasını katalizler ve daha sonra diğer zincirin serbest dönmesine izin vererek

birleşmesine neden olur. Topoizomeraz II enzimi ise DNA sarmalındaki her iki zincirin kırılmasını katalizler. Bu iki enzim tipinin mekanizması ATP üzerinden yürür (Stivers 1997). DNA bağlanma ajanlarının, tersiyer yapılı DNA-enzim kompleksini bozarak hasara neden olduğu düşünülmektedir. Daha sonra bu etkileşimin apoptozisin indüklenmesi ve p53 proteininin aktivasyonu gibi bir dizi olayları tetiklediği bilinmektedir (Martinez 2005).

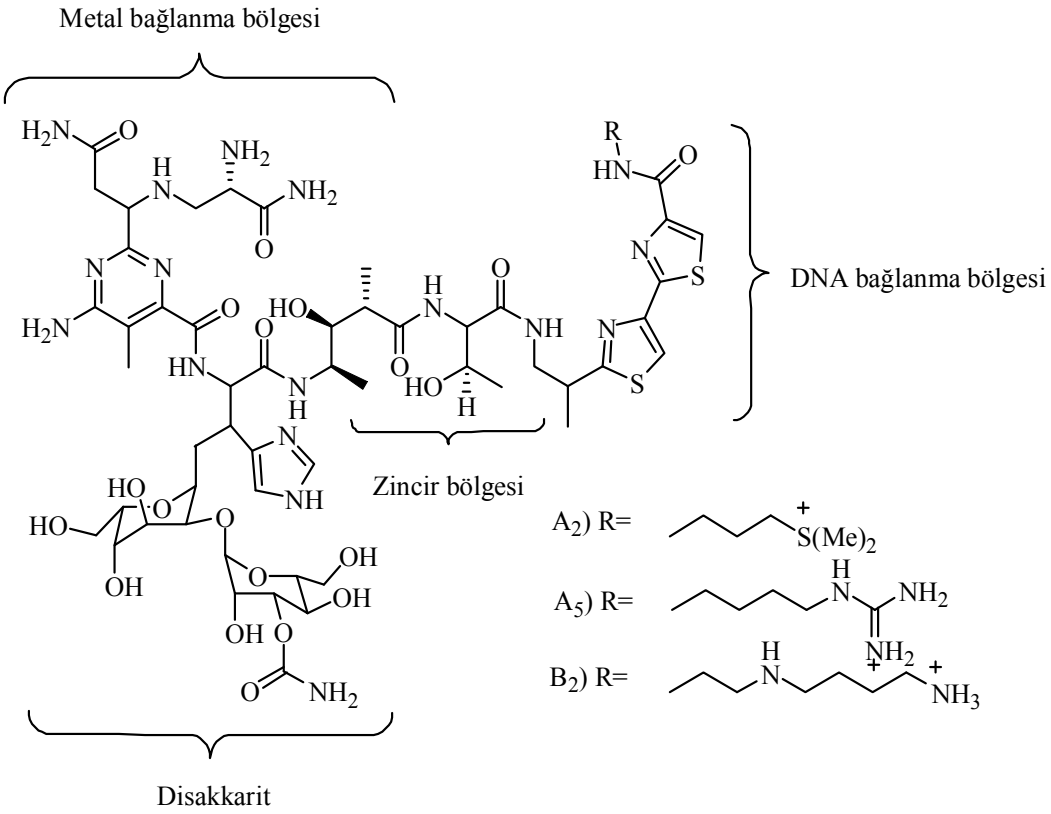
m-Amsacrinin yapısal izomeri olan *o*-amsacrin (**18**) interkalasyon yoluyla DNA ile etkileşir. *o*-Amsacrinin DNA'ya bağlanma afinitesi (K_{obs} = 4.0 x 10^4 M^{-1}) *m*-amsacrine (K_{obs} = 1.6 x 10^4 M^{-1}) göre yaklaşık 4 kat daha fazladır (Wadkins 1991). Buna karşın, *m*-amsacrinin hücre kültüründeki sitotoksisitesi daha yüksek olup DNA bölünmesine neden olurken, *o*-amsacrinde bu söz konusu değildir (Zwelling 1981, Minford 1986). Zwelling ve arkadaşaları *m*-amsacrinin sitotoksisitesiyle ligand, DNA ve topoizomeraz II enziminin üçlü bir oluşum içeresine girdiğini göstermişlerdir (Minford 1986).

1.5. Antitümör Antibiyotikler

1.5.1. Bleomycin

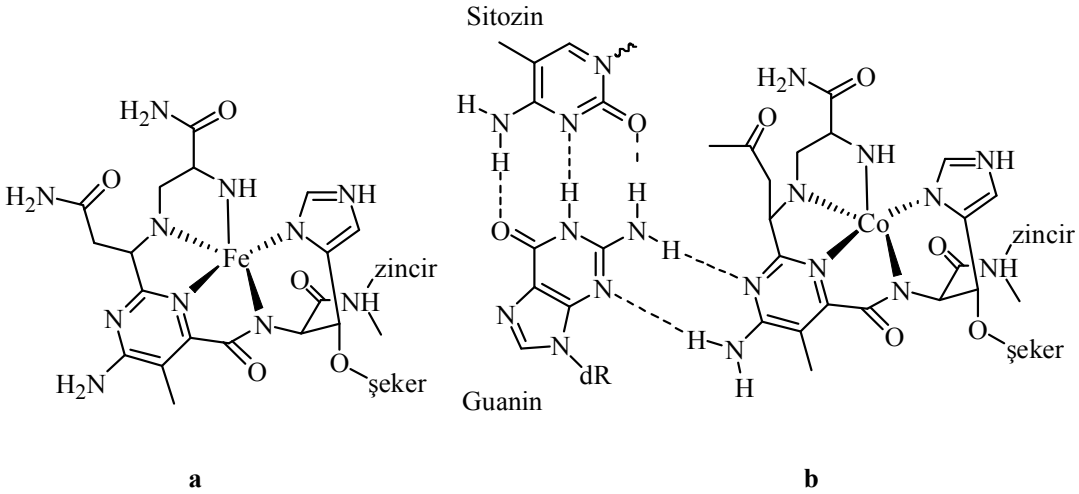
DNA oksidasyonu için en etkili doğal bileşiklerden bir tanesi de antitümör bleomycin (BLM, Şekil 1.17.) antibiyotiğidir. Umezawa ve arkadaşları 1966 yılında BLM'yi *Streptomyces verticillus* bakterisinden bakır ile kompleks şeklinde izole etmişlerdir. Bu antibiyotik özellikle Hodgkin, non-Hodgkin lenfoma, kötü huylu baş ve boyun kanserleri tedavisinde kullanılır (Chen 2005, Umezawa 1978, Galm 2005). Düşük oksidasyon bölgesindeki bir metal iyonu [Fe (II) veya Cu (I) gibi] ve moleküler oksijen (O_2) varlığında DNA sarmalında hem tek hem de çift zincir kırıklarına neden olur. Geniş çaplı araştırmalara rağmen bleomycinin hücre içerisinde aktivite gösterdiği formu tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın, en yüksek aktiviteyi *in vitro* ortamda demir gibi bir metal kofaktör ile gösterdiği belirtilmiştir (Sausville 1978). *In vivo* çalışmalar (terapötik etki ve konsantrasyonlarda), Fe(BLM) kompleksinin toksisitesinin, Cu(BLM), Zn(BLM) ve serbest haldeki bleomycinin toksisitesinden daha az olmasına rağmen, antitümör aktiviteleri aynıdır (Boger 1999).

Bleomycin; metal bağlama, zincir, DNA bağlanma ve karbohidrat bölgesi olmak üzere dört ana bölgeden oluşur (Şekil 1.17.) (Hecht 1986, 2000, Stubbe 1996, Boger 1999, Chen 2004).



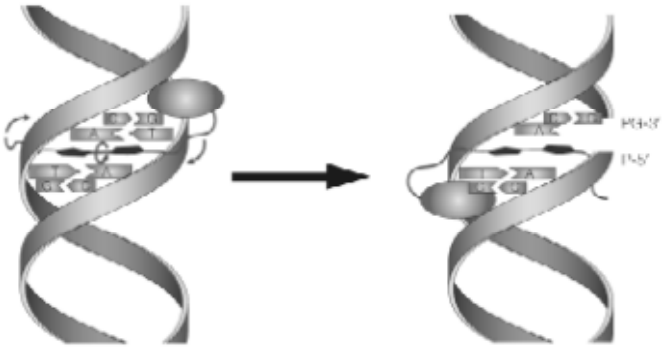
Şekil 1.17. Bleomycin türevleri ve etkin bölgeleri

Fe(BLM) kompleksinin kristal yapısı tam olarak bilinmemektedir. Bleomycinin metal bağlama bölgesi metal iyonunu, imidazol amin, deprotonlanmış amid, pirimidin azotu, sekonder amin ve β-aminoalaninin pirimer amini yardımıyla bağlar (Şekil 1.18a).



Şekil 1.18. BLM' nin demir ve kobalt metali ile kompleksleri

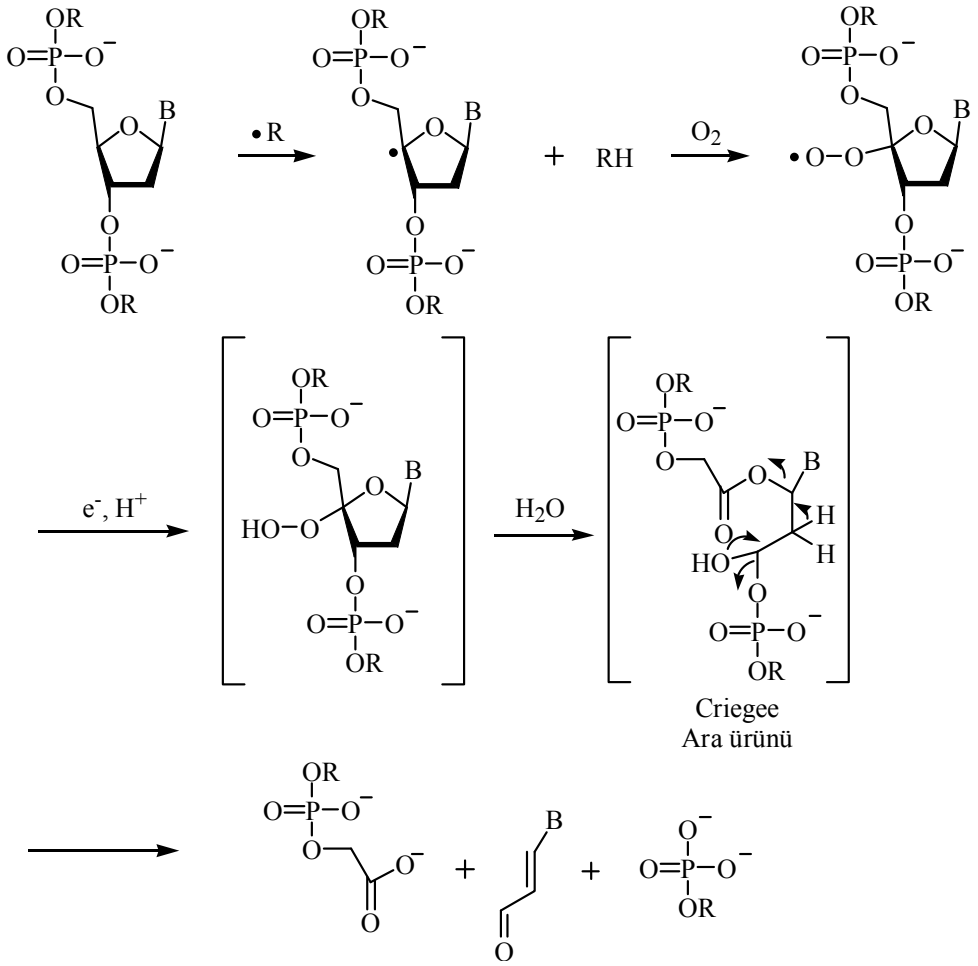
Bleomycin metal kompleksi, Guanin ile pirimidindeki azot ve amin grubu üzerinden etkileşir (Şekil 118b.). Co(BLM) kompleksinin NMR çalışmaları, bu azotlar ile Guanin arasında direkt bir etkileşim olduğunu ve bu etkileşim sırasında Guanin ve Sitozin arasındaki Watson-Crick hidrojen bağlarında herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir (Şekil 1.18b) (Wu 1996a). Pirimidin üzerindeki amino grubu, dimetilamino grubu ile yer değiştirdiğinde kesim süreci tamamıyla dururken, amino grubu ayrıldığında daha az kesimin söz konusu olduğu gözlemlenmiştir (Boger 1999). Tek zincirdeki kesimde bleomycinin selektivitesi 1978'de rapor edilmiş (D'Andrea 1978) ve DNA sarmalındaki 3' pozisyonundaki Guaninden kesim yaptığı belirtilmiştir. Bleomycinin DNA'ya olan ilgisi bistiyazol ünitesinin interkalasyon ve küçük oluklara bağlanmasından kaynaklanır (Wu 1994, Povirk 1979). Zincir bağlama bölgesinin de çift sarmal kesimdeki etkisi önemlidir. Öyle ki bu zincir bölgesindeki en ufak bir değişiklik kesim kapasitesini dramatik bir şekilde azaltır (Hecht 1986, Stubbe 1996, Boger 1999, Rishel 2003). Stubbe ve arkadaşları, bistiyazol ünitesi ve zincir ünitesi ile 3' pozisyonundan tek zinciri kestikten sonra halka çevrilme mekanizması ile 180^{o} dönerek diğer zincire geçip 3' pozisyonunda kestiğini göstermişlerdir (Şekil 1.19.) (Wu 1994, 1996a,b, Chen 2004, 2005). Bleomycinin karbohidrat bölgesindeki α-L-glikoz ve α-D-mannoz ise bleomycinin bazı kanser hücrelerinde birikmesinden sorumlu olabilirler fakat DNA kesiminde rol almazlar.



Şekil 1.19. BLM'nin DNA kesim mekanizması

1.5.1.1. Fe^{II}(BLM) Kompleksinin DNA Kesim Mekanizması

Fe^{II}(BLM) kompleksi aerobik ortamda moleküler oksijen yardımıyla deoksiriboz şekerin C4' pozisyonundaki hidrojeni koparark kesimi 3' pozisyonunda yapar.



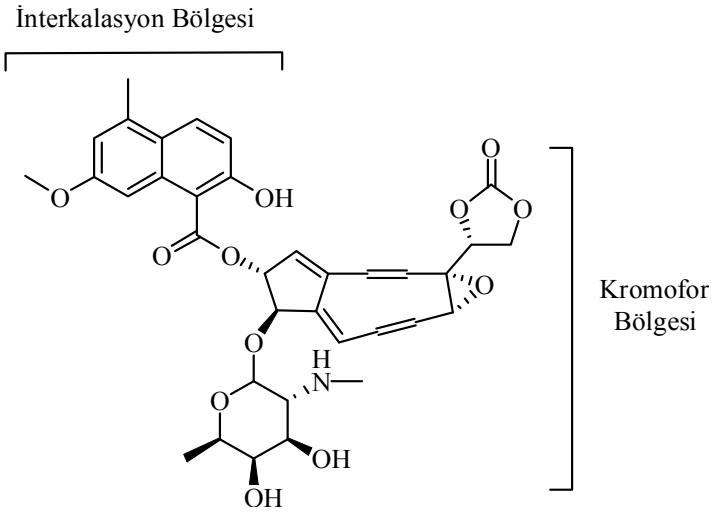
Şekil 1.20. Fe^{II}(BLM) kompleksinin DNA'yı kesme mekanizması

1.5.2. Enediyen Antibiyotikleri

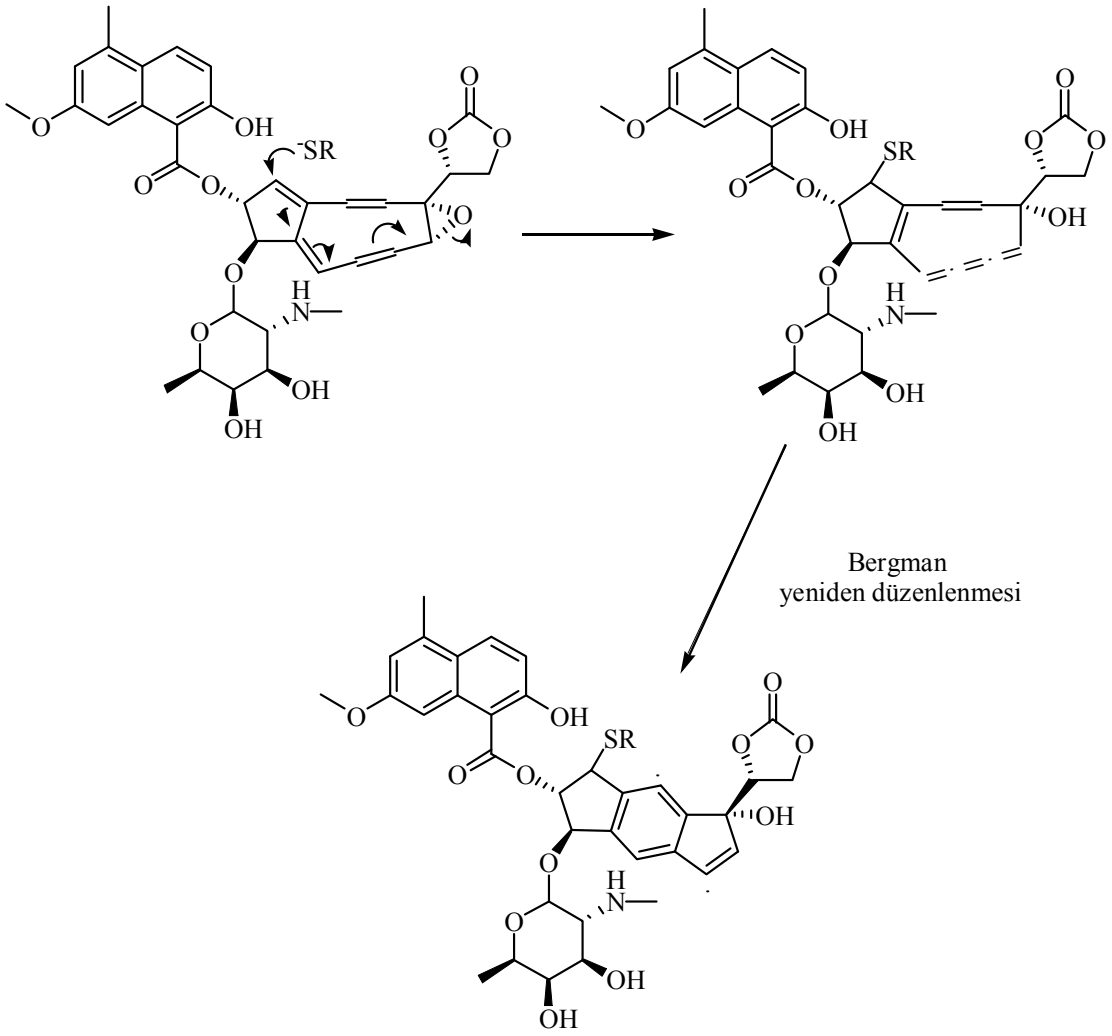
1965 yılında izole edilen neocarzinostatin (Ishida 1965) dışındaki esperamicin (Konishi ve ark. 1985), calicheamisin (Lee 1987), ve dynemicin A gibi enediyen antibiyotikler (Konishi 1989) 1980'lerin sonlarına doğru çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmişlerdir. Yaygın yapısal özelliği bir makrosiklik halkada en az bir çift bağ ve iki üçlü bağ bulundurmasıdır. Bu özelliğinden dolayı enediyen antitümör antibiyotikleri olarak anılırlar. Bu tür bileşiklerin tamamı DNA ile iki farklı şekilde etkşileşirler. Antibiyotiklerin bir kısmı DNA küçük oluklarında interkalasyon yaparken diğer bir kısmı ise tiyol ya da NADPH gruplarıyla aktive edilerek DNA zincirini kesen radikalleri oluştururlar.

