

**ÇEŞİTLİ HİDRAZON TÜREVLERİ İLE
NÜKLEİK ASİTLERİN BAĞLANMA
MEKANİZMALARININ FLORİMETRİK
YÖNTEMLE İNCELENMESİ**

ŞULE ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. NURİYE AKBAY

2016

T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEŞİTLİ HİDRAZON TÜREVLERİ İLE NÜKLEİK ASİTLERİN
BAĞLANMA MEKANİZMALARININ FLORİMETRİK YÖNTEMLE
İNCELENMESİ**

ŞULE ÖZKAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİMDALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. NURİYE AKBAY

TEKİRDAĞ-2016

Her hakkı saklıdır.

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.10.AR.14.16 numaralı proje ve 114Z391 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Nuriye AKBAY danışmanlığında Şule ÖZKAN tarafından hazırlanan “ÇEŞİTLİ HİDRAZON TÜREVLERİ İLE NÜKLEİK ASİTLERİN BAĞLANMA MEKANİZMALARININ FLORİMETRİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Doç .Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Nuriye AKBAY *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Ayşe UZGÖREN BARAN *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ HİDRAZON TÜREVLERİ İLE NÜKLEİK ASİTLERİN BAĞLANMA MEKANİZMALARININ FLORİMETRİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ

Şule ÖZKAN

Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nuriye AKBAY

Floresans spektroskopisi günümüzde genetik incelemeler, klinik kimya, biyokimya ve moleküler biyofizikte en fazla kullanılan spektroskopik yöntemlerden bir tanesidir. Biyomoleküllerin ve biyomoleküler komplekslerin gerek yapısal gerekse dinamik özelliklerindeki değişikliklere olan hızlı duyarlılığı nedeni ile bu tekniğin popüleritesi hızla artmaktadır. Floresan probalar floresans spektroskopisinde önemli bir alanı işgal eder. Bu çalışmada hidrazon türevi bir floresan probun çift sarmal DNA (*ct*-DNA) ile etkileşimleri floresans izleme ve UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile incelendi. Çalışmada hidrazon türevinin (AN1) sentezi ve *ct*-DNA ile bağlanma türü incelendi. Stern-Volmer sönüm sabitleri, bağlanma sabitleri, bağlanma kısım sayıları ve ΔH , ΔS ve ΔG gibi ilgili termodinamik parametreler çeşitli sıcaklıklarda hesaplandı. Sonuçlar AN1-*ct*-DNA kompleksinin oluştuğunu ve AN1 kompleksi için elektrostatik etkileşimin baskın tür olduğunu gösterdi. Absorpsiyon, iyonik şiddet ve iyodür iyonu ile sönüm çalışmalarından elde edilen sonuçlar AN1'in *ct*-DNA ile bağlanma türünün oluğa tutunma olduğunu gösterdi. **Anahtar kelimeler:** Stern-Volmer eşitliği, hidrazon boyaları, floresans sönümü, oluğa tutunma

Yıl , 35 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF BINDING MECHANISMS OF VARIOUS HYDRAZONE DERIVATIVES WITH NUCLEIC ACIDS BY FLUORIMETRIC METHODS

Şule ÖZKAN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Nuriye AKBAY

Fluorescence spectroscopy is one of the most widely used spectroscopic techniques in the fields of gene expression, clinical chemistry, biochemistry and molecular biophysics today. The technique has become quite popular because of its acute sensitivity to changes in the structural and dynamic properties of biomolecules and biomolecular complexes. Fluorescent probes constitute an important field in fluorescence spectroscopy. In this thesis, interaction of the hydrazone derivative used as fluorescent probe with double stranded DNA (*ct*-DNA) was investigated using fluorescence sensing and UV-visible absorption spectra. In this study, we reported the syntheses and investigation of the modes of binding to *ct*-DNA of hydrazone derivative (coded as AN1). The Stern-Volmer quenching constant, binding constant, binding sites and the corresponding thermodynamic parameters ΔH , ΔS and ΔG were calculated at different temperatures. The results indicated the formation of AN1-*ct*-DNA complex and electrostatic interactions are the predominant intermolecular forces for AN1 complex. The results of absorption, ionic strength and iodide ion quenching suggested that the interaction mode of AN1 with *ct*-DNA was groove binding.