1.5.2.1. Neocarzinostatin

1965 yılında *Sterptomyces carzinostaticus*'tan izole edilmiştir (Ishida 1965) Zinostatin olarak da bilinen neocarzinostatin, en eski enediyen antibiyotiğidir (Myers 1987). Naftoat ester bölgesi DNA'da interkalasyon yaparken (Şekil 1.21.) epoxybicylo[7.3.0]dodecadiendiyne bölgesi ise DNA küçük oluklarında kromofor olarak davranır. Tiyol tarafından aktive edilerek Bergman, yeniden düzenlenmesiyle diradikal oluşturur (Şekil 1.22.) (Lockhart 1981, Myers 1994). Oksijen varlığında deoksiribozun C4' ve C5' pozisyonundaki hidrojenleri koparak iki farklı mekanizma ile DNA kesimi gerçekleştirir (Şekil 1.25.).



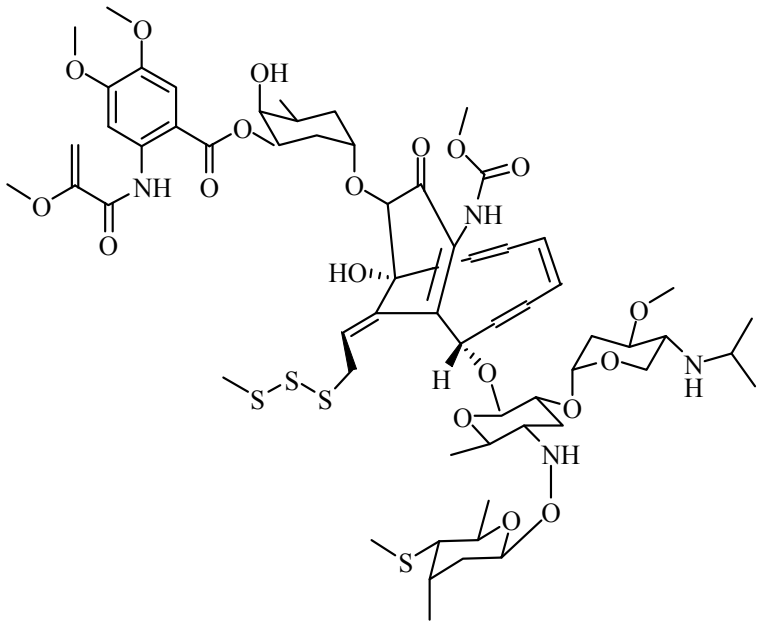
Şekil 1.21. Neocarzinostatin'in yapısı



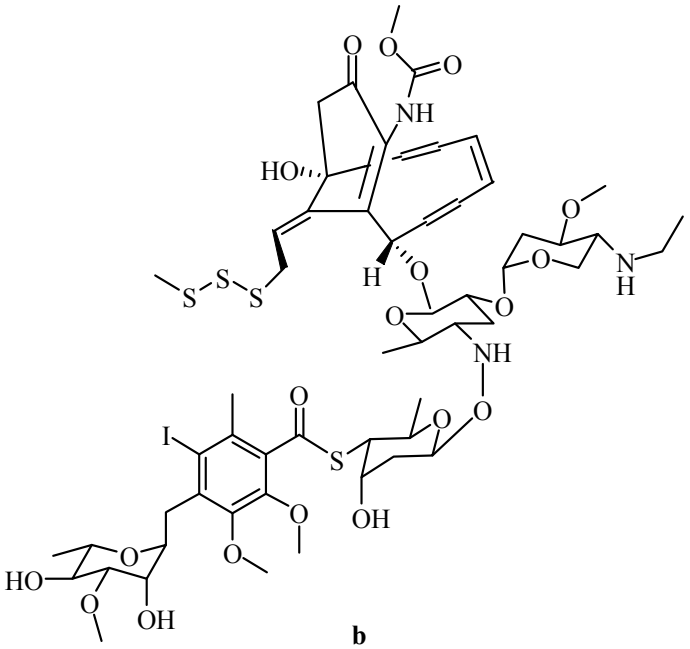
Şekil 1.22. Neocarzinostatin'in O_2 ile aktivasyonu

1.5.2.2. Esperamicin ve Calicheamicin

Esperamicin (Şekil 1.23a.) ve calicheamisin (Şekil 1.23b.) antitümör antibiyotikleridirler. 1987 yılında Esperamicin *Actinomadura verrucosospora*, calicheamicin ise *Micromonospora echinospora* ssp. calichensis toprak örneklerinden izole edilmişlerdir (Lee 1987, Golik 1987, Pryor 1988). Neocarzinostatin gibi diradikal oluşturarak DNA kesimine sebep olurlar.



a

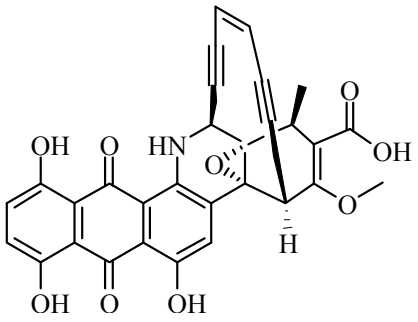


b

Şekil 1.23. Esperamicin ve Calicheamicin antibiyotiklerinin yapıları

1.5.2.3. Dynemicin A

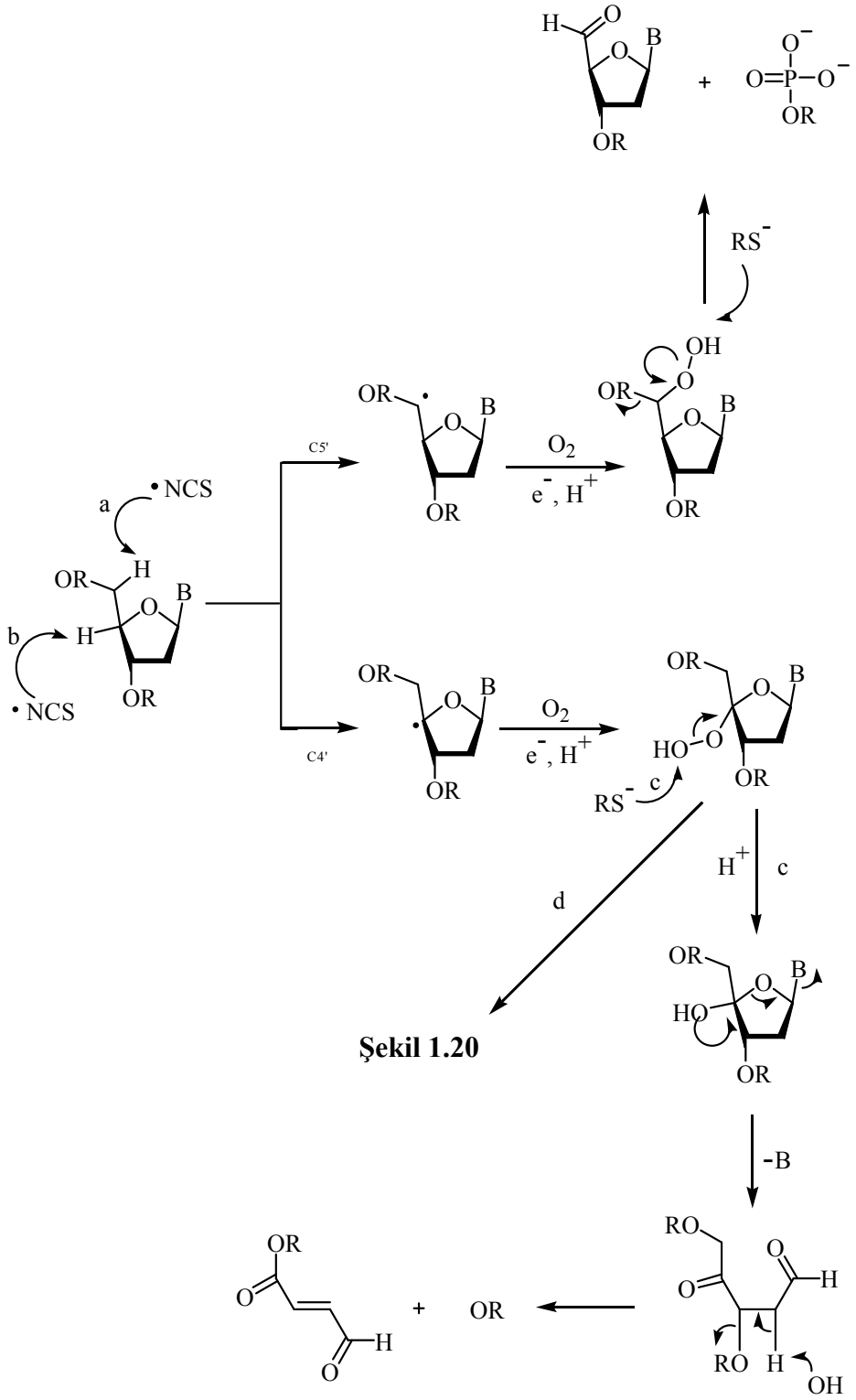
1989 yılında *Micromonospora chersina* bakterisinden izole edilen dynemicin A antibiyotiği (Şekil 1.24) hem enediyen hem de antracycline antitümör özellikli bir yapıdadır (Konishi ve ark. 1989). Yapısındaki antraquinonun DNA küçük oluklarındaki baz çiftleri arasına girerek interkalasyona sebep olduğu tahmin edilmektedir. Daha sonra NADPH ve tiyol yardımıyla neocarzinostatin (Şekil 1.22.) ve diğer antibiyotikler gibi diradikal oluşturarak DNA deosiriboz şekerinden hidrojen atomu koparark DNA kesimine neden olur.



Şekil 1.24. Dynemicin A antibiyotiğinin yapısı

1.5.3. Antibiyotiklerin DNA Kesimindeki Spesifikliği

Esperamicin için öncelikli kesim bölgesi Timin (T>C>A>G), calicheamicin (C>>T>A=G) için Sitozin, neocarzinostatin (T>A>C>G) için Timin ve bleomycin (C>T>A>G) için Sitozin bazı iken dynemicin A için Guanin bazıdır.

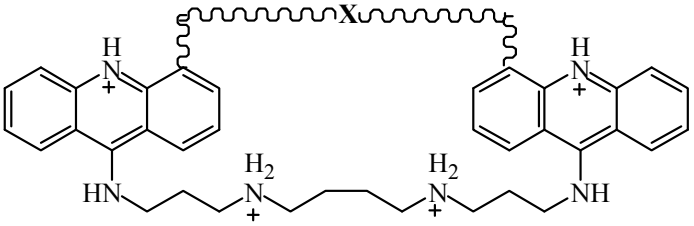


Şekil 1.20

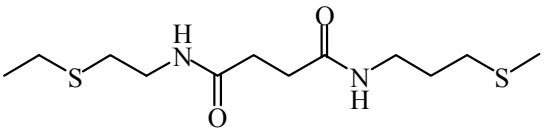
Şekil 1.25. Antibiyotiklerin DNA'yı kesme mekanizmaları

2. KAYNAK ÖZETLERİ

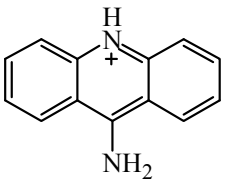
Zimmerman ve arkadaşları (1989), suda çözünürlüğü iyi olan makrosiklik yapılı bis-akridin (**21**) molekülünü, spermin bis-akridin (**22**) molekülünü ve mono-interkalatör olan 9-aminoakridin molekülünü sentezleyip DNA'ya olan ilgilerini UV-visible ve termal denaturasyon çalışmaları ile araştırmışlar. Sonuç olarak DNA bağlanma ilgilerinin sırasıyla **21>22>23** olduğunu tespit etmişler.



21 X:

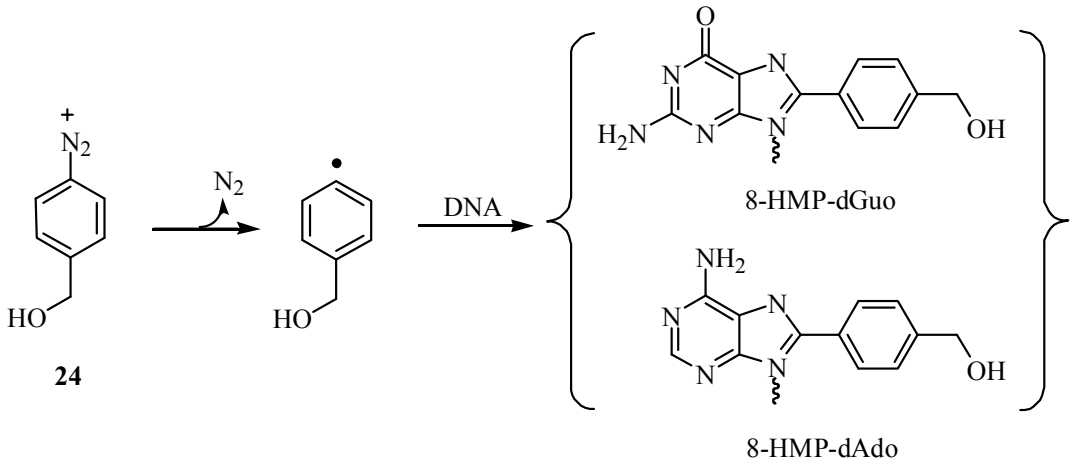


22 X: H, H

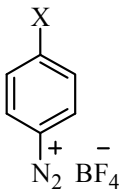


23

Kazuyuki ve arkadaşları (1994) yenilebilen mantarda (*Agaricus bisporus*) bulunan 4-(hidroksimetil)benzendiazonyum (**24**) tuzunun (HMBD) oluşturduğu karbon merkezli radikalin, DNA bazları ve deoksiriboz şekeriyle modifikasyonunu çalışmışlar. HMBD tuzunun DNA yapısında bulunan bazlar ile N-8 pozisyonundan bağlanarak 8-[4-(hidroksimetil)fenil]dGuo (8-HMP-dGuo) ve 8-[4-(hidroksimetil)fenil]dAdo (8-HMP-dAdo), deoksiriboz şekeri ile de malondialdehit oluşturduğu rapor edilmiştir.

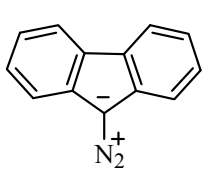


Reszka ve arkadaşları (1995), bazı fizyolojik elektron vericileri veya onların basit model molekülleri (askorbat, NADH, katekol, *p*-hidrokinon ve ferrosiyanid gibi) varlığında *para*-sübstitüe aromatik diazonyum bileşiklerinden (**25a-e**) bir elektron indirgenmesi sonucu oluşan aril radikallerini ESR spektroskopisinde tespit etmişler. Bunun sonucunda sulu çözeltilerde diazonyum tuzunun bir elektron donör varlığında aril radikali üretmek için iyi bir model olduğu görüşüne varmışlar.

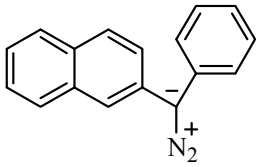


25 a) X= MeO
b) X= Cl
c) X= Br
d) X= NO_2
e) X= $N(Et)_2$

Dev P. Arya ve arkadaşları (1995a), 9-Diazoflouren (**26**) ve prekinamycin molekülünün mimiği olan β-naftil fenil diazometan (**27**) bileşiklerinin $Cu(OAc)_2$ varlığında DNA kesimini elektroforez tekniği ile çalışmışlar. Elde edilen veriler her iki molekülün de DNA'yı kestiğini göstermiştir. Ancak deney karanlıkta yapıldığı için kesimin hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği kesin olarak belirtilmemiştir.

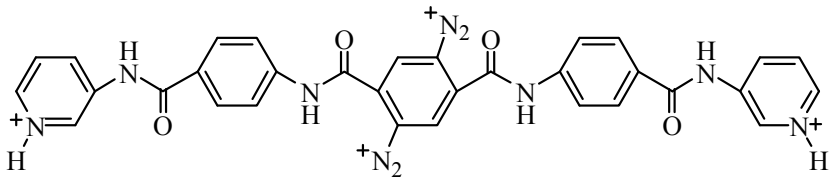


26



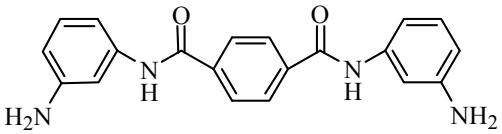
27

Dev P. Arya ve arkadaşları (1995b), sentezledikleri 1,4-bisdiazonyum (**28**) molekülünün, bakır klorür varlığında 1,4-diradikalleri oluşturarak, enediyen antibiyotikleri gibi DNA'yı kestiğini göstermişlerdir.

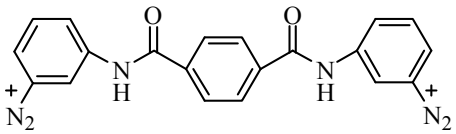


28

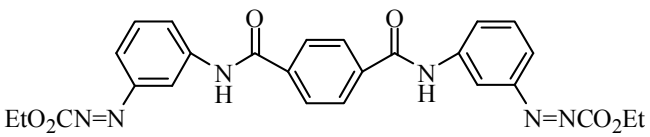
Jebaratnam ve arkadaşları (1995), Adenin ve Timin baz çiftlerine spesifik olarak bağlanabilen aril diamin (**29**) bileşiğini sentezleyip bu bileşiği öncü kabul ederek DNA kesimini gerçekleştiren bis-diazonyum (**30**), bis-azoester (**31**) ve DNA'ya çapraz bağlanabilen bis-azid (**32**) bileşiklerini sentezleyip, DNA jel elektroforezi tekniği ve UV-visible absorbans tekniğini kullanarak (**32)** bileşiğinin DNA çift sarmalını diğer iki bileşikten daha etkili kestiğini tespit etmişler.



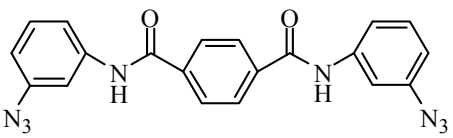
29



30

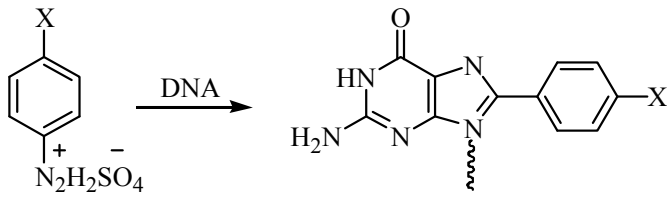


31



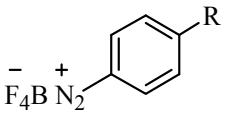
32

Gannet ve arkadaşları (1996), sentezledikleri *p*-X-ArN_2^+ (**33a-c**) tuzlarını bir elektron donör varlığında ctDNA veya hücrelerle etkileştirmişler. ESR ve HPLC ile elde ettikleri bulgular ışığında, *p*-X-ArN_2^+ tuzlarının radikalik olarak guaninin C-8 pozisyonuna bağlandıklarını tespit etmişlerdir.



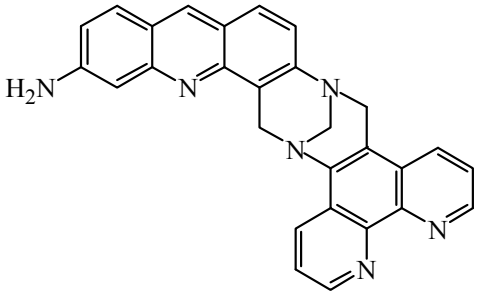
33 a) X= CH_3
b) X= CH_2OCH_3
c) X= CH_2OH

Kızıl ve arkadaşları (2003) benzendiazonyum tetrafloroborat (**34a-c**) tuzlarını sentezleyip DNA kesimini incelemişler. Elde edilen sonuçlar, farklı diazonyum tuzlarının bir elektron donör varlığında DNA'yı kestiğini göstermiştir. Kesim etkisi incelenen sübstitüe diazonyum tuzlarının radikal aktiviteleri ve DNA kesim etkileri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmediğini rapor etmişlerdir.



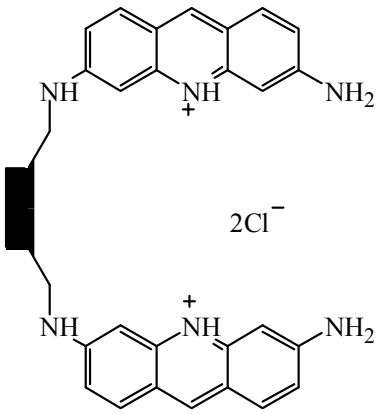
34 a) R = H
b) R = OH
c) R = CO_2H

Baldeyrou ve arkadaşları (2002), proflavin ve fenantrolinden oluşan asimetrik Tröger bazını (**35**) sentezleyerek, DNA'ya bağlanma ilgisini çalışmışlar. Yapılan biyofizik ve biyokimyasal deneylerle bu molekülün proflavin kısmının DNA baz çiftleri arasına girerek interkalasyona neden olduğu ve fenantrolinin de DNA'nın küçük oluklarına bağlanıp DNA kesimine neden olduğu tespit edilmiştir.

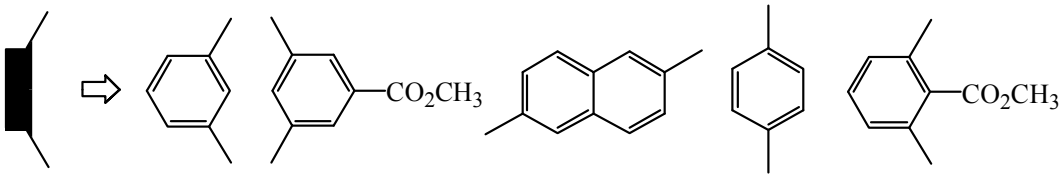


35

Lorente ve arkadaşları (2004), farklı rijit aromatik zinciri (**36a-e**) içeren bis-akridin türevlerini sentezleyerek DNA ile etkileşimlerini ve antitümör aktivitelerini incelemişlerdir. UV-visible absorbans tekniği ile bu moleküllerin zayıf DNA ilgisine sahip oldukları tespit edilmiştir. *İn vitro* çalışmalar **36a** molekülünün antitümör aktivitesinin **36b**-**e** moleküllerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

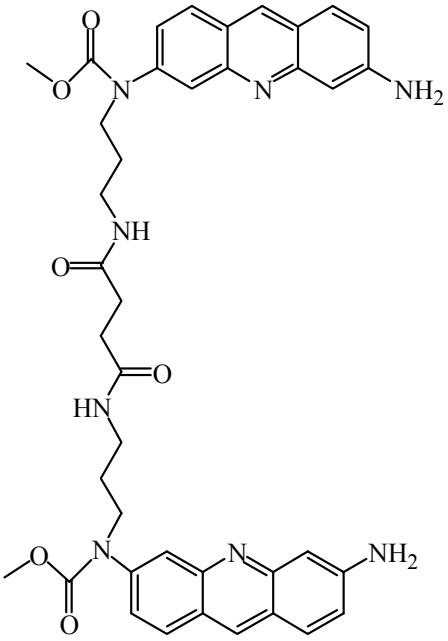


36



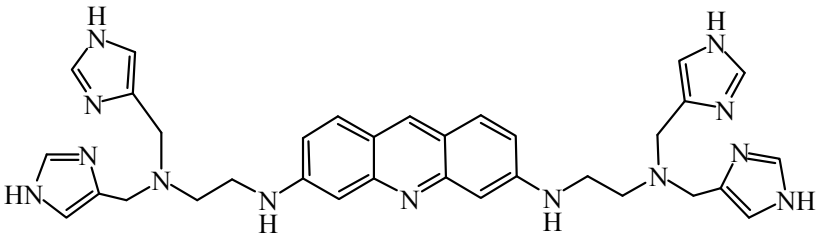
a **b** **c** **d** **e**

Espinosa ve arkadaşları (2004) tarafından süksinamit zinciri içeren bis-proflavin (**37**) molekülü sentezlenip, DNA'ya ilgisi ve Eu^{3+} varlığında DNA kesimi üzerine etkisi fotokimyasal olarak incelenmiştir. UV-visible ve viskozimetrik parametreler molekülün DNA ilgisinin yüksek olduğunu göstermiştir. DNA jel elektroforezi çalışmaları ışıkta, Eu^{3+} varlığında DNA kesiminin arttığını göstermiştir.

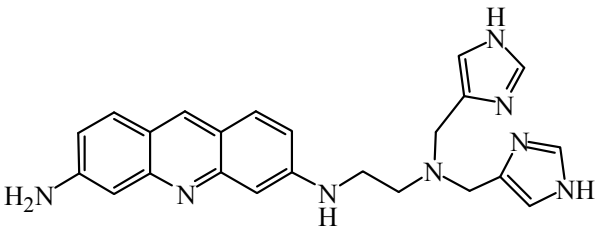


37

Wilson ve arkadaşları, akridine konjuge imidazol halkası içeren bileşikler (**38-39**) sentezlemişler. Sentezledikleri bileşiklerin Hg(II), Fe(III), Cd(II), Zn(II), V(V), ve Pb(II) gibi metallerle kompleksini oluşturarak ayarlanabilir fotokesim yapmışlar. Yapılan deneyler sonucu **38** molekülünün DNA'ya daha iyi bağlandığını ve metal kompleksleriyle fotokesimin arttığını tespit etmişlerdir.

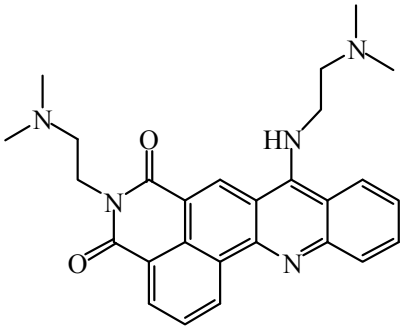


38

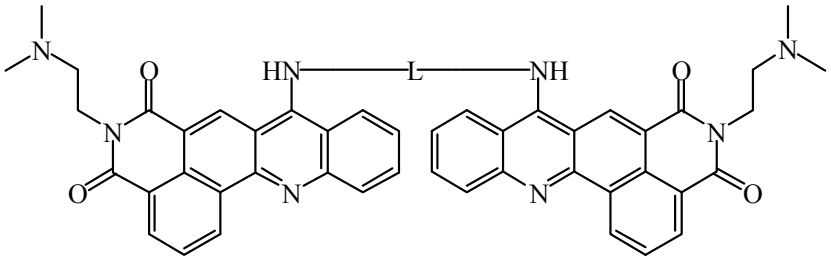


39

Yang ve arkadaşları (2005), yüksek DNA ilgisine ve antitümör aktivitesine sahip olan mono ve bis-isokinolin[4,5-*bc*]akridin (**40a-f**) türevlerini sentezlemişler. UV-visible ve termal denatürasyon çalışmaları ile, sentezlenen bileşiklerin beklenenden daha fazla DNA ilgisine sahip olduğu tespit edilmiştir.



a



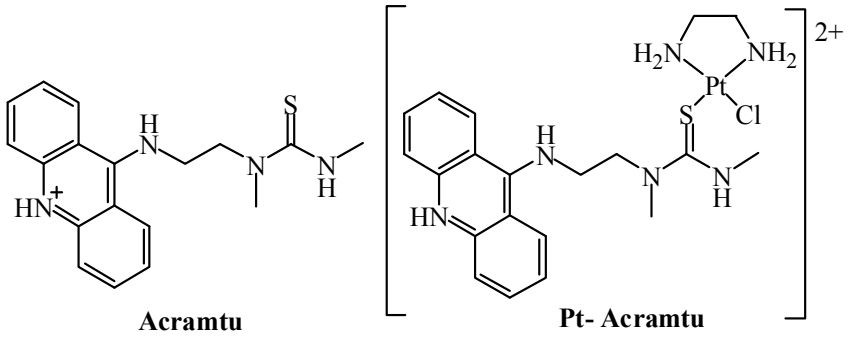
b) L= $(CH_2)_2NH(CH_2)_2$ **e)** L= $(CH_2)_2NH(CH_2)_3NH(CH_2)_2$

c) L= $(CH_2)_3NH(CH_2)_3$ **f)** L= $(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH(CH_2)_2$

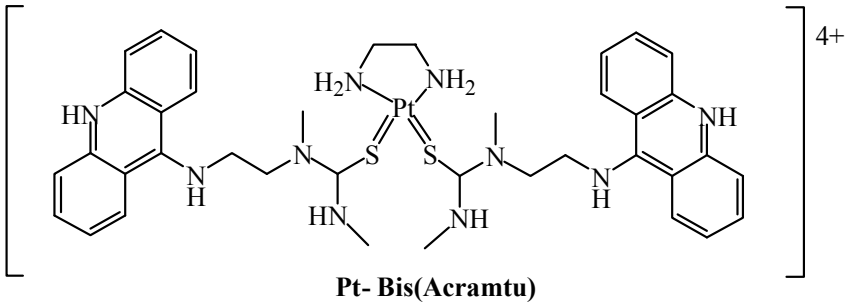
d) L= $(CH_2)_2NCH_3(CH_2)_2$

40

Choudhury ve arkadaşları (2005), daha önce sentezledikleri Acramtu, Pt-Acrantu ve Pt-bis(Acramtu) moleküllerinin DNA'ya bağlanma modunu çeşitli biyofizik teknikler kullanarak karakterize etmişler. Elde edilen parametreler, akridin molekülünün DNA baz çiftlerinin (**A, T**) arasına girerek bis-interkalatör olarak davrandığını ve platin metali ile oluşturduğu kompleksin de DNA zincirindeki küçük oluklara bağlandığını göstermiştir.

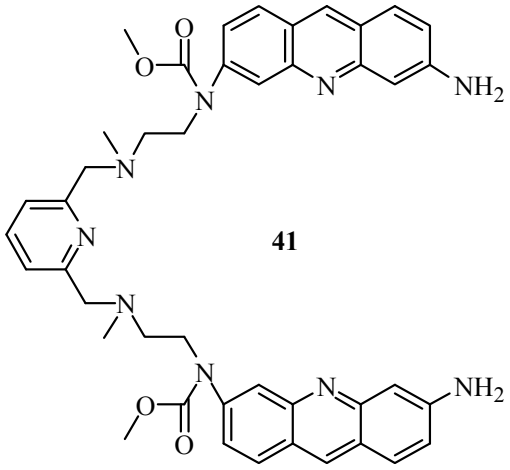


Acramtu **Pt- Acramtu**



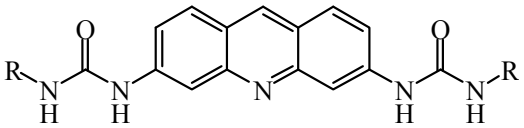
Pt- Bis(Acramtu)

Fernandez ve arkadaşları (2007), piridin halkası içeren bis-akridin (**41**) molekülünü sentezleyerek Cu(II) varlığında DNA kesimi üzerindeki etkisini fotokimyasal olarak incelemişler. Yapılan çalışmalar, molekülün DNA ilgisinin yüksek olduğu ve DNA kesimi gerçekleştiğini göstermiştir.



41

Kozurkova ve arkadaşları (2008), proflavine sübsititüe olmuş bis-alkilüre türevlerini (**42a-e**) sentezlemişler. Daha sonra sentezledikleri moleküllerin MTT (Microculture Tetrazolium Salt) deneyi ile sitotoksisitesini ölçüp, DNA'ya bağalanma ilgilerini ve bağlanma sabitlerini (***K***) spektroskopik tekniklerle araştırmışlar. MTT assay çalışmalarında, **c, d** ve **e** moleküllerinin daha etkili olduğunu tespit etmişler ve bağlanma sabitlerini **a > b > c > d > e** sıralaması ile tanımlamışlar.



42

a) R= etil

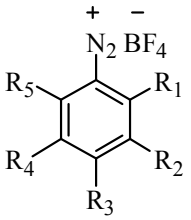
b) R= *n*- propil

c) R= *n*- bütil

d) R= *n*- pentil

e) R= *n*- hekzil

Çeken ve Kızıl (2008) tarafından, farklı sübstitüe aril radikallerinin (**43a-i**) radikal reaktivitesi ve DNA kesimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Farklı sübstitüe diazonyum tuzlarının inorganik bir elektron donör (CuCl) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA'yı kestiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak DNA kesiminin sübstitüe gruba bağlı olarak kısmen değiştiği ve bazı diazonyum tuzlarında DNA kesiminin elektron donör olmadan da gerçekleştiği belirlenmiştir. Kesim mekanizmasının aril radikalinin DNA'nın deoksiriboz şekerinden bir hidrojen atomu koparak geçekleştiği öngörülmektedir.



43

a) R_1= CH_2CH_3
R_2=R_3=R_4=R_5 = H

b) R_1= R_2= CH_3
R_3=R_4=R_5= H

c) R_1=R_5= CH_3
R_2=R_3=R_4= H

d) R_1=R_5= CH_2CH_3
R_2=R_3=R_4= H

e) R_2= CH_2CH_3
R_1=R_3=R_4=R_5 = H

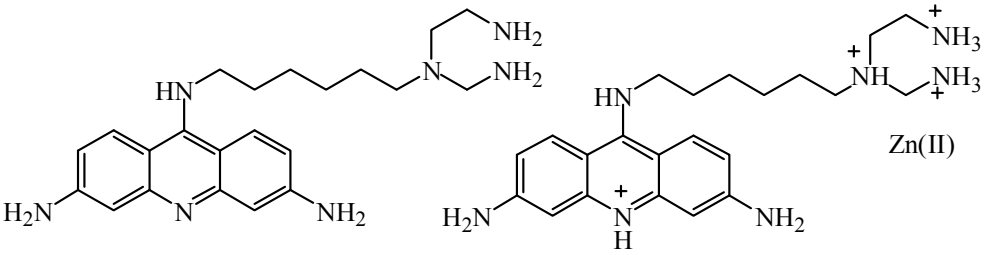
f) R_3= CH_2CH_3
R_1=R_2=R_4=R_5 = H

g) R_1= Cl
R_3= NO_2
R_2=R_4=R_5 = H

h) R_1= NO_2
R_3= Cl
R_2=R_4=R_5 = H

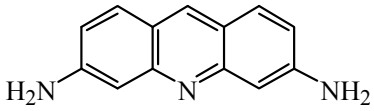
i) R_3= CH_2OH
R_1=R_2=R_4=R_5 = H

Bazzicalupi ve arkadaşları (2008), proflavine bağlı dietilentriamin molekülünü sentezleyip Zn(II) iyonu ile şelat oluşturup bir metalointerkalatör dizayn etmişler (**44**), (**45**). Daha sonra spektrofotometrik analizlerle DNA ilgilerini karşılaştırıp, DNA kesim çalışmaları yapmışlar. Yapılan analizler sonucunda her iki molekülün aynı şekilde **G-C** baz çifti arasına girip interkalasyona neden olduğunu tespit edip, Zn(II) iyonu ile oluşturulan kompleksin dört kat daha fazla kesim yaptığını gözlemlemişler.



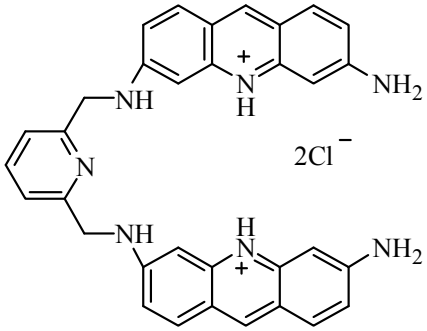
44 **45**

Ruiz ve arkadaşları (2009), proflavinin (**46**) DNA interkalasyonunda **A-T** ve **G-C** baz çiftlerinden hangisiyle daha çok etkileştiğini bilgisayarlı hesaplama ile çalışmışlar. Elde edilen verilerin proflavinin **A-T** baz çifti ile daha iyi bir etkileşim içerisinde olduğunu tespit etmişler. Ayrıca çözücünün proflavin-DNA kompleksini kararlı kılıp enerjisini düşürdüğünü saptamışlar.