Key words: *Stern-Volmer* equation, hydrazone dyes, fluorescence quenching, Groove binding

Yıl , 35 pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Floresans Emisyonuna Etki Eden Faktörler	5
2.1.1. Yapısal faktörler	5
2.1.2. Moleküler katılık	6
2.1.3. Sıcaklık ve viskozite etkisi	6
2.1.4. Çözücü ve pH etkisi.....	6
2.1.5. Çözünmüş oksijen, paramanyetikler ve ağır atomlar	7
2.2. Floresans Sönüm	7
2.3. Floresan Maddeler	8
2.4. Nükleik Asitler ve Özellikleri.....	8
2.5. DNA'nın Floresan Uçlarla Bağlanma Özellikleri	11
2.6. Hidrazonlar	14
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	16
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	16
3.2. Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanması	16
3.3. N'-(2-hydroxybenzylidene)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-3-carbohydrazide Sentezi	17
3.4. Yöntem	19
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Floresans Sönüm Çalışmaları	20
4.2. Bağlanma Dengelerinin Analizi	23
4.3. Absorpsiyon Çalışmaları	24
4.4. İyodür İyonu Sönüm Çalışmaları	25
4.5. Sodyum Klorür Sönüm Çalışmaları	27

4.6. Termodinamik parametreler ve etkileşim türleri	28
değerler	29
5. SONUÇLAR.....	30
6. KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ	35

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4. 1. Hidrazon türevi-DNA sistemi için Stern-Volmer verileri	22
Çizelge 4. 2. Hidrazon türevi-DNA sistemi için bağlanma sabiti K ve bağlanma kısım sayısı, n, değerleri.....	24
Çizelge 4.3. AN1- <i>ct</i> -DNA sistemi için van't Hoff eşitliğinden hesaplanan termodinamik değerler.....	29

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fotolüminesans bir sistem için kısmi enerji-düzey diyagramı	4
Şekil 2.2. Nükleik asiti oluşturan kısımlar	9
Şekil 2.3. Watson – Crick modeli DNA çift sarmal yapısı.....	10
Şekil 2.4. DNA'nın kopyalanması.....	11
Şekil.2.5. Oluklara bağlanma	13
Şekil 2.6. İnterkelasyon	14
Şekil 2.7. Hidrazon yapısı	14
Şekil 3.1. N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit sentezlenme şeması	17
Şekil 3.2 N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid'in IR spektrumu	18
Şekil 3.3 N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid'in 1H-NMR spektrumu	18
Şekil 4.1. AN1 hidrazon türevinin floresans emisyon şiddetine ct-DNA çözeltisinin oda sıcaklığında etkisini gösteren spektrum	21
Şekil 4.2. 25, 37 45°C'lerde N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid'in ct-DNA ile titrasyonundan elde edilen Stern-Volmer grafiği.....	22
Şekil 4.3. 25, 37,45°C'lerde N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid'in ct-DNA ile titrasyonundan elde edilen çift-log grafikleri.....	23
Şekil 4.4. N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid'in - DNA ile etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları	24
Şekil 4.5. AN1-ct-DNA sisteminin KI varlığında floresans emisyon spektrumu	26
Şekil 4.6. Serbest AN1 ve AN1-ct-DNA sisteminin iyodür sönümünden elde edilen Stern-Volmer grafikleri.....	26
Şekil 4.7. AN1-ct-DNA sisteminin NaCl varlığında floresans emisyon spektrumu	27
Şekil 4.8. AN1-ct-DNA sisteminden elde edilen van't Hoff grafiği	28

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, zamanını ve desteğini esirgemeyen; bilimsel, akademik ve insani kimliğiyle örnek aldığım saygı değer hocam Doç. Dr. Nuriye AKBAY'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit maddesinin eldesinde emeği geçen Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe Uzgören Baran'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmama maddi destekleri ve burs desteği için NKÜ Bireysel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2015