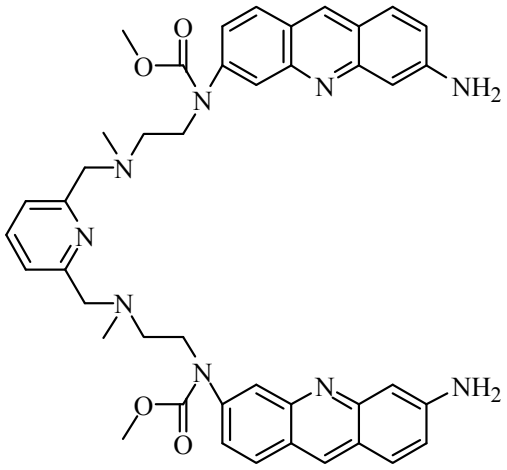


46

Grant ve arkadaşları (2011), Cu(II) varlığında, bis-akridine bir piridin halkasının bağlanmasıyla sentezledikleri molekülün (**47**) fotokesimi ile grubun daha önce sentezledikleri molekülün (**41**) fotokesimini karşılaştırmışlar. Elde ettikleri UV-visible absorbans değerleri, termal denatürasyon verileri ve DNA elektroforez çalışmaları ile sentezlenen kompleksin Cu(II) varlığında çok daha fazla fotokesim yaptığını saptamışlar.



47



41

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

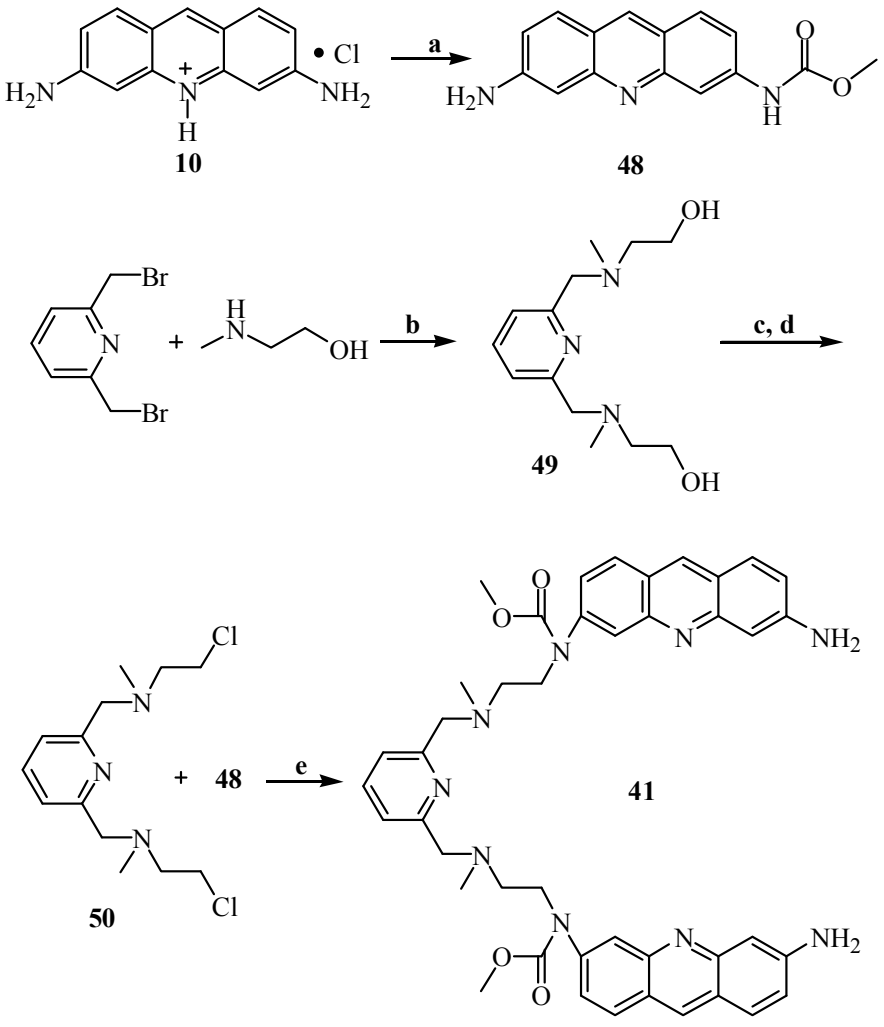
Metil kloroformat (Sigma aldrich), Aseton (Sigma aldrich), Potasyum karbonat (Sigma aldrich), 3,6-Diaminoakridin (Proflavin) hidroklorür (Sigma aldrich), Sodyum bikarbonat (Sigma aldrich), Sodyum metoksi (Sigma aldrich), Metanol (Sigma aldrich), Tiyonil klorür (Merck), 2,6-Bis(bromometil)piridin (Sigma aldrich), 2-(metilamino)etanol (Sigma aldrich), Sodyum karbonat (Sigma aldrich), Potasyum iyodür (Sigma aldrich), Kloroform (Sigma aldrich), Magnezyum sülfat (Sigma aldrich), Diklorometan (Sigma aldrich), N,N-Dimetilformamid (Merck), Sodyum hidrür (% 60) (Sigma aldrich), Di-*tert*-bütil dikarbonat (Sigma aldrich), Etil asetat (Sigma aldrich), Trietilamin (Sigma aldrich), Hekzan (Sigma aldrich), Agaroz (Sigma), Hidrojen peroksit (Sigma), Etilendiamintetraasetikasit (Sigma), Trizma Baz (Sigma), Asetik asit (Sigma), Jel yükleme boyası (Sigma), Dietileter (Sigma aldrich), Dimetilsülfoksit-D_6 (Merck), Aseton-D_6 (Merck), Kloroform-D_1 (Merck), Metanol-D_3 (Merck) kimyasalları kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Aletler

^{1}H NMR (Bruker 400 MHz), ^{13}C NMR (Bruker 100 MHz), Yatay DNA Elektroforez (Biorad), Güç Kaynağı (Biorad-power PAC 3000), Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), Sterilizatör (Heraus), Laminar flov (Kendro-Hera KS12), Çalkalayıcı Orbital İnkübatör (Zehrincberg zhwy-200b), -20 Derin Dondurucu (Sanyo), Santrifüj (Universal 320 R, Hettich), pH metre (Mettler-toledo), Otoklav (Hiramaya-HV-502), Çeker Ocak, Evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), terazi (Mettler Toledo) ve buzdolabı (Arçelik) cihazları kullanılmıştır.

3.3. Sentez Çalışmaları

3.3.1. 2,6-bis{[(6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)etil]metilamino metil}piridin (41)

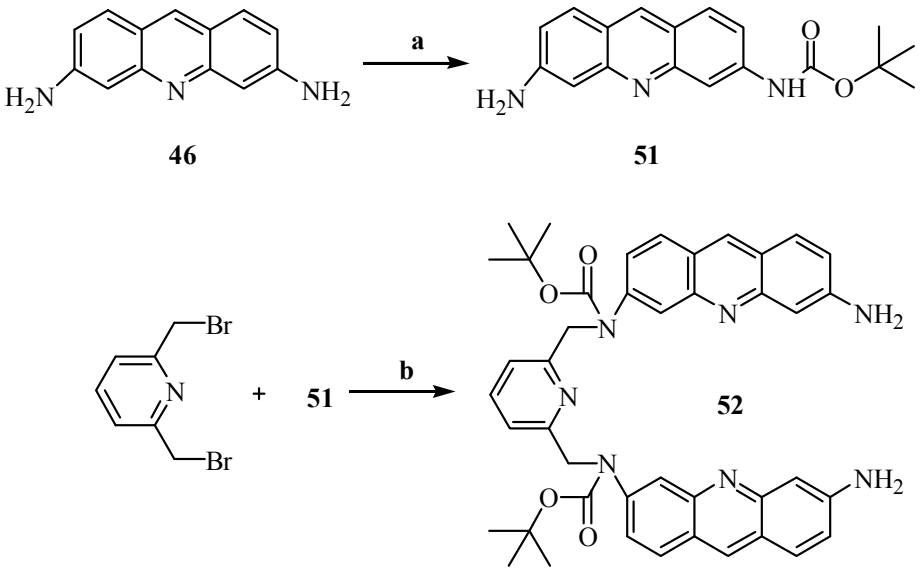


Kullanılan kimyasallar ve sentez koşulları; **a.** 3,6-diaminoacridine, metil kloroformat, kuru aseton,72 saat refluks **b.** 2,6-bis-(bromometil)piridin, 2-(metilamino)etanol, sodyum karbonat (Na_2CO_3), potasyum iyodür (KI) etanol 15 saat refluks **c.** Tiyonil klorür ($SOCl_2$) oda sıcaklığı, 24 saat **d.** Sodyum karbonat (Na_2CO_3), metanol, 3 saat refluks **e.** Dimetilformamid (DMF, susuz), Sodyum hidrür (NaH, % 60) 50 ^oC, 20 saat refluks.

Şekil 3.1. 41 nolu ligandın sentez şeması

41 molekülünün sentezi (Şekil 3.1.), proflavin (**10**) molekününün serbest aminlerinden bir tanesi metil kloroformat ile kuru aseton ortamında korunarak **48** bileşiği elde edildi. Zincir uzatma işlemi için 2,6-bis-(bromometil)piridin ile 2-(metilamino)etanol'ün etanol içindeki reaksiyonu gerçekleştirilerek alkol (**49)** elde edildi. Daha sonra **49** tiyonil klorür ile klorlanarak **50** molekülü elde edildi. Bu işlemlerden sonra bir tarafı korunmuş proflavin (**48**) ile **49** molekülünün, % 60'lık sodyum hidrür (NaH) varlığındaki reakasiyonu sonucu bis-akridin (**41**) molekülü sentezlendi.

3.3.2. [2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *ter*-bütil ester (52)



Kullanılan kimyasallar ve sentez koşulları; **a.** Proflavin, di-tert-bütil-dikarbamat kuru aseton, 8 saat refluks **b.** 2,6-bis-(bromometil)piridin, Dimetilformamid (DMF, susuz), Sodyum hidrür (NaH, % 60) 3 saat refluks.

Şekil 3.2. 52 nolu ligandın sentez şeması

52 bileşiğinin sentezi (Şekil 3.2.) için tuz halinde bulunan proflavin (**10**) nötralleştirildi (**46**). Sonra proflavinin (**46**) serbest haldeki aminlerden bir tanesi kuru aseton içinde di-tert-bütil-dikarbamat ile korundu (**51**). Bir tarafı korunmuş proflavin (**51**) ile 2,6-bis-(bromometil)piridin'in % 60'lık sodyum hidrür (NaH) varlığındaki reaksiyonu ile **52** bileşiği elde edildi.

3.4. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar

Antimikrobiyal aktivite için *E. coli* [ATCC 25922], *S. aureus* [ATCC 25923], *S. pyogenes* [ATCC 19615], *P. aeruginosa* [ATCC 27853], *B. subtilis* [ATCC 11774] ve antifungal aktivite için *C. albicans* [ATCC 10231] kullanılmıştır.

3.4.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Antimikrobiyal aktivite için Müller Hinton Agar ve antifungal aktivite için ise Sabouraud Dextrose Broth besiyeri kullanılmıştır.

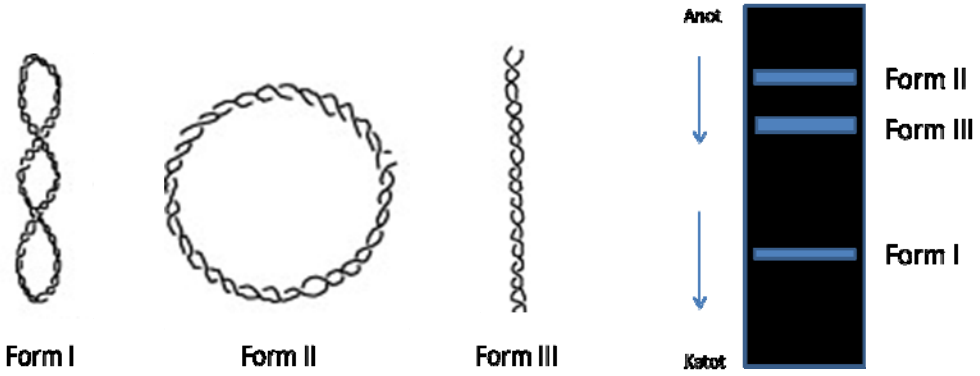
3.4.3. Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılması

Antimikrobiyal aktivite N.C.C.L.S (National Committee for Clinical Laboratory Standarts) kurallarına göre disk diffüzyon yöntemi ile belirlendi. Disk diffüzyon testi Müller Hinton Agar besiyerinde yapıldı. Mikroorganizmaların aşılanma işlemi yapılmadan önce katı besiyerleri 37 ^{o}C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kullanılan bakteri suşları 25 mL Müller Hinton Broth besiyerinde 4-6 saatte üretildi. 625 nm'de 0,08 ile 0,1 arasında absorbans ayarı yapıldı. Böylece absorbans 0,5 Mc Farland ($1x10^{8}$ cfu/mL) standardına eşitlendi. *C. albicans* ise Sabouraud Dextrose Broth besiyerinde (25 mL) 8-10 saat arasında absorbans 0,5 Mc Farland standardına eşitlendi. Sıvı kültürden 100 µL alınıp katı besiyerine steril pamuklu çubuklar yardımıyla homojen şekilde yayılmaları sağlandı. Daha sonra ligantların stok çözeltileri (DMSO içinde) 6 mm çapındaki kağıt disklere 2x10 µL emdirilerek diskler agar üzerine yerleştirildi. Bakteriler 37 ^{o}C'de 24 saat, mantar ise 48 saat inkübasyona bırakıldı, daha sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. Pozitif kontrol olarak Ofloxacin (5 µg), Netilmycin (30 µg) Erythromycine (15 µg), Amoxycillin/Clavulanic asit (30 µg), Amphotericin B (30 µg) kullanıldı.

3.5. DNA Kesim Çalışmaları

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yüzden agaroz jel elektroforizi, çeşitli nedenlerle saflaştırılan DNA' nın tanımlanabilmesi, büyüklüğünün belirlenebilmesi ve özellikle yapısında yapılan değişikliklerle hangi formda olduğunu tespit etmek için iyi bir tekniktir.

Sentezlenen ligantların $CuCl_2$ varlığında DNA kesimi agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu sistemle; DNA'nın supercoiled formunun (form I, kırık yok), open circular form (form II, DNA zincirinde sadece bir kırık var) ve linear forma (form III, DNA zincirinde birden fazla kırık var) dönüşümü incelendi. Bu sistemde Form I, yük yoğunluğu fazla, hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eden formdur. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II' nin arasında bir hıza sahiptir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.3. Plazmid DNA'nın formları

3.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler temelinde ayıran bir yöntemdir. Elektroforez terimi yüklü partiküllerin elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır.

Birçok önemli biyolojik makromolekül (amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak

çözeltide katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak yüklü partiküller katoda veya anoda doğru hareket ederler. Elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da ise DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anottan katoda doğru hareket eder.

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yüzden, agaroz jel elektroforizi, çeşitli nedenlerle saflaştırılan DNA' nın tanımlanabilmesi, büyüklüğünün belirlenebilmesi ve özellikle yapısında yapılan değişikliklerle hangi formda olduğunu tespit etmek için iyi bir tekniktir.

3.5.1.1. Agaroz Jel'in Hazırlanması

Agaroz (1.0 g) 100 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. 60 ^{o}C'ye soğutuldu. 1,5 μL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletildi.

3.5.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı çekildi.

3.5.1.3. Mini Prep Yöntemi ile Plazmid DNA Saflaştırılması

pBluescript M13+ plazmid DNA'sı Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın saflığına, hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı (50 μg/mL için A_{260}=1.0).

3.6. Çözeltilerin Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite için, Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların (**41**), (**52**) DMSO içerisinde 15 mg/mL stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden seyreltme yapılarak 2.5, 7.5 ve 15 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı.

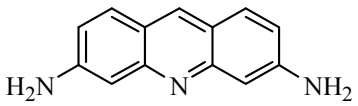
DNA kesim çalışmaları için, Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların(**41**), (**52**) DMSO içerisinde 500 µM 1,0 mL stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden seyreltme yapılarak 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı.

3.6.1. $CuCl_2$ Çözeltisinin Hazırlanması

Bakır (II) klorür çözeltisi su içerisinde 500 µM olacak şekilde 50 mL hazırlandı. Bu stok çözeltiden seyreltme yapılarak 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı.

3.7. Proflavin HCl' in Nötralleştirilmesi (46)

Proflavin HCl (**10**) (12.2 mmol, 3.0 g) suda (80.0 mL) çözündü. Sonra 1M sodyum hidsoksit (NaOH) damla damla eklenerek çöktürüldü ve vakum altında süzüldü. Daha sonra sırasıyla soğuk etanol (70.0 mL) ve dietileter (70.0 mL) ile yıkanıp kurutularak açık sarı renkli **46** molükülü elde edildi (1.5 g).



46

3.8. Asetonun Kurutulması

Aseton, potasyum karbonat (K_2CO_3) içinde bir gece bekletildi. Daha sonra süzülerek her iki balonunda da aktive edilmiş moleküler boncuk (sieve) (4 Å) bulunan destilasyon düzeneği ile destillenip kurutuldu.

3.9. N,N-Dimetil Formamidin Kurutulması

N,N-Dimetil formamid, magnezyum sülfat ($MgSO_4$) içinde bir gece karıştırıldı. Daha sonra süzülerek her iki balonunda da aktive moleküler boncuk (sieve) edilmiş (4 Å) bulunan destilasyon düzeneği ile destillenip kurutuldu.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sentez Çalışmaları

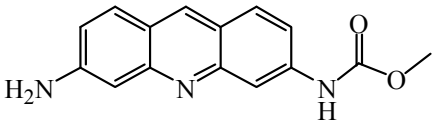
4.1.1. 2,6-bis{[(6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)etil]metilamino metil}piridin (41) Sentezi

(6-amino-3-akridinil)karbamik asit metil ester (48) Bu madde iki farklı metot denenerek sentezlendi.

Metot I: Proflavin hidroklorür (**10**) (2.0 eq, 20.4 mmol, 5.0 g), kuru asetonda (250 mL) çözüldükten sonra üzerine damla damla metil kloroformat (20.0 eq, 200 mmol, 15.6 mL) ilave edilerek 48 saat refluks edildi. Bu işlem sonrasında reaksiyon karışımına sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$, 850 mg) ilave edilerek 72 saat refluks edildi. Reaksiyon sonunda çözücü vakum altında uçurulup, saflaştırma işlemi için kolon kromotografisi ile yapıldı. Çözücü sistemi olarak önce, Etil asetat:Hekzan (1:1) ile başlanıp her iki tarafı korunmuş proflavin içeren fraksiyon toplandıktan sonra kolon %100 Etil asetat ile yıkanıp Etil asetat:Aseton:Trietilamin (5:5:1) çözücü sistemi ile saflaştırmaya işlemi yapıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu ve katı kahverenkli **48** bileşiği elde edildi (775 mg, %13) .R_f= 0.34. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm)= 10.00 (s,1H, NH), 8.53 (S, 1H, H-9), 8.07 (d, *J*= 1.32 Hz, 1H, H-4), 7.85 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.75 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H,H-1), 7.42 (dd, *J*= 9.0, 2.0 Hz, 1H, H-7), 7.01 (dd, *J*= 9.0, 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.87 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H, H-5), 6.05 (br s, 2H, NH_2), 3.74 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ (ppm)= 154.2, 151.6, 151.1, 149.8, 140.5, 135.0, 129.6, 129.3, 120.7, 120.2, 117.6, 112.4, 103.0, 52.0.