Şule ÖZKAN

1. GİRİŞ

Nükleik asitlerin nicel analizleri moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve tıbbi teşhis başta olmak üzere birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Nükleik asitlerin geometrileri yani sarmal yapısı ve boşlukları, içerdiği baz çiftleri; bazı organik ve inorganik iyonik türlere seçimli bağlanmalarını veya bu türleri yapının içine almalarını sağlar. Özellikle nükleik asitlerin metal iyonları, kompleksler, küçük organik moleküller ve proteinler gibi çeşitli kimyasal türler ile tersinir etkileşimleri; nükleik asitlerin yapısal değişimlerinin incelenmesi, kemoterapik ilaçların geliştirilmesi ve nükleik asitlerin bağlanma özelliklerinin incelenmesinde kullanılır. Son yıllarda nükleik asitlerin tayini için birçok yöntem önerilmiş olmasına rağmen hala hızlı, hassas, basit ve uygulanabilirliği kolay analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kararlı kimyasal yapıya sahip DNA kullanılarak, nükleik asitlerin tayini için uygun analitik yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Son 20 yıl içerisinde DNA çalışmalarında florimetrik yöntemler oldukça ilgi çekmektedir.

Floresan probalar (boyar madde, prob diğer kullanılan isimlendirmeler) floresans özellik göstermeyen veya az gösteren biyomoleküle bağlandığında, ona floresans özellik kazandırır veya spektral özelliğini değiştirir ve biyomolekülün yapı ve fonksiyonlarının incelenmesine, izlenmesine olanak sağlar. Bu uçlar, protein, nükleik asit, hormon, büyüme faktörü vb. gibi birçok biyomoleküllerle etkileşerek bu türlerin yapı ve fonksiyonlarının incelenmesine olanak sağlarlar.

DNA oldukça düşük şiddetli floresans emisyonuna sahiptir ve spektral özelliklerinin doğrudan incelenmesi çok zordur. Bu nedenle DNA tayini için; DNA ile etkileşen ve floresans emisyonunda değişikliğin izlenmesine neden olan *floresant probalar* örneğin floresan boyar maddeler, metal iyonları ve metal kompleksleri kullanılmaktadır. Hidrazon bileşikleri, antifungaldan antikansere birçok ilacın temel iskelet yapısında yer almaları nedeni ile floresan prob olarak kullanılma ihtimalleri ilgi çekicidir. Literatürde tetrahidrokarbazol yapısına sahip hidrazon türevlerinin muhtemel biyolojik aktiviteye sahip olabilecekleri düşünülmüş ve bu türevler sentezlenmiştir. Elde edilen sonuçlar antimikrobiyal aktivitelerinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Bu türevler incelendiğinde tetrahidrokarbazol yapısının azot atomu üzerinden türevlendirme yapıldığı görülmektedir. Biyolojik aktif doğal ürünler incelendiğinde ise bu yapıların sahip olduğu azot atomunun serbest olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada tetrahidrokarbazol yapısının azot atomunu doğal ürünlerin yapısında olduğu gibi serbest bırakarak aktiviteleri daha yüksek yeni hidrazon türevinin eldesi ve bu potansiyel ilaç hammaddesinin nükleik asitler ile etkileşimlerini floresans ve UV-Gr spektroskopilerinden faydalanarak aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Çeşitli şekillerde enerji absorplayarak elektronik olarak uyarılmış bir molekülün, temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışımaya enerjisi halinde geri vermesi olayına **lüminesans** denir. Lüminesans uyarılma esnasında kullanılan enerjinin kaynağına göre sınıflandırılır (Valuer 2002).

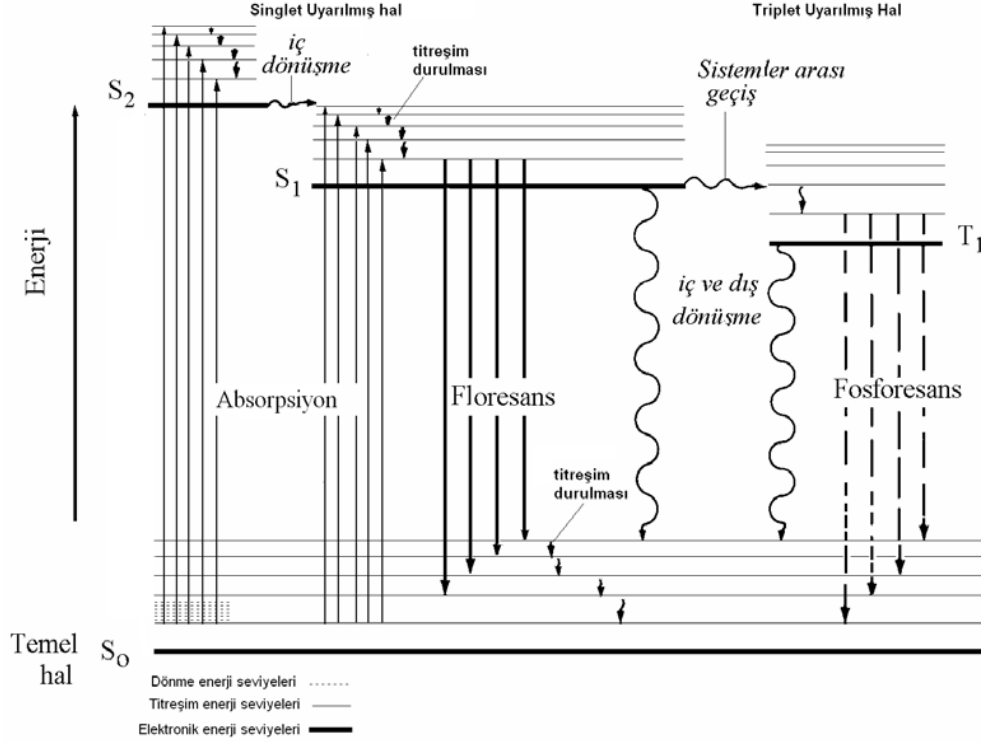
Lüminesans türü	Uyarılma şekli
Fotolüminesans (floresans ve fosforesans)	Işığın absorpsiyonu
Radiolüminesans	Işımalı iyonlaşma (x-ray, α , β , γ)
Elektrolüminesans	Elektriksel alan
Kemilüminesans	Kimyasal işlem
Biyolüminesans	Biyokimyasal işlem

Fotolüminesans, foton absorpsiyonu ile uyarılma sağlanması sonucu gözlenen floresans ve fosforesans olaylarının tamamı için kullanılan genel bir terimdir. Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **floresans** denir. Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa ise **fosforesans** denir. Analit yapısının nicel ve nitel analizinde absorpsiyon yöntemlerine göre daha duyarlı ve bilgi verici olması nedeniyle özellikle floresans yöntemler yaygın kullanıma sahiptir.

Şekil 2.1' de verilen *Jablonski* diyagramında görüldüğü gibi, ışık absorpsiyonu sonucu oluşan uyarılmış bir molekül fazla enerjisini tamamen veya kısmen ışımasız yoldan atabilir. Bir molekülün elektronik enerji düzeyleri, titreşim enerji düzeylerinin üst üste çakışmasına olanak sağlayacak kadar yakın ise, iki uyarılmış singlet enerji düzeyi için gösterilen ve fazla enerjinin ısı şeklinde atıldığı *iç dönüşüm* olayı gerçekleşir.

Uyarılmış singlet türü bir molekülden yine ışımasız yoldan daha düşük enerjili triplet türü uyarılmış bir molekül oluşabilir. Olasılığı oldukça az olan ve bu nedenle yavaş bir

biçimde gerçekleşen bu olayda üst orbitaldeki elektronun spini ters çevrilir. Bu olaya *sistemler arası geçiş* denir.



Şekil 2.1. Fotolüminesans bir sistem için kısmi enerji-düzey diyagramı

Floresans olayında yayılan ışığın frekansı birbirine eşit ise buna *rezonans floresans* denir. Rezonans floresans olayı atomlarda ve katı haldeki moleküllerde gözlenir. Çözeltide oluşan uyarılmış moleküller ise, fazla enerjilerinin bir kısmından ışımasız yoldan kurtuldukları için bunlarda gözlenen floresansın dalga boyu, molekülü uyaran fotonların dalga boylarından daha uzundur. Fosforesans olayında gözlenen dalgaboyları ise, floresans olayında gözlenen dalgaboylarından daha uzundur.