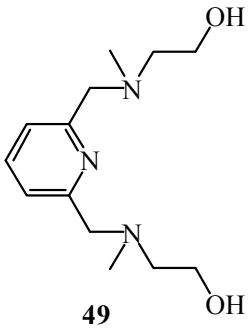
Metot II: Proflavin hidroklorür (**10**) (1.0 eq, 12.21 mmol, 3.0 g), kuru asetonda (100 mL) çözündü. Daha sonra destillenmiş metil kloroformat (10.0 eq, 122.1 mmol, 9.4 ml) damla damla ilave edildi ve 72 saat refluks edildi. Sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Elde edilen katı madde metanolde (80.0 mL) çüzüldükten sonra 3M sodyum metoksi (metanol içinde) ile pH 13.4'e ayarlandı. Bu işlemden sonra çözücü uçurulup kolon kromotografisi ile saflaştırma yapıldı (etil asetat:aseton:trietilamin (5:5:1)). Saflaştırma sonucunda katı kahverenkli **48** bileşiği (650 mg, %12) elde edildi. R_f= 0.34. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm)= 9.98 (s,1H, NH), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.06 (d, *J*= 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.86 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.77 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, H-1), 7.42

(dd, *J*= 9.0, 2.1 Hz, 1H, H-7), 7.01 (dd, *J*= 9.0, 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.86 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H, H-5), 6.03 (br s, 2H, NH_2), 3.74 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ(ppm)= 154.2, 151.6, 151.1, 149.8, 140.5, 135.0, 129.6, 129.3, 120.7, 120.2, 117.6, 112.4, 103.0, 52.0.



48

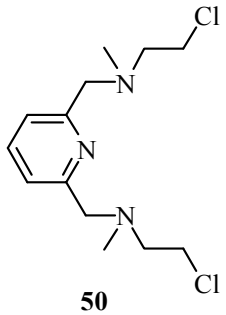
2,6-bis[(hidroksietil)metilaminometil]piridin (49) 2-(metilamino)etanol (2.0 eq, 7.54 mmol, 0.6 ml), etanolde (40.0 mL) çözüldü. Daha sonra üzerine sırasıyla etanol (50 ml) içerisinde çözünmüş 2,6-bis(bromometil)piridin (1.0 eq, 3.77 mmol, 1.0 g), sodyum karbonat (Na_2CO_3), (2.0 eq, 11.31 mmol, 1.2 g) ve potasyum iyodür (KI) (12.0 mg) ileve edilelerek azot gazı altında 15 saat refluks edildi. Reaksiyon sonucunda çözücü uçurulup kalıntı kloroformda (100 mL) çözülüp süzüldü, organik faz doygun sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) (3x50 mL) ile ekstrakte edildi. Sonra organik faz magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ile kurutulup süzüldü ve vakum altında çözücü uçuruldu. Şeffaf ve yağımsı **49** bileşiği (586 mg, %61) elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 7.59 (t, *J*= 7.6 Hz, 1H, H-4'), 7.14 (d, *J*= 7.6 Hz 2H, H-3'), 4.63 (br s, 2H, OH), 3.71 (s, 4H, CH_2-Ar), 3.63 (t, *J*= 5.1 Hz, 4H, CH_2-OH), 2.62 (t, *J*= 5.1 Hz, 4H, CH_2-N), 2.29 (s, 6H, N-CH_3). ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 158.50 (C-2'), 137.09 (C-4'), 121.53 (C-3'), 62.65 (CH_2-Ar), 59.26 (CH_2-N), 59.19 (CH_3), 42.7 (CH_2-OH).



49

2,6-bis[(2-kloroetil)metilaminometil]piridin (50) Tiyonil klorür (100 eq, 116.0 mmol, 8.4 mL) üzerine 2,6-bis[(hidroksietil)metilaminometil]piridin (**49**) (1.0 eq, 1.16

mmol, 293 mg) ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Daha sonra tiyonil klorür uçuruldu. Elde edilen madde (300 mg) metanolde (20.0 mL) çözüldü ve üzerine sodyum karbonat (Na_2CO_3) (2.86 eq, 3.3 mmol, 300 mg) ilave edilip oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Madde diklorometanda (80.0 mL) çözülüp su ile yıkandı (3x45 mL) ve organik faz magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ile kurutulup uçuruldu. Kahverengi yağımsı **50** bileşiği (190 mg, %57) elde edildi. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 7.65 (t, *J*= 7.7 Hz, 1H, H-4'), 7.35 (d, *J*= 7.7 Hz 2H, H-3'), 3.73 (s, 4H, CH_2-Ar), 3.59 (t, *J*= 6.9 Hz, 4H, CH_2-Cl), 2.81 (t, *J*= 6.9 Hz, 4H, CH_2-N), 2.35 (s, 6H, N-CH_3). ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 158.23 (C-2'), 136.93 (C-4'), 121.31 (C-3'), 63.59 (CH_2-Ar), 58.69 (CH_2-N), 42.59 (N-CH_3), 41.56 (CH_2-Cl).

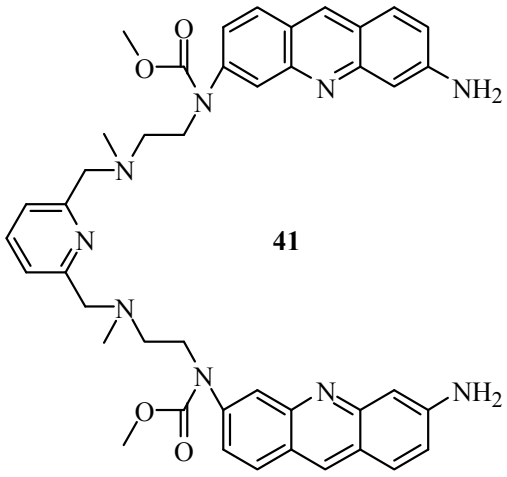


50

2,6-bis{[(6-amino-3-akridinilmetoksikarbonilamino)etil]metilaminometil}

piridin (41) (6-amino-3-akridinil)karbamik asit metil ester (**48**) (2.0 eq, 0.82 mmol, 225 mg) kuru dimetil sülfoksitde (DMF) (5.0 mL) çözündü ve üzerine sodyum hidrür (NaH, % 60, 4.0 eq, 1.68 mmol, 67 mg) ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 30 dk argon gazı altında karıştırıldı. Daha sonra üzerine dimetil sülfoksit (5.0 mL) içerisinde çözünmüş 2,6-bis[(2-kloroetil)metilaminometil]piridin (**50**) (1.0 eq, 0.42 mmol, 122 mg) ilave edildi ve reaksiyon 24 saat 50 ^{o}C'de karıştırıldı. Sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Saflaştırma işlemi için kolon kromotografisi yapıldı. İlk önce etil asetat:aseton:trietilamin (5:3:1) çözücü sistemi ile reaksiyona girmeyen bir tarafı korunmuş proflavin fraksiyonu toplandı. Daha sonra etil asetat:metanol:trietilamin (10:2:1) sistemi ile devam edildi. Sonra çözücü uçuruldu. Elde edilen katı ilk önce diklorometanda (5 mL) çözündü sonra üzerine damla damla hekzan (40 mL) ilave ederek turuncu katı bir madde çöktü. Daha sonra katı madde süzülüp kurutularak **41** bileşiği (35

mg, %12) elde edildi. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm)= 8.49 (s, 2H, H-9), 7.85 (d, *J*= 2.2 Hz, 2H, H-4), 7.80 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H, H-1), 7.77 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H, H-8), 7.35 (t, *J*= 7.7 Hz, 1H, H-4'), 7.30 (dd, *J*= 9.0, 2.2 Hz, 2H, H-2), 7.19 (d, *J*= 2.2 Hz, 2H, H-5), 7.09 (d, *J*= 7.7 Hz, 2H, H-3'), 7.00 (dd, *J*= 9.0, 2.2 Hz, 2H, H-7), 3.95 (t, *J*= 6.9 Hz, 4H, NH_2-Acridine), 3.68 (s, 6H, OCH_3), 3.55 (s, 4H, CH_2-Ar), 2.63 (t, *J*= 6.9 Hz, 4H, CH_2-N), 2.17 (s, 6H, N-CH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ (ppm)= 158.40 (C-2'), 155.86 (CO), 151.16 (C10a), 149.51 (C4a), 148.65 (C6), 143.57 (C3), 136.57 (C 4'), 135.42 (C9), 129.72 (C8), 128.57 (C1), 124.63 (C2), 124.06 (C4), 123.20 (C9a), 121.94 (C8a), 120.82 (C-3'), 120.15 (C7), 106.00 (C5), 63.77 (CH_2-Ar), 55.46 (CH_2-N), 52.96 (OCH_3), 48.31 (CH_2N-Acridine), 42.52 (NCH_3).

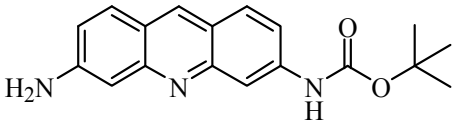


41

4.1.2. [2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *ter*-bütil ester (52) Sentezi

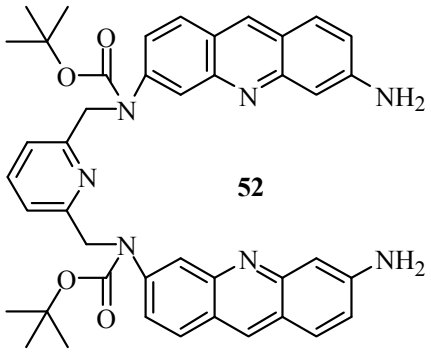
(6-amino-3-akridinil)karbamik asit *tert*-bütil ester (51) Di-*tert*-bütildikarbonat (2.0 eq, 16.82 mmol, 4.0 mL) kuru asetonda (150 mL) çözündü sonra üzerine proflavin (**46**) (1.0 eq, 8.41 mmol 1.76 g) ilave edilerek 8 saat boyunca refluks edildi. Sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Saflaştırma işlemi için kolon kromotografisi kullanıldı. Önce etil asetat:hekzan (1:1) ile her iki tarafı korunmuş proflavin fraksiyonu toplandı. Daha sonra etil asetat ile yıkayıp etil asetat:aseton:trietilamin (5:5:1) çözücü sistemi saflatırma işlemi yapıldı. En son çözücü uçuruldu ve kahverenkli katı **51** bileşiği (580 mg, %23) elde edildi. ^{1}H NMR (400 MHz,

DMSO-d_6): δ (ppm)= 9.66 (s,1H, NH), 8.52 (s, 1H, H-9), 8.04 (s, 1H, H-4), 7.83 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, H-1), 7.74 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.44 (dd, *J*= 8.9, 1.7 Hz, 1H, H-2), 7.00 (dd, *J*= 8.9, 1.7 Hz, 1H, H-7), 6.86 (s, 1H, H-5), 6.01 (br s, 2H, NH_2), 2.09 (s, 9H, CO_2-*t*-Bu), ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ (ppm)= 152.93 (CO), 151.49 (C-10a), 151.06 (C-6), 149.75 (C-4a), 140.93 (C-3), 134.96 (C-9), 129.61 (C-8), 129.12 (C-1), 120.54 (C-9a), 120.11 (C-8a), 120.00 (C-7), 117.68 (C-2), 112.16 (C-4), 102.93 (C-5), 79.68 (CMe_3), 28.32 (CMe_3).



51

[2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester (52) sodyum hidrür (NaH, % 60) (2.2 eq, 0.55 mmol, 22 mg) kuru dimetil sülfoksitde (DMF) (20.0 mL) çözündü. Sonra üzerine **(**6-amino-3-akridinil)karbamik asit *tert*-bütil ester (**51**) (2.0 eq, 0.50 mmol, 150 mg) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk argon gazı altında karıştırıldı. Sonra üzerine 2,6-bis(bromometil)piridin (1.0 eq, 0.25 mmol, 66 mg) ilave edildi ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Saflaştırma işlemi için etil asetat:aseton:trietilamin (5:5:1) çözücü sistemi ile kolon kromotografisi yapıldı. Elde edilen fraksiyon CH_2Cl_2'da (10.0 mL) çözündü ve hekzanda (40.0 mL) çöktürüldü. Sonra süzülüp kurutuldu ve **52** bileşiği (31 mg, %17) elde edildi. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ (ppm)= 1.32 (s, 18H, CO_2 *t*-Bu), 5.02 (s, 4H, CH_2-Ar), 6.19 (br, s, 4H, NH_2), 6.83 (d, *J*= 1.98 Hz, 2H, H-5), 7.04 (dd, *J*= 9.06, *J*= 1.98 Hz, 2H, H-7), 7.32 (d, *J*= 7.58 Hz, 2H, H-3'), 7.38 (dd, *J*= 9.06, *J*= 1.98 Hz, 2H, H-2), 7.68 (d, *J*= 1.98 Hz, 2H, H-4), 7.74 (d, *J*= 9.06 Hz, 2H, H-8 veya H-1), 7.75 (d, *J*= 9.06 Hz, 2H, H-1 veya H-8), 7.79 (t, *J*= 7.58 Hz, 1H, H-4'), 8.52 (s, 2H, H-9). ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ (ppm)= 157.62, 153.77, 151.49, 144.42, 137.67, 135.25, 129.71, 128.32, 123.36, 121.63, 120.85, 119.42, 102.15, 80.51, 55.18, 27.97.



52

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların (**41**), (**52**) antimikrobiyal aktivitesi disk diffüzyon yöntemi ile belirlendi. Ligantların antibakteriyal aktiviteleri için *E. coli* [ATCC 25922], *S. aureus* [ATCC 25923], *S. pyogenes* [ATCC 19615], *P. aeruginosa* [ATCC 27853], *B. subtilis* [ATCC 11774] bakterileri ve antifungal aktivite için *C. albicans* [ATCC 10231] mantarı kullanıldı. Ligantların antimikrobiyal aktivite çalışmaları 2.5, 7.5 ve 15 μg/μL (DMSO içinde) konsantrasyon aralığında çalışıldı (Tablo 4.1.).

Sentezlenen bis-interkalasyon ligantlarınn giriş maddesi olan Proflavin (**10**) molekülü güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdi. Artan konsantrasyonla inhibisyon etkisi de artmaktadır (Tablo 4.1.). *E. coli* bakterisi üzerinde yüksek konsantrasyonda (15 μg/μL) 26 mm ve düşük konsantrasyonda (2.5 μg/μL) 24 mm zon çapı (Resim 4.1.), *S. aureus* bakterisi üzerinde 15 μg/μL de 18 mm, 2.5 μg/μL de 12 mm zon çapı (Resim 4.2.), *S. pyogenes* baketrisi üzerinde 15 μg/μL de >30 mm, 2.5 μg/μL de 22 mm zon çapı (Resim 4.3.), *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde 15 μg/μL de 24 mm, 2.5 μg/μL de 20 mm zon çapı (Resim 4.4.), *B. subtilis* bakterisinde 15 μg/μL de 16 mm, 2.5 μg/μL de 14 mm zon çapı (Resim 4.5) ve *C. albicans* mantarı yüksek konsantrasyoda 15 μg/μL de 10 mm (Resim 4.6.) zon çapı ile test edilen standart antibiyotikler (Tablo 4.2.) kadar antimikrobiyal aktivitesinin olduğu tespit edildi.

2,6-bis{[((6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)-etil)metilaminometil} piridin **(41)** molekülünün antimikrobiyal aktivitesi genel olarak artan konsantrasyonla

arttığı gözlemlendi (Tablo 4.1.). Ligandın 2.5, 7.5 ve 15 μg/μL konsantrasyonlarında sırasıyla; *E. coli* bakterisi üzerinde 8, 12, 14 mm (Resim 4.1.), *S. aureus* bakterisi üzerinde 8, 8, 10 mm (Resim 4.2.), *S. pyogenes* bakterisi üzerinde 10, 16, 20 mm (Resim 4.3.) *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde 0, 10, 10 mm (Resim 4.4.), *B. subtilis* bakterisi üzerinde 10, 10, 10 mm (Resim 4.5.) ve *C. albicans* mantarı üzerinde 8, 10, 12 mm (Resim 4.6.) zon çapları ölçüldü.

[2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester **(52)** ligandının ılımlı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görüldü (Tablo 4.1.). ölçülen zon çaplarında ligand, *E. coli* (Resim 4.1.) ve *P. aeruginosa* bakterilerine (Resim 4.4.) karşı aktivite göstermedi, *S. aureus* (Resim 4.2.) ve *B. subtilis* (Resim 4.5.) bakterilerinde bütün konsantrasyonlarda 8 mm, *S. pyogenes* bakterisi üzerinde 2.5, 7.5 ve 15 μg/μL konsantrasyonlardaki zon çapları sırasıyla 8, 10 ve 12 mm (Resim 4.3.) ve *C. albicans* mantarında 2.5, 7.5 ve 15 μg/μL konsantrasyonlardaki zon çapları ise sırasıyla 8, 8 ve 10 mm olarak ölçüdü.

4.3. DNA Kesim Çalışmaları

Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların (**41**), (**52**) DNA kesim aktiviteleri Agaroz Jel Elektroforezi ile belirlendi.

Tüm reaksiyonlar 0,5 mL Eppendorf tüp içerisinde, fosfat tamponunda (14.29 mmol NaCl, 7.14 mmol fosfat, pH 7.4) ve karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında 90, 180 ve 360 dakikada gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu. İnkübasyon süresinden sonra numunelere 3 μL % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 0.1 brom fenol mavisi, 150 mM EDTA, 2 mM Tris içerisinde %1 SDS, 1 mM asetat, pH 8) ilave edildi ve sulu etidyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) içeren %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 60 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 90 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi.

4.3.1. Proflavin (10) ve Sentezlenen Ligantların (41), (52) DNA Kesim Aktiviteleri

Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların (**41**), (**52**) DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci kuyucuk, çözücü olarak kullanılan DMSO'nun tek başına pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine etkisini içeren kontroldür. pBluescript M13+ plazmid DNA ve DMSO içerir.

Üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı kuyucuklar Proflavinin (**10**) farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı.

pBluescript M13+ plazmid DNA ve **10** içerir.

Yedinci, sekizinci, dokuzuncu ve onuncu kuyucuklar 2,6-bis{[((6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)-etil)metilaminometil} piridinin (**41**) farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **41** içerir.