Bazı moleküler yapılarda floresans veya fosforesans bantları uzun dalga boylarında veya düşük enerjide meydana gelir. Çözelti ortamından izlenen bu olay *stokes kayması* olarak ifade edilir.

Işık absorpsiyonu için 10^{-15} s gibi çok kısa bir süre gerekir ve uyarılmış singlet halde bulunan bir molekülün ömrü 10^{-6} - 10^{-10} s, uyarılmış triplet halde bulunan bir molekülün ömrü

ise 10^{-2} - 10^{-6} s'dir. İç dönüşüm ve sistemler arası geçiş olaylarının süreleri ise, sırasıyla, yaklaşık 10^{-12} s ve 10^{-8} s'dir. Floresans olayı sistemi uyaran ışığa ortadan kalkınca 10^{-6} - 10^{-10} s kadar daha sürerken, böyle bir durumda fosforesans 10^{-2} - 10^{-6} s kadar daha devam eder.

Fotoluminesans kuantum verimi, basit olarak yayılan foton sayısının absorplanan foton sayısına oranı olarak tanımlanır. Floresein gibi bazı moleküllerin floresans kuantum verimleri bire yaklaşıp.

Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan tayin metoduna **floresans spektroskopisi** denir. Floresans spektroskopisi, bazı yönleri ile absorpsiyon spektroskopisine benzemekle beraber duyarlılık yönünden ondan çok üstündür. Bu metotla birçok madde, milyonda birin altında bir hassaslıkla tayin edilebilir. Florimetrik metotların seçiciliği de yüksektir. Floresans spektroskopisi organik kimya, biyokimya, biyofizik, çevre ile ilgili çalışmalar, klinik kimya, DNA zinciri ile ilgili çalışmalar ve genetik analizler gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Lakowicz 1999).

2.1. Floresans Emisyonuna Etki Eden Faktörler

2.1.1. Yapısal faktörler

Basit alifatik yapılu bileşikler soğurdukları enerjiyi ışın yaymaksızın harcarlar ve floresans göstermezler. Ketonlar, aldehitler, karboksilli asitler, amitler, esterler gibi π bağlı hetero atom içeren bileşikler az floresans gösterirler. Polienler ve aromatik bileşikler ve türevleri ise floresans gösteren bileşiklerdir. Özellikle bunların düzlemsel ve katı yapıda olanlarının floresans etkinliği yüksektir. Benzenin kendisi zayıf floresans gösterir. Benzen halkasının süstitüsüyonu floresans olumlu ya da olumsuz etkiler. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin olduğu bileşikler floresans özellik gösterirken, $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin baskın olduğu moleküllerde ise fosforesans özellik görülmektedir.

-OH, -OR, -NH₂, NHR, -NR₂ gibi Elektron verici süstitüentlerin floresans emisyon şiddeti üzerine etkisi olmaz veya şiddeti arttırırlar.-COOH, -NO, -RCO, RHO,-N=N,-Br ,-Cl gibi elektron çekici gruplar ise floresans emisyon şiddetinde azalmaya neden olur.

2.1.2. Moleküler katılık

Moleküler katılık (rijidite), hareket serbestliğini azalttığından sistemler arası geçişler ve moleküller arası çarpışmalar gibi ışımsız geçiş olasılıkları azaltır.

Örneğin; Fluoresein çözelti içinde kuvvetli floresans göstermesine karşılık moleküler katılık göstermeyen fenolftaleinin böyle bir özelliği yoktur. Metal iyonları ile ketal oluşturmada titreşimleri azaltan moleküler katılık saptandığından floresansı artırır. Örneğin; alüminyum ile ketal oluşturmadan önce naftalen grupları azo grubu etrafında serbestçe dönebilmektedir. Ketal oluşumundan sonra molekül düzlemsel ve katı bir duruma geçer.

2.1.3. Sıcaklık ve viskozite etkisi

Sıcaklığın artması ve çözücünün viskozitesinin azalması, uyarılmış molekül ile diğer moleküllerin çarpışması ve ayrıca sistemler arası geçiş olasılıklarını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli ortamda ise dinlenme zamanı uyarılmış durumun ömründen daha uzun olmakta ve floresans artmaktadır.

2.1.4. Çözücü ve pH etkisi

Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumdaki moleküller ile H bağı oluşturmaları temel hale ışımsız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azalma olur. -OH, -COOH, -NH₂ bağı oluşturabilecek gruplar içeren maddelerin analizinde çözücü seçimine dikkat edilmelidir. Bir veya daha çok sayıda ağır atom içeren çözücüler, sistemler arası geçiş olasılığını arttırdıklarından floresansı azaltırlar.

Asidik ve bazik grup içeren bir bileşiğin floresansı ortamın pH'ına bağlıdır. Örneğin; nötr ortamda fenol floresans gösterirken, bazik ortamda floresans etki göstermeyen anyonuna dönüşür. Anilin, nötr ve bazik ortamda iken görünür alanda floresans gösterir. Çözelti asitlendirildiğinde bu floresans kaybolur. Bu şekilde ortamın pH'ına bağlı olarak floresans gösterebilen asit-baz titrasyonlarında indikatör olarak yararlanılabilir.

2.1.5. Çözünmüş oksijen, paramanyetikler ve ağır atomlar

Floresans gösteren bir çözeltinin floresans şiddeti, çözünmüş halde bulunan oksijenin etkisi ile azalır. Bu etki organik maddenin fotokimyasal yolla oksitlenmesi sonucu olabileceği gibi; oksijenin paramanyetik yapısı da bu duruma neden olabilir. Oksijenin paramanyetik özelliği nedeni ile uyarılmış durumdaki moleküllerin sistemler arası geçişleri ve triplet duruma geçişleri artar. Bu geçişlerin sonucu olarak floresans emisyonu azalır. Oksijen dışında Fe^{+3} , CO^{+2} , Cu^{+2} , gibi paramanyetik ve dış d orbitalleri dolmamış geçiş elementlerinin de floresans sönümüne neden olduğu bilinmektedir.

2.2. Floresans Sönüm

Bir molekülün floresans şiddetinde sönüm uyarılmış enerji düzeyi reaksiyonları, moleküler oryantasyon değişiklikleri, enerji transferleri, temel hal kompleks oluşumu ve çarpışmalı sönüm gibi çok çeşitli moleküler etkileşimler sonucu gerçekleşebilir. Floresans sönüm, mekanizmasına göre genellikle *statik* veya *dinamik* olarak sınıflandırılır. Etkileşimin hangi sınıfa ait olduğu farklı sıcaklıklarda yapılan floresans ölçümlerine göre belirlenir. Dinamik sönüm moleküler difüzyona bağlıdır. Genellikle yüksek sıcaklıklarda daha büyük difüzyon katsayıları elde edilir. Bu nedenle sıcaklık artışı ile beraber biyomoleküler sönüm sabitinde de artış beklenir. Buna karşılık statik sönümlerde sıcaklık artışı ile beraber komplekslerin kararlılıkları azalacağı için yüksek sıcaklıklarda düşük sönüm sabitleri elde edilir. Floresans sönüm verileri *Stern-Volmer* eşitliği ile incelenir (Lakowicz, 2006),

$$F_0 / F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q]$$

F_0 ve F , floresan maddenin sırası ile söndürücü yokluğunda ve varlığındaki floresans şiddetlerini gösterir. $[Q]$ söndürücü madde derşimidir. K_{sv} Stern-Volmer sönüm sabiti, k_q biyomolekül sönüm hız sabiti, τ_0 ise ortamda söndürücü molekül yokken floresan molekülün ortalama ömrüdür.

2.3. Floresan Maddeler

Floresan madde veya floresan uçlar, floresans spektroskopisi için önemli bir alan oluştururlar. Biyoanalitik uygulamalarda, immüno florimetrik tekniklerde ve biyomolekül işaretleme çalışmalarında oldukça sık kullanılan maddelerdir.