Onbirinci, onikinci, onüçüncü ve ondördüncü kuyucuklar [2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester (**52**) farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **52** içerir.

4.3.2. Proflavin (10) ve Sentezlenen Ligantların (41), (52) Bakır(II) Varlığında DNA Kesim Aktiviteleri

Proflavin (**10**) ve sentezlenen ligantların (**41** ve **52**) Cu^{+2} varlığında DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci kuyucuk, çözücü olarak kullanılan DMSO'nun tek başına pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine etkisini içeren kontroldür. pBluescript M13+ plazmid DNA ve DMSO içerir.

Üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı kuyucuklar Proflavinin (10), Cu^{+2} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA, $CuCl_2$ ve **10** içerir.

Yedinci, sekizinci, dokuzuncu ve onuncu kuyucuklar 2,6-bis{[((6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)-etil)metilaminometil} piridin' in (**41**), Cu^{+2} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA, $CuCl_2$ ve **41** içerir.

Onbirinci, onikinci, onüçüncü ve ondördüncü kuyucuklar [2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester (**52**), Cu^{+2} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100 μM) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA, $CuCl_2$ ve **52** içerir.

Onbeşinci kuyucuk Cu^{+2}' nin tek başına DNA üzerine etkisini incelemek için dizayn edilen kontroldür. pBluescript M13+ plazmid DNA ve $CuCl_2$ içerir.

Onaltıncı kuyucuk Cu^{+2}' nin DMSO varlığında DNA üzerine etkisini incelemek için dizayn edilen kontroldür. pBluescript M13+ plazmid DNA, DMSO ve $CuCl_2$ içerir.

Tablo 4.1. 41, **10** ve **52** ligantlarının bakteriler ve mantarlar üzerinde meydana getirdiği zon çapları (mm)

	Test organizmaları					
Ligantlar	*E. coli*	*S. aureus*	*B. subtilis*	*S. pyogenes*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*
41 2.5 µg/µL	8	8	10	10	-	8
41 7.5 µg/µL	12	8	10	16	10	10
41 15 µg/µL	14	10	10	20	10	12
10 2.5 µg/µL	24	12	14	22	20	-
10 7.5 µg/µL	26	14	16	30	22	8
10 15 µg/µl	26	18	16	>30	24	10
52 2.5 µg/µL	-	8	8	8	-	8
52 7.5 µg/µL	-	8	8	10	-	8
52 15 µg/µL	-	8	8	12	-	10

10: Proflavin

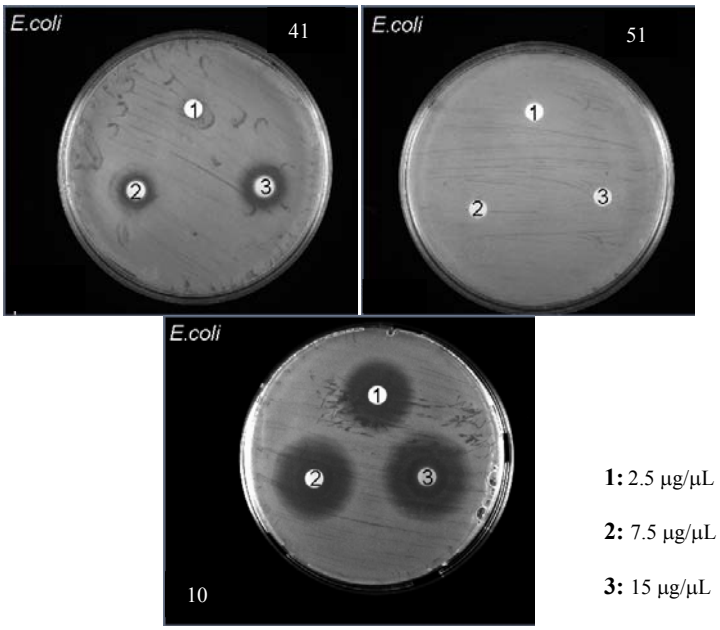
52: [2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester

41: 2,6-bis{[((6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)-etil)metilaminometil}piridin

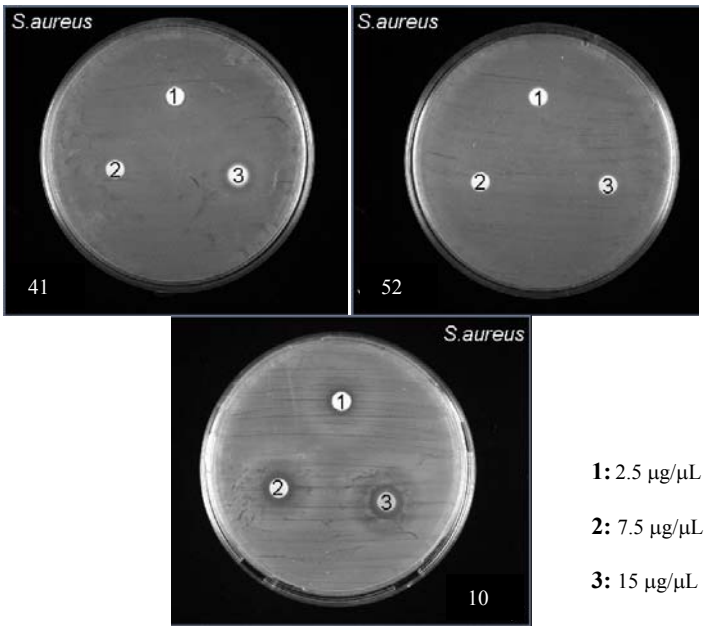
Tablo 4.2. Standart antibiyotiklerin bakteriler ve mantarlar üzerinde meydana getirdiği zon çapları (mm)

	Standart antibiyotikler (µg / 6 mm disk)				
Test organizmaları	OFX 5 µg	NET 30 µg	E 15 µg	AMC 30 µg	AFB 30 µg
E. coli ATCC 25922	28	26	14	20	TE
S. aureus ATCC 25923	20	18	18	>30	TE
S. pyogenes ATCC 19615	22	>30	>30	28	TE
P. aeruginosa ATCC 27853	16	22	R	R	TE
B. subtilis ATCC 11774	24	>30	>30	24	TE
C. albicans ATCC 10231	TE	TE	TE	TE	13

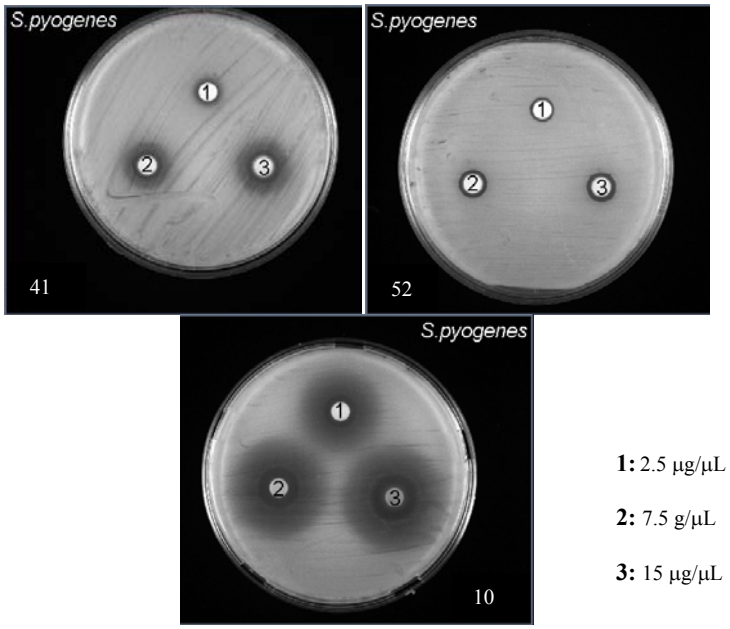
OFX: Ofloxacin; **NET**: Netilmycin; **E**: Erythromycin; **AMC**: Amoxycillin /Clavulanic asit; **AFB**: Amphotericin B; **TE**: Test edilemedi; **R**: Dirençli; **-**: Aktif değil.



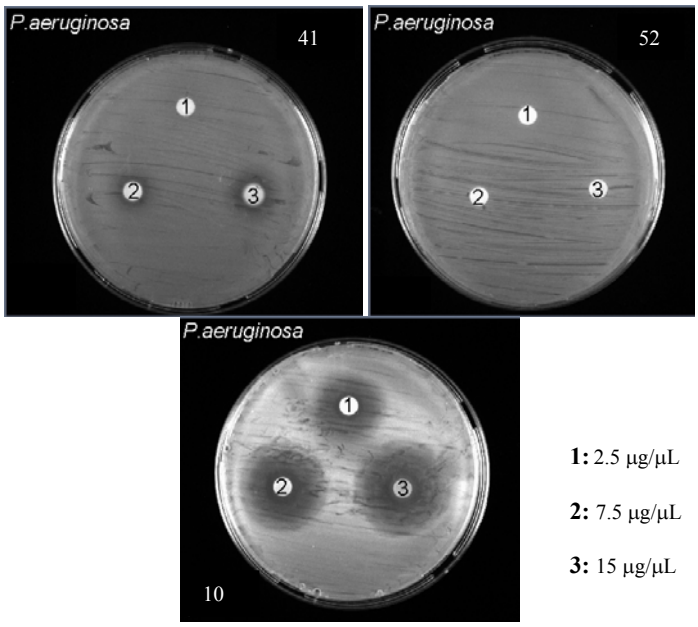
Resim 4.1. Ligantların *E. coli* ATCC 25922 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi



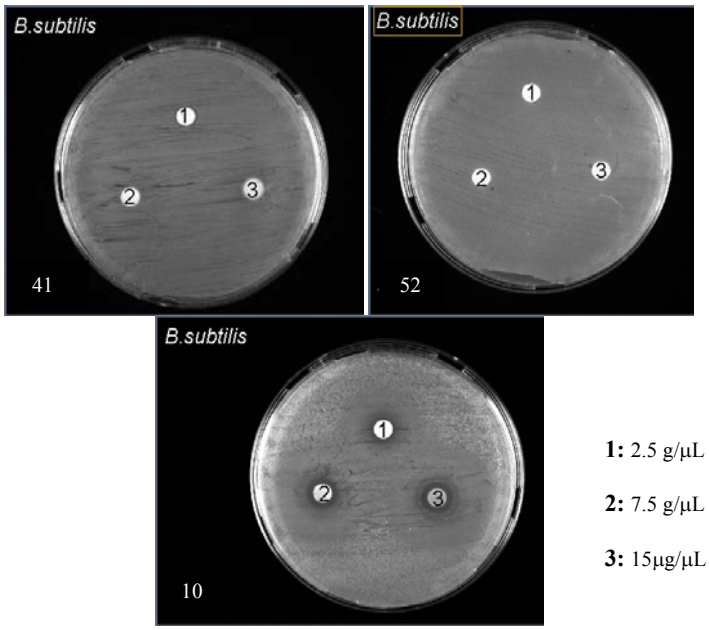
Resim 4.2. Ligantların *S. aureus* ATCC 25923 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi



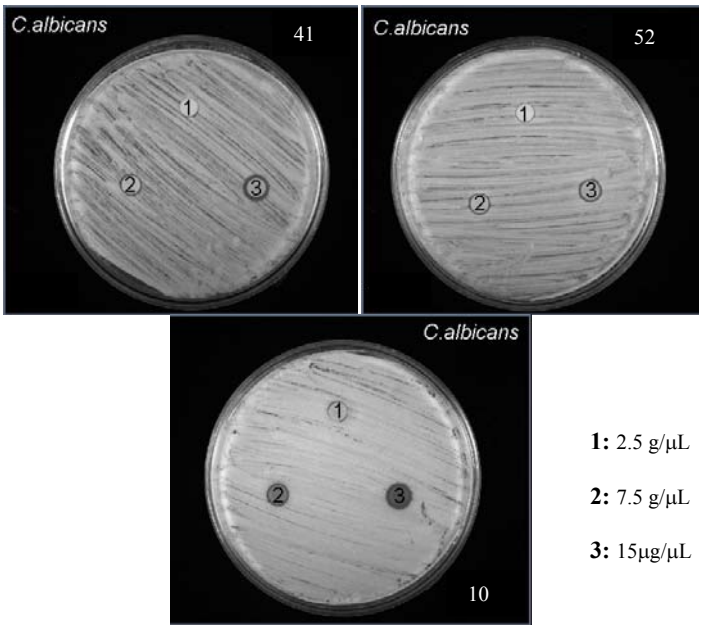
Resim 4.3. Ligantların *S. pyogenes* ATCC 19615 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi



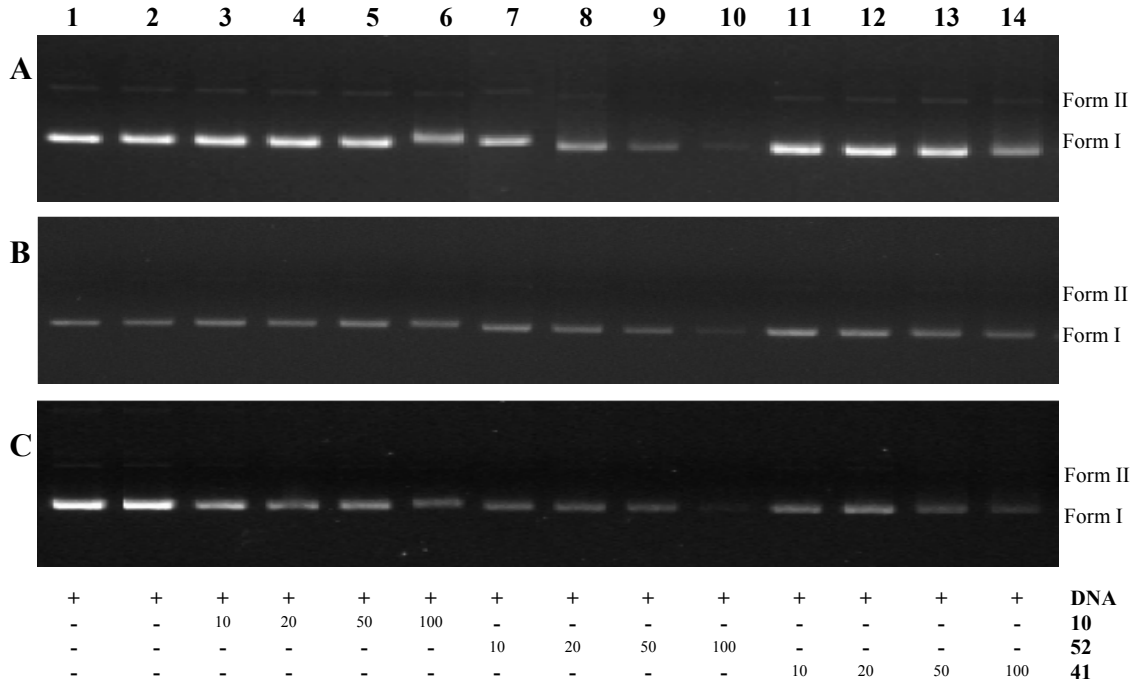
Resim 4.4. Ligantların *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi



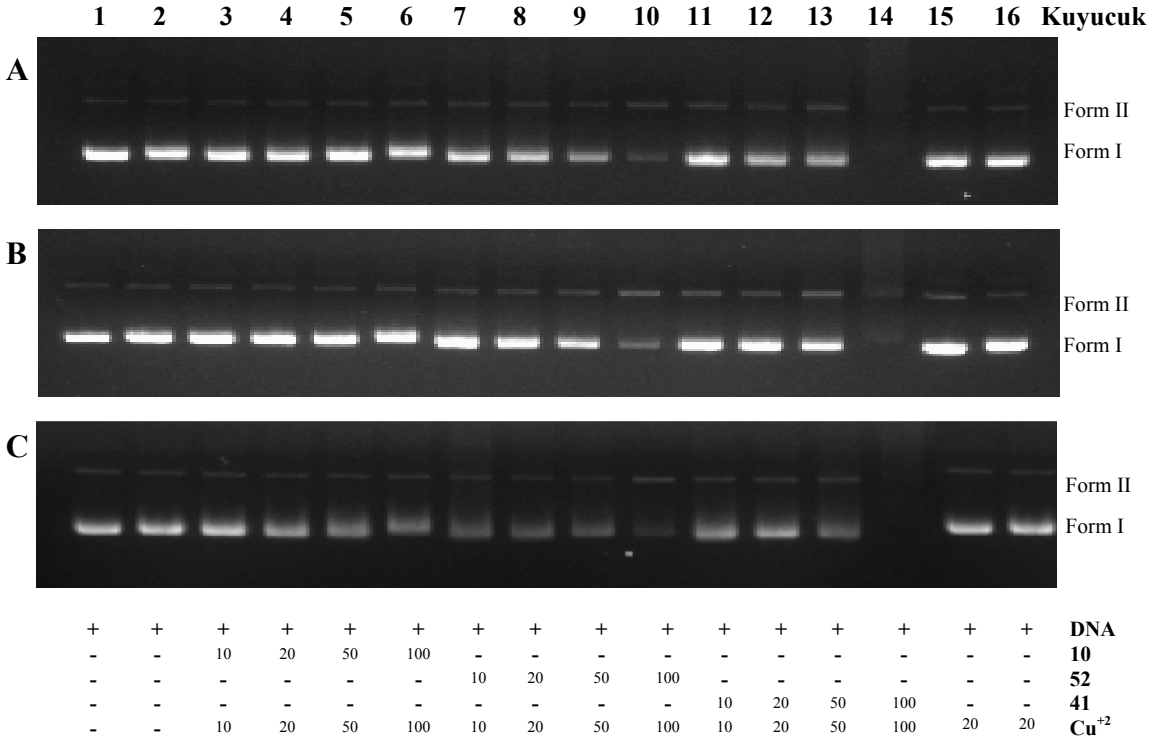
Resim 4.5. Ligantların *B. subtilis* ATCC 11774 bakterisi üzerindeki inhibisyon etkisi



Resim 4.6. Ligantların *C. albicans* ATCC 10231 mantarı üzerindeki inhibisyon etkisi



Resim 4.7. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (**10**), (**41**) ve (**52**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (İnkübasyon süreleri A: 1.5, B: 3 ve C: 6 saat)



Resim 4.8. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (**10**), (**41**) ve (**52**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (İnkübasyon süreleri A: 1.5, B: 3 ve C: 6 saat)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüz yılın hastalıkları arasında gösterilen kanserin tedavisi için büyük uğraş veren biyokimyacılar, moleküler biyologlar ve genetik mühendisleri gibi bilim insanları nükleik asitleri hedef alarak çalışmalarını sürdürmektedirler. Bu amaçla DNA/RNA'ya değişik mekanizmalarla bağlanabilen ve spesifik olarak kesebilen küçük organik moleküllerin dizaynı ve sentezine yönelik çalışmalar son otuz yılda odak noktası haline gelmiştir. Bu nedenle birçok doğal ürünlerin mimikleri endonükleaz olarak tasarlanıp sentezlenmiştir. çalışmalarımızda sentezlenen moleküllerde, aromatik ve rijit yapıdaki proflavin ile DNA baz çiftleri arasına girip bis-interkalaasyon yapması ve proflavin halkasına konjuge olmuş pirol halkasının da DNA oluklarına bağlanması hedeflendi. Bis-interkalatör molekülün zincir uzunluğunun DNA bağlanma aktivisi üzerindeki etkisini anlamak için sentezlenen ligantların interkalasyon yapacak molekülün korunması koşuluyla zincir boylar farklı iki molekül sentezlendi (**41 ve 52**). (Lorente 1995, Espinosa 2004, Fernandez 2007, Grant 2011, Sierra 2012).

2,6-bis{[((6-amino-3-akridinil)metoksikarbonilamino)-etil)metilaminometil} piridin **(41)**'nin sentezi için ilk basamakta, proflavin tuzunun (**10**) metil kloroformat ile reaksiyonu sonucu peptit bağı oluşturup proflavinin serbest haldeki aminlerden bir tanesi korunarak **48** molekülü elde edildi. Bu basamak iki farklı yöntemle yapıldı (Lorente ve ark 1995, Sierra ve ark 2012). Proflavinin serbest haldeki aminlerin her ikisinin de korunduğu moleküller olması dolayısıyla kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi yapıldı. Verim ve zaman açısından Sierra ve arkadaşlarının yöntemi daha elverişliydi. Sonraki basamakta bis-interkalasyon zinciri için nükleofilik yer değiştirme reaksonu ile 2-**(**metilamino**)**etanol, 2,6-bis(bromometil)piridin'e bağlanarak zincir uzatma işlemi sonucu **49** molekülü elde edildi. Daha sonra daha az reaktif olan alkol grupları (**49**) tiyonil klorür ile klorlanarak **50** molekülü elde edildi. En son basamakta ise klorlanmış molekül (**50**) ile daha önce bir tarafı korunmuş proflavin % 60'lık NaH varlığında reaksiyona girmesi sonucu **41** molekülü sentezlendi. Bu basamakta gerek yan ürün oluşma olasılığı gerekse saflaştırma zorlukları dolayısıyla verim düşük olmuştur.

[2,6-pridinil-bis(metilen)]bis[(6-amino-3-akridinil)]karbamik asit *tert*-bütil ester **(52)**'nin sentezi için ilk basamakta, **41** molekülünün sentezindeki prosedürün aksine, tuz

halinde olan proflavin 1M NaOH ile nötralleştirilerek **53** molekülü elde edildi. Sonraki basamakta nötral haldeki proflavin ile di-*tert*-bütildikarbonat'ın reaksiyonu sonucu peptit bağı oluşturarak proflavinin bir tarafı korundu (**51**). Bu basamakta **41**'de koruma grubu olarak kullanılan metil kloro format yerine di-*tert*-bütildikarbonat kullanılmasının nedeni daha verimli ve kısa sürede reaksiyonun tamamlanması, istenildiği durumda koruma grubunun daha rahat ve ılıman koşullarda ayrılabilmesidir. En son basamakta ise bir tarafı korunmuş proflavin ile 2,6-bis(bromometil)piridinin % 60'lık NaH varlığında birleştirilerek tasarlanan molekül **52** sentezlendi (Grant 2011). Bütün ara basamaklarda elde edilen moleküllerin yapısı ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR ile karakterize edildi. Sentez ve saflaştırma sırasında kullanılan cam malzemelerin ve organik çözücülerin tümünün kuru olmasına dikkat edildi.

Sentez çalışmaları tamamlandıktan sonra DNA kesim çalışamaları ve disk diffüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapıldı. Yapılan testlerde, sentezlenen bis-interkalatörlerin (**41** ve **52**) daha önce DNA kesim ve antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış mono-interkalatör proflavin (**10**) ile kıyaslandı.

DNA kesim çalışmaları için *E. coli* bakterisinden izole edilen pBluescript M13+ plazmid DNA kullanılarak DNA jel elektroforezi deneyi yapıldı. Bu tür deneylerde plazmid DNA'nın üç formundaki dönüşümlere göre ligantların DNA kesim ilgileri hakkında yorum yapılabilinir. Yapılan bu deneyde supercoiled formun (form I) klasik olarak form II veya form III'e dönüşümü gözlemlenmedi. Ligantların DNA kesimi sonucu form I'in çok küçük fragmentlere parçaladığı tespit eildi. Form II ve form III'ün oluşmamasından dolayı kesim yüzdesi hesapalanamadı.

Cu^{+2} varlığında (Resim 4.8.) ve yokluğunda (Resim 4.7.) Agaroz jel elektroforezi ile DNA kesim çalışmaları yapıldı. Bu deneyde sentezlenen bis-interkalatör molekülleri **41** (Resim 4.7., Resim 4.8. kuyucuk 11-14) ve **52** (Resim 4.7., Resim 4.8. kuyucuk 7-10) ile mono-interkalatör molekül olan **10**'un (Resim 4.7., Resim 4.8. kuyucuk 3-6) artan konsantrasyonlarına (10, 20, 50, 100 μM) ve artan inkübasyon sürelerine (1.5, 3 ve 6 saat) parelel olarak DNA sarmalında kesim gerçekleştirdikleri görülürken, bis-interkalatörlerin mono-interkalatöre göre daha iyi DNA kesimi gerçekleştirdikleri gözlemlendi. Bakır yokluğunda ve karanlık ortamda 1.5, 3 ve 6 saat inkübasyon sürelerinde, kısa zincirli **52** molekül en yüksek konsantrasyonda supercoiled

(form I) formun tamamını çok küçük fragmentelere parçaladığı tespit edildi (Resim 4.7., kuyucuk 10). Uzun zincirli **41** molekülü de en yüksek konsantrasyonda süpercoiled formu büyük oranda küçük fragmentlere parçaladığı tespit edildi (Resim 4.7., kuyucuk 14) ancak bu dönüşüm kısa zincirli moleküle oranla daha azdı. Mono-interkalasyon molekül olan proflavinde (**10**) ise suprcoiled formda kayda değer bir dönüşüm görülmedi (Resim 4.7., kuyucuk 6). Bu elde edilen bulgular daha önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir (Zimmerman ark. 1989, Choudhury ve ark. 2005). Bakır varlığında ise **10** ve **52** moleküllerin DNA kesim aktivitelerinin bakır yokluğundaki kesimden çok da farklı olmadığı görüldü (Resim 4.8., kuyucuk 6 ve 10) ancak uzun zincirli molekülün (**41**) DNA kesim aktivitesini arttırdığı görüldü (Resim 4.8., kuyucuk 14). Bunun sonucu olarak da supercoiled formun tamamı çok küçük fragmentlere parçalandığı tespit edildi. Bakırın yokluğundaki kesim mekanizması; ligantlar üzerindeki aril aminlerin nükleofilik atakları üzerinden yürüdüğü bilinmektedir (Warner 2002). Bakır varlığındaki mekanizma ise fenton kimyası ile oluşan hidroksi radikali üzerinden yürüdüğü düşünülmektedir (i).

$$Cu\,(I) + H_2O_2 \longrightarrow Cu\,(II) + {}^{-}OH + {}^{\bullet}OH \qquad (i)$$

DNA kesim çalışmalarından sonra ligantların (**10**, **41** ve **52**) (2.5, 7.5 ve 15 μM) antimikrobiyal aktiviteleri disk diffüzyon yöntemi ile belirlendi. *E. coli* [ATCC 25922], *S. aureus* [ATCC 25923], *S. pyogenes* [ATCC 19615], *P. aeruginosa* [ATCC 27853], *B. subtilis* [ATCC 11774] bakterileri ve antifungal aktivite için *C. albicans* [ATCC 10231] mantarı kullanıldı. Standart antibiyotik olarak da ofloxacin (5 μg), netilmycin (30 μg), erythromycin (15 μg), amoxycillin/clavulanic Asit (30 μg) ve amphotericin B (30 μg) kullanıldı. Yapılan antimikrobiyal testler sonucunda mono-interkalsyon ligandı (**10**) en iyi antimikrobiiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Uzun zincirli bis-interkalasyon ligandı kısa zincirliye göre daha iyi aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Daha önce antmikrobiyal aktivitesi çalışılmış (Albert 1966, Wainwright 2001) proflavinin (**10)** test edilen standart antiyotiklerle karşılaştırıldığında, *S. pyogenes* bakterisi üzerinde en iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip netilmycin ve erythromycin (Tablo 4.2., >30 mm zon çapı) kadar antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edildi (Tablo 4.1., >30 mm zon çapı), ayrıca proflavinin (**10**), gram(-) *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde test edilen standart antibiyotikler arasında en iyi antimikrobiyal aktiviteye

sahip netilmycinden de (22 mm zon çapı) daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (24 mm zon çapı). Proflavinin (**10**) antifungal aktivitesi de *C. albicans* mantarı üzerinde test edilen amphotericin B (13 mm zon çapı) antifungal ilaca yakın bir antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (10 mm zon çapı). Buna karşın, bis-interkalatör ligandların (**41 ve 52**) ise proflavine (**10**) ve test edilen standart antibiyotiklere göre daha az antimikrobiyal akativite gösterdiği görüldü. Burada uzun zincirli molekül (**41**) standart antibiyotiklere ve proflavine (**10**) göre ılımlı aktivite gösterdiği tespit edildi. Uzun zincirli molekül (**41**) en iyi antimikrobiyal aktiviteyi *S. pyogenes* bakterisi üzerinde gösterdiği tespit edildi (20 mm zon çapı). **41** molekülünün antifungal aktivitesi ise *C. albicans* mantarı üzerinde test edilen amphotericin B (13 mm zon çapı) hemen hemen antifungal ilaç kadar aktivite gösterdiği tespit edilirken (12 mm zon çapı), kısa zincirli molekül (**52**) uzun zincirli moleküle (**41**) göre çok daha az antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve gram (-) *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edildi.

Sonuç olarak gerek DNA kesim çalışmalarında gerekse antimikrobiyal aktivite çalışmalarında moleküllerin büyüklükleri ve hareket kabiliyetleri aktivite üzerindeki etkisi görülmektedir. DNA kesim çalışmalarında hacimsel olarak daha büyük yapılı olan bis-interkalatör sistemli **41** ve **52** moleküllerinin DNA'da daha fazla kesime neden olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç bis-interkalatör molekülleri, DNA'ya bağlanma ilgilerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında ise hacimsel olarak daha küçük olan mono-interkalatör proflavinin (**10**), bis-interkalatör moleküllere (**41** ve **52**) göre daha iyi antimikrabiyal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Bundan sonraki çalışmalarımız sentezlenen aminlerin (**41** ve **52**) diazonyum tuzlarına dönüştürülüp, bunların DNA kesim, DNA bağlanma ilgileri ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarına yönelik olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed., Garland Science: New York.

Albert, A., 1966. The Acridines, St. Martin's Press, 403-504. New York.

Alberts, B., 2003. Feature of DNA Replication and Recombination, *Nature*, *421*: 431-435.

Arya D.P., Jebaratnam, D.J., 1995a. Towards the Development of Non-Enediyne Approaches for Mimicking Enedıyne Chemistry: Design, Synthesis and Aciıvity of A 1,4-Bisdiazonium Compound, *Tetrahedron Lett.,* 36: 4369-4372.

Arya D.P., Jebaratnam, D.J., 1995b. DNA Cleaving Ability of 9-Diazofluorenes and Diary1 Diazomethanes: Implications for the Mode of Action of the Kinamycin Antibiotics, *J. Org. Chem.,* 60, 3268-3269.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., 1944. Studıes On The Chemical Nature of The Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types, *J. Exp. Med.*, 79: 137-158.

Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K., Tullius, T. D., 1998. DNA Strand Breaking by the Hydroxyl Radical ıs Governed by the Accessible Surface Areas of the Hydrogen Atoms of the DNA Backbone *Proc, Nat. Acad. Sci, USA, 95*: 9738-9743.

Baldeyrou, B., Tardy, C., Bailly, C., Colson, P., Houssier, C., Charmantray, F., Demeunynck. M., 2002. Synthesis and DNA Interaction of A Mixed Proflavine-Phenanthroline Tröger Base, *Eur. J. Med. Chem*., 37: 315-322.

Barvian, M.R., Greenberg, M.M., 1995. Independent Generation of 5,6-Dihydrothymid-5-yl in Single-Stranded Polythmidylate. O_2 Is Necessary for Strand Scission, *J. Am. Chem. Soc.,* 117: 8291–8292.

Bazzicalupi, C., Bencin, A., Bianchi, A., Biver, T., Boggioni, A., Bonacchi, S., Danesi, A., Giorgi, C., Gratteri, P., Ingrain, A.M., Secco, F., Sissi, C., Valltoncoli, B., Venturini, M., 2008. DNA Binding by A New Metallointercalator that Contains A Proflavine Group Bearing Hanging Chelating Unit, *Eur J Chem., 1*4:184-196.

Beak, P., 1977. Energies and Alkylations of Tautomeric Heterocyclic Compounds: Old Problems-New Answers, *Acc. Chem. Res.,* 10: 186-192.

Bennett, R.A.O., Swerdlow, P.S., Povirk, L.F., 1993. Spontaneous Cleavage of Bleomycin-induced Abasic Sites in Chromatin and Their Mutagenicity in Mammalian Shuttle Vectors, *Biochemistry,* 32: 3188-3195.

Beranek, D.T., 1990. Distribution of Methyl and Ethyl Adducts Following Alkylation with Monofunctional Alkylating Agents, *Mutation Res*, 231: 11-30.

Boger, D.L., Cai, H., 1999. Bleomycin: Synthetic and Mechanistic Studies*, Angew. Chem. Int. Ed.*, *38*: 448-476.

Boresch, S., Karplus, M., 1995. The Meaning of Component Analysis: Decomposition of the Free Energy in Terms of Specific Interactions, *J. Mol. Biol.*, *254*: 801-807.

Breen, A.P., Murphy, J.A., 1993. Modelling Radical-Initiated DNA Cleavage by Vinyl Epoxides, J. *Chem. Soc. Commun*., 191-192.

Breen, A.P., Murphy, J.A., 1995. Reactions of Oxyl Radicals with DNA, *Radical Biol. Med.* 18: 1033-1077.

Brookes, P., Lawley, P. D., 1964. The Reaction of Mono- and Di-Functional Alkylating Agents with Nucleic Acids, *Biochem. J.,* 80: 496-503.

Brown, P.,Hoffmann, T., Hansen, O.P., Boesen, A.M., Gronbaek, K., Hippe, E., Jensen, M. K., Thorling, K., Storm, H.H., Pedersen-Bjergaard, J., 1997. Long-Term Survival and Development of Secondary Malignancies in Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Aclarubicin or Daunorubicin Plus Cytosine Arabinoside Followed by Intensive Consolidation Chemotherapy in A Danish National Phase III Trial. Danish Society of Haematology Study Group on AML. *Leukemia,* 11: 37-41.

Celera Genomics, 2001. *Science*, *291*: 1304-1351.

Chaires, J.B., 1997. Energetics of Drug–DNA Interactions, *Biopolymers*, *44*: 201-215.

Chen, J., Stubbe, J., 2005. Bleomycins: Towards Better Therapeutics, *Nat. Rev. Cancer*, 5: 102-112.

Chen, J., Stubbe, J., 2004. Bleomycins: New Methods Will Allow Reinvestigation of Old Issues. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, *8*: 175-181.

Choudhury, J. R., Bierbach, U., 2005. Characterization of the Bisintercalative DNA Binding Mode of A Bifunctional Platinum-Acridine Agent, *Nucleic Acids Res*., 33: 5622-5632.

Çeken, B., Kızıl, M., 2008. Synthesis and DNA-Cleaving Activity of A Series of Substituted Arenediazonium Ions, *Russ. J. Bioorg. Chem.,* 34: 488-498.

Dahm, R., 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA, *Dev. Biol.*, *278*: 274-288.

Demeunynck, M., Charmantray, F., Martelli, A., 2001. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy, *Curr. Pharm. Design,*, 7: 1703-1724.

Denny, W.A., 2004. Chemotherapeutic Effects of Acridine Derivatives, *Med. Chem. Rev.,* 1: 257-266.

D'Andrea, A.D., Haseltine, W.A., 1978. Sequence Specific Cleavage of DNA by the Antitumor Antibiotics Neocarzinostatin and Bleomycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *75*: 3608-3612.

Espinosa, J.F., Fernandez, M.J., Grant, K.B., Gude, L., Rodrigo, M.M., Lorente, A., 2004. Synthesis, DNA Intercalation and Europium(III)-Triggered DNA Photocleavage by A Bis-Proflavine Succinamide Conjugate, *Tetrahedron Lett.,* 45: 4017-4020.

Fernandez, M. J., Wilson, B., Marta P., Rodrigo, M. M., Grant, K. B., Lorente, A., 2007. Copper-Activated DNA Photocleavage by A Pyridine-Linked Bis-Acridine Intercalator, *Bioconjugate Chem*., 18:121-129.

Franklin, R.E., Gosling, R.G., 1953. The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content, *Acta Cryst,*. 6: 673-677.

Friedberg, E. C., 2003. DNA Damage and Repair, *Nature*, *421*: 436-440.

Galm, U., Hager, M.H., Van Lanen, S.G., Ju, J., Thorson, J.S., Shen, B., 2005. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enediynes, and Mitomycin, *Chem. Rev.,* 105:739-758.

Gannet, P.M., Lawson, T. Miller, M., Thakkar, D.D., Lord, J.W., Yau, W.M., Toth, B., 1996. 8-Arylguanine Adducts from Arenediazonium Ions and DNA, *Chem-Biol. Inter.,* 101: 149-164.

Grant, K. B., Terry, C. A., Gude, L., Fernandez, M. J., Lorente, A., 2011. Synthesis and DNA Photocleavage by A Pyridine-Linked Bis-Acridine Choromophore in the Presence of Copper(II): Ionic Strength Effects, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* 21: 1047-1051.

Green, D. R., 2005. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead**,** *Cell*, *121*: 671-674.

Greenwood, D.J., 1995. Conflicts of Interest: the Genesis of Synthetic Antimalarial Agents in Peace and War, *Antimicrob. Chemother.*, *36*: 857-872.

Golden, D. M., Benson, S. W., 1969. Free-Radical and Molecule Thermochemistry from Studies of Gas-Phase Iodine-Atom Reactions, *Chem. Rev.,* 69: 125-134.

Golik, J., Clardy, J., Dubay, g., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, N., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K-I., Doyle, T. W., 1987. Esperamicins, A Novel Class of Potent Antitumor Antibiotics. 3. Structures of Esperamicins A1, A2, and A1b, *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3462.

Grove, W.R.,Fortner, C.I.,Wiernik, P.H., 1982. Review of Amsacrine, An Investigational Antineoplastic Agent, *Clin. Pharm.*, 1: 320-326.

Hanlon, S., 1966. The Importance of London Dispersion Forces in the Maintenance of Deoxyribonucleic Acid Double Helix *Biophys. Res. Commun*., 23: 861-867.

Harousseau, J.L., Cahn, J.Y., Pignon, B., Witz, F., Milpied, N., Delain, M., Lioure, B., Lamy, T., Desablens, B., Guilhot, F., Caillot, D., Abgrall, J.-F., Francois, S., Briere, J., Guyotat, D., Casassus, P., Audhuy, B., Tellier, Z., Hurteloup, P., Herve, P., 1997. Comparison of Autologous Bone Marrow Transplantation and Intensive Chemotherapy As Postremission Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia *Blood*, 90: 2978-2986.

Hecht, S.M., 1986. The Chemistry of Activated Bleomycin, *Acc. Chem. Res.*, 19: 383-391.

Hecht, S.M., J., 2000.Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action, *Nat. Prod.,* 63: 158-168.

Hemminki, K., 1993. DNA Adducts and Mutations in Occupational and Environmental Biomonitoring, *Carcinogenesis*, 14: 2007-2027.

Hershey, A.D., Chase, M., 1952. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage, *J. Gen. Physiol,*. 36: 39-56.

Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer, *Nature*, 411: 366-374.

International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. *Nature*, 409: 860-921.

International Human Genome Sequencing Consortium, 2004. *Nature*, 431: 931-945.

Ishida, N., Miyazaki., K., Kumagai, K., Rikimaru; M., 1965. Neocarzinostatin, An Antitumor Antibiotic of High Molecular Weight; Isolation, Physicochemical Properties and Biological Activitie, *J. Antibiot*., 18: 68-76.

Jebaratnam, D.J., Arya D.P., Chen, H., Kugabalasooriar S., Vo, D., 1995. A Single Precursor Approach to New DNA Cleaving and Crosslinking Agents, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.,* 5: 1191-1196.

Jelic, S., Tomasevic, N.Z., Kovcin, V., Milanovic, N., Tomasevic, Z., Jovanivic, V., Vlajic, M. J., 1997. A Two-Step Reevaluation of High-Dose Amsacrine for Advanced Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract: A Pilot Phase II Study, *Chemother.,* 9: 364-370.

Jehn, U., 1989. New Drugs in the Treatment of Acute and Chronic Leukaemia: Current Role of mAMSA, *Bone Marrow Transplant.*, *3*: 53-58.

Kazuyuki, H., Kaku, M.S., Fujise, M., Kikugawa, K., 1994. DNA Base and Deoxyribose Modification by the Carbon-Centred Radical Generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium Salt, A Carcinogen in Mushroom, *Chem. Res. Toxicol.,* 8: 356-362.

Kersten, H.; Kersten, W.; Rauen, H.M., 1960. Action of Nucleic Acids on the Inhibition of Growth by Actinomycin of *Neurospora crassa, Nature*, 187: 60-61.

Kızıl, M., Yılmaz, E.İ., Pirinççioğlu, N., 2005. Aytekin, Ç., DNA Cleavage Activity of Diazonium Salts: Chemical Nucleases, Turk J. Chem., 27: 539-544.

Konishi, M., Ohkuma, H., Saitoh; K., Kawaguchi, H., Golik, J., Dubay, G., Gronewold, G., Krishnan, B., Doyle; T. W., 1985. Esperamicins, A Novel Class of Potent Antitumor Antibiotics. I. Physico-Chemical Data and Partial Structure, *J. Antibiot.,* 38: 1605-1609.

Konishi, M., Ohkuma, H., Matsumoyo, K., Tsuno, T., Kamei; H., Miyaki; T., Oki, T., Kawaguchi, H., Van Duyne, G. D., Clardy, J., 1989. Dynemicin A, A Novel Antibiotic with the Anthraquinone and 1,5-diyn-3-ene Subunit, *J. Antibiot*. 42: 1449-1452.

Kozurkova, M., Sabolova, D., Jovanec, L., Mikes, J., Koval, J., Ungvarsky, J., Stefanisinova, M., Imrich, J., 2008. Cytotoxic Activity of Proflavine Diureas: Synthesis, Antitumor, Evaluation and DNA Binding Properties of 1',1"-(acridin-3,6-diyl)-3',3"-Dialkyldiureas, *Bioorg Med Chem*, 16: 3976-3984.

Krugh, T.R., 1994. Drug-DNA Interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol*., 4: 351-364.

Lawley, P. D., Brookes, P., 1963. Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides, *Biochem. J.,* 89: 127-138.

Lawley, P.D., Phillips, D.H., 1996. DNA Adducts from Chemotherapeutic Agents, *Mutation Res.* 355: 13-40.

Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G, O., Borders, D. B., 1987. Calichemicins, a Novel Family of Antitumor Antibiotics. 1. Chemistry and Partial Structure of Calichemicin γ, *J. Am. Chem. Soc*., 109: 3464.

Lerman, L.S., 1961. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines, *J. Mol. Biol.*, 3: 18-30.

Lerman, L.S., 1963. The Structure of the DNA-Acridine Complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 49: 94-102.

Lindahl, T., Andersson, A., 1972. Rate of Chain Breakage At Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid, *Biochemistry,* 11: 3618-3623.

Lindahl T., Wood, R.D., 1999. Quality Control by DNA Repair, *Science*, 286: 1897-1905.

Lockhart, T.P., Comita, P.B., Bergman, R.G., 1981. Kinetic Evidence for the Formation of Discrete 1,4-Dehydrobenzene Intermediates. Trapping by Inter- and Intramolecular Hydrogen Atom Transfer and Observation of High-Temperature CIDNP, *J. Am. Chem. Soc.,* 103: 4082.

Lorente, A., Fernandez-Saiz, M., Espinoza, J.F., Jaime, C., Lehn, J.M., Vigneron, J.P., 1995. Cyclo-Bis-Intercalations with Acridine Subunits Linked by Rigid Spacers, *Tetrahedron*, 36: 5261-5264.

Lorente, A., Vazquez, G.Y., Fernandez, M.J., Ferrandez, A., 2004. Bisacridines with Aromatic Linking Chains. Synthesis, DNA Interaction, and Antitumor Activity, *Bio. Med. Chem.,* 12: 4307-4312.

Luch, A., 2005. Nature and Nurture - Lessons from Chemical Carcinogenesis, *Nature Rev. Cancer*, 5: 113-125.

Manning, G.S., 1978. The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to the Electrostatic Properties of Polynucleotides, *Q. Rev. Biophys.*, 11: 179-246.

Martinez, R.,Chacón-Garcia, L., 2005. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What It Worked and What Did not Work, *Curr. Med. Chem.*, 12: 127-151.

Mattes, W.B., Hartley, J,A., Kohn. K,W., 1986. Mechanism of DNA Strand Breakage by Piperidine at Sites of N-7-Alkylguanines, *Biochim. Biophys. Acta.,* 868: 71-76.

Maxam, A. M., Gilbert, W., 1980. Sequencing End Labelled DNA With Base-Specific Chemical Cleavages, *Meth. Enzymol.,* 65: 499-560.

Miaskiewicz, K., Osman, R., 1994. Theoretical Study on the Deoxyribose Radicals Formed by Hydrogen Abstraction, *J. Am. Chem. Soc*., 116: 232-238.

Minford, J., Pommier, Y., Filipski, J., Kohn, K. W., Kerrigan, D., Mattern, M. R., Michaels, S., Schwartz, R. E., Zwelling, L. A, 1986. Isolation of Intercalator-Dependent Protein-Linked DNA Strand Cleavage Activity from Cell Nuclei and Identification as Topoisomerase II, *Biochemistry*, 25: 9-16.

Myers, A. G., 1987. Proposed structure of the Neocarzinostatin Chromophore-Methyl Thioglycolate Adduct; A Mechanism for the Nucleophilic Activation of Neocarzinostatin, *Tetrahedron Lett*., 28: 4493-4496.

Myers, A.G., Cohen,S.B., Kwon, B.M., 1994. DNA Cleavage by Neocarzinostatin Chromophore. Establishing the Intermediacy of Chromophore-Derived Cumulene and Biradical Species and Their Role in Sequence-Specific Cleavage, *J. Am. Chem. Soc.,* 116: 1670-1682.

Neidle, S., 1999. Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, Oxford University Press, New York.

Neville, D.M.Jr.,Davies, D.R., 1966. The Interaction of Acridine Dyes with DNA: An X-ray Diffraction and Optical Investigation, *J. Mol. Biol,*. 17: 57-74.

Nicolaou, K.C., Dai, W.M., 1991. Chemistry and Biology of the Enediyne Anticancer Antibiotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng*, 30: 1387-1416.

Norbury, C. J., Hickson, I. D., 2001. Cellular Responses to DNA Damage, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *41*: 367-401.

O'Neill, J. P., 2000. DNA Damage, DNA Repair, Cell Proliferation, and DNA Replication: How Do Gene Mutations Result?, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *97*: 11137- 11139.

Pommier, Y.,Bertrand, R., 1993. In The Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations, Kirsch, I. R., Ed., CRC Press: 277-309, London.

Povirk, L.F., Hogan, M., Dattagupta, N., 1979. Binding of Bleomycin to DNA: Intercalation of the Bithiazole Rings, *Biochemistry*, 18: 96-101.

Pratviel, G., Bernadou, J., Meunier, B., 1995. Carbon-Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng*. 34: 746-765.

Pryor, W., 1988. Why Is the Hydroxyl Radical the Only Radical that Commonly Adds to DNA? Hypothesis: It Has A Rare Combination of High Electrophilicity, High Thermochemical Reactivity, and A Mode of Production that Can Occur Near DNA, *Free Radic. Biol. Med.* 4:219-223.

Pullman, A., Pullman, B., 1981. Molecular Electrostatic Potential of The Nucleic Acids, *Q. Rev. Biophys.,* 14: 289-380.

Record, M.T.Jr., Anderson, C.F.,Lohman, T.M., 1978. Thermodyniamic Analysis of Ion Effects on the Binding and Conformational Equilibria of Proteins and Nucleic Acids: the Roles of Ion Association or Release, Screening, and Ion Effects on Water Activity, *Q. Rev. Biophys.,* 11: 103-178.

Reich, E., 1964. Actinomycin: Correlation of Structure and Function of Its Complexes with Purines and DNA, *Science*, 143: 684-689.

Rishel, M.J., Thomas, C.J., Tao, Z.F., Vialas, C., Leitheiser, C.J., Hecht, S.M., 2003. Conformationally Constrained Analogues of Bleomycin A_5, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 10194-10205.

Reszka, J.K., Chignell, C.F., 1995. One-Electron Reduction of Arenediazonium Compounds by Physiological Electron Donors Generates Aryl Radicals. An EPR and Spin Trapping Investigation, *Chem. Biol. Interact,* 96: 223-234.

Rouse, J., Jackson, S. P., 2002. Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage**,** *Science*, 297: 547-551.

Ruiz, R., García, B., Ruisi, G., Silvestri, A., Barone, G., 2009. Computational Study of the Interaction of Proflavine with $d(ATATATATAT)_2$ and $d(GCGCGCGCGC)_2$, *J Mol Struct*, 915: 86-92.

Sausville, E.A., Peisach, J., Horwitz, S.B., 1978. Effect of Chelating Agents and Metal Ions on the Degradation of DNA by Bleomycin, *Biochemistry,* 17: 2740-2746.

Scharer, O. D., 2003. Chemistry and Biology of DNA Repair**,** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 2946-2974.

Sierra, S., Duskova, K., Fernández, M.J., Gude, L., Lorente, A., 2012. One-step Template-Directed Synthesis of Acridine-Based Rigid Cyclophanes, *Tetrahedron*, 68: 8773-8782.

Silverman, R. B., 1991. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Academic Press. ILLINOIS.

Singer, B., 1976. All Oxygens in Nucleic Acids React with Carcinogenic Ethylating Agents, *Nature*, 264: 333-339.

Singer, B., Kroeger, M., Carrano, M., 1978. O^2- and O^4-Alkyl pyrimidine Nucleosides: Stability of the Glycosyl Bond and of the Alkyl Group As A Function of pH, *Biochemistry*, 17: 1246-1250.

Sonntag, C.V., Hagen, U., Schon-Bopp, A., Schulte-Frohlinde, D., 1981. Radiation-induced Strand Breaks in DNA: Chemical and Enzymatic Analysis of End Groups and Mechanistic Aspects, Adr. Radiat. Biol., 9: 109-142.

Stivers, J.T., Harris, T.K., Mildvan, A.S., 1997. *Vaccinia* DNA Topoisomerase I: Evidence Supporting a Free Rotation Mechanism for DNA Supercoil Relaxation, *Biochemistry*, 36: 5212-5222.

Stryer, L., 1988. Biochemistry, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Stubbe, J., Kozarich, J.W., Wu, W., Vanderwall, D.E., 1996. Bleomycins: A Structural Model for Specificity, Binding, and Double Strand Cleavage, *Acc. Chem. Res.,* 29: 322-330.

Sugiyama, H., Fujiwara, T., Ura, A., Tashiro, T., Yamamoto, K., Kawanishi, S., Saito, I., 1994. Chemistry of Thermal Degradation of Abasic Sites in DNA. Mechanistic Investigation on Thermal DNA Strand Cleavage of Alkylated DNA, *Chem. Res. Toxicol,* 7: 673-683.

Tullius, T.D., Dombroski, B.A., Churchill, M.E.A., Kam, L. 1987. Hydroxyl Radical Footprinting: A High-Resolution Method for Mapping Protein-DNA Contacts, *Methods Enzymol.,* 155: 537-538.

Todd, A. R., Dekker, C. A., Michelson, A. M., 197. 1953. Nucleotides. Part XIX. Pyrimidine Deoxyribonucleoside Diphosphates, *J. Chem. Soc.,* 947-951.

Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y., 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.*, 19: 200-209.

Umezawa, H., 1978. Bleomycin; Current Status and New Developments, Eds.: S.K. Carter, S.T. Crooke, Academic Press: New York.

Van-Mouwerik, T.J.,Caines, P.M., Ballentine, R., 1987. Amsacrine Evaluation, *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 21: 330-334.

Wadkins, R.M.,Graves, D.E., 1991. Interactions of Anilinoacridines with Nucleic Acids: Effects of Substituent Modifications on DNA-Binding Properties, *Biochemistry*, 30: 4277-4283.

Wainwright, M., 2001. Acridine-A Neglected Antibaterial Chromophore, *J Antimicrob Chemoth.*, 47: 1-13.

Wang, A.H.J., 1992. Intercalative Drug Binding to DNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 361-368.

Wang, J.C., 1996. DNA Topoisomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, *65*: 635-691.

Warner, P.M., Qi, J., Meng, B., Li, G., Xie, L., El-Shafey, A., Jones G.B., 2002. DNA Cleavage by Aromatic Amines, *Bioorg Med Chem Lett.*, 12: 1-4.

Wartell, R.M., Larson, J.E., Wells, R.D., 1974. Netropsin:A Specific Probe for A-T Regions of Duplex Deoxyribonucleic Acid, *J. Biol. Chem.*, *249*: 6719-6731.

Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. A structure for Deoxyriboze Nucleic Acid, *Nature* , 171: 737-738.

Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R., Wilson, H.R., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids, *Nature*, 171: 738-740.

Wilson, W. D., 1996. In Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Blackburn, G. M.; Gait, M. J., Eds., Oxford University Press: 331-370, New York.

Wilson, B., Gude, L., Fernandez, M. J., Lorente, A., Grant, K. B., 2005. Tunable DNA Photocleavage by An Acridine-Imidazole Conjugate, *Inorg. Chem.,* 44: 6159-6173.

Wong, C.W., Li, B. F.L,. 1994. A Method for Locating O^6-Methylguanine Residues in DNA, *Nucleic Acids Res.,* 22: 882-883.

Wu, W., Vanderwall, D.E., Stubbe, J., Kozarich, J.W., Turner, C.J., 1994. Interaction of Co-Bleomycin A2 (green) with d(CCAGGCCTGG)2: Evidence for Intercalation Using 2D NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 10843-10844.

Wu, W., Vanderwall, D.E., Lui, S.M., Tang, X.J., Turner, C.J., Kozarich, J.W., Stubbe, J., 1996a. Solution Structure of Co·Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG), *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 1268-1280.

Wu, W., Vanderwall, D.E., Turner, C.J., Kozarich, J.W., Stubbe, J., 1996b. Solution Structure of Co·Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG), *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 1281-1294.

Yang, P. Yang, Q., Qian, X., 2005. Novel DNA Bis-Intercalators of Isoquinolino[4,5-bc]acridines: Design, Synthesis and Evaluation of Cytotoxic Activity, *Tetrahedron Lett*., 61: 11895-11901.

Zady, M.F., Wong, J.L., 1980. Unusual Competition Between Nitrogen and Carbon Methylation of Nucleosides by Methyl Radical in Various Aqueous Media, *J. Org. Chem.*, 45: 2373–2377.

Zhou, B.B.S., Elledge, S. J., 2000. The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective, *Nature*, 408: 433.

Zimmerman, S. C., Lamberson, C. R., Cory, M., Fairley, T. A., 1989. Topologically Constrained Bifunctional Intercalators: DNA Intercalation by A Macrocyclic Bisacridine, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 6805-6809.

Zwelling, L.A.,Michaels, S., Erickson, L.C.,Ungerleider, R.S., Nichols, M., Kohn, K.W., 1981. Protein-Associated Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks in L1210 Cells Treated with the Deoxyribonucleic Acid intercalating Agents 4'-(9- Acridinylamino)Methanesulfon-M-Anisidide and Adriamycin, *Biochemistry*, 20: 6553-6563.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	**:** Hayrettin DİNÇ
Doğum Tarihi	**:** 05.10.1986
Uyruğu	**:** T.C.
Doğum Yeri	**:** Tutak/AĞRI
Medeni Hali	**:** Bekar
Adres	**:** Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü 21280-Diyarbakır
E-Mail	**:** xero_01_21@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1992-Haziran 2004

İlkokul öğrenimimi Oğlaksuyu Köyü İlkokulunda, Ortaokulu 1. ve 2. sınıfı Tutak Y.İ.B.O. da son sınıfı Adana Şehit Duran İlköğretim Okulunda ve Lise eğitimimi Adana Anafartalar (Y.D.A.) Lisesinde tamamladım.

Eylül 2005-Temmuz 2010

Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünü (İngilizce hazırlıklı) bitirdim.

Eylül 2011-Mevcut Tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında **"Bis-Akridin Ligantlarının Sentezi, Yapısal Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi"** adlı Yüksek Lisans tezimi Prof. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında bitirdim.