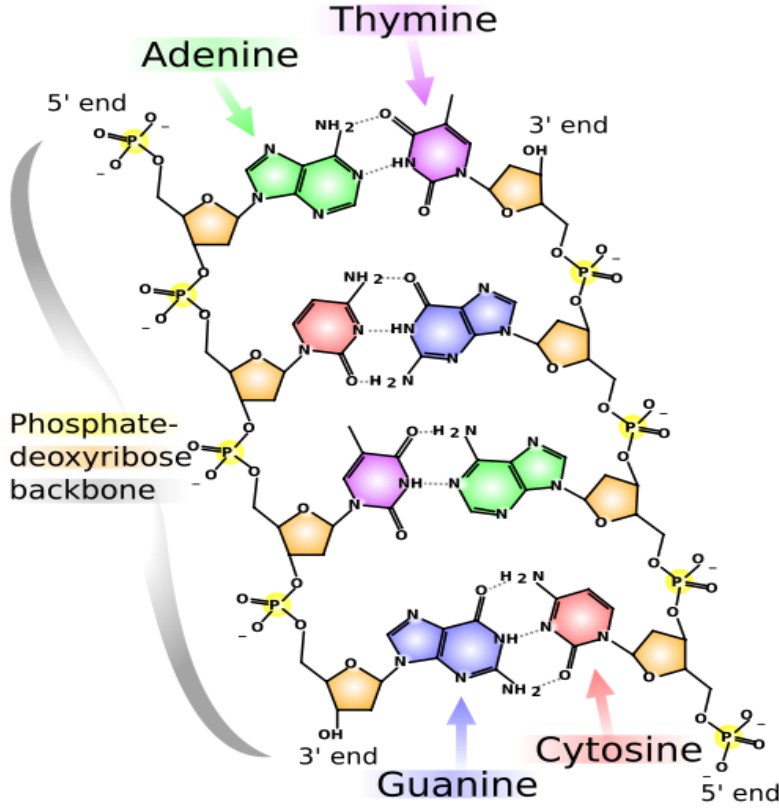
Floresan uçlar floresans özellik göstermeyen veya floresans özelliği düşük olan biyomoleküllere bağlandıklarında, onlara floresans özellik kazandırılarak veya spektral özelliklerini değiştirerek biyomolekülün yapı ve fonksiyonlarının florimetrik yöntemlerle incelenmesine olanak sağlar. Bu işleme **işaretleme (labeling)** denir. Bu uçlar, protein, nükleik asit, hormon, büyüme faktörü vb. gibi birçok biyomolekülle kovalent olarak bağlanarak bu türlerin yapı ve fonksiyonlarının incelenmesine olanak sağlarlar. Elde edilen veriler patoloji, parasitoloji, klinik teşhis sonuçlarında kullanılabilir. Floresan uçlar genel olarak iki gruba ayrılırlar:

- **İntrinsik (iç veya doğal) floroforlar:** Bunlar doğal floresan maddelerdir. Aromatik aminoasitler, flavinler, klorofil türevleri gibi bileşikler. Floresans özellikleri yapılarında bulunan triptofan (trp), tirozin (try), fenilalanin (phe) gibi aromatik aminoasitlerden kaynaklanır.
- **Ekstrinsik (dış) uçlar:** Floresans özellik göstermeyen ya da floresans özelliği denemeler için yeterli olmayan moleküllere bağlanıp, bağlandığı molekülün incelenmesine imkan sağlayan floroforlardır. Dansil klorür, floresein, kumarin, rodamin ve çeşitli bileşikler bu gruba girerler.

2.4. Nükleik Asitler ve Özellikleri

Canlı organizmaların yaklaşık % 99'unu lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve su oluşturur. Geriye kalan % 1'lik kısmını oluşturan bileşiklerden nükleik asitler, genetik bilgi aktarımını sağlayan taşıyıcılardır. Nükleik asitler, nükleotid denilen birimlerden oluşan polimerlerdir. Nükleotid birimlerinin her biri ise üç bölümden oluşur:

1. Bir azotlu heterosiklik purin (adenin, A; guanin, G) veya pirimidin baz (timin, T; sitozin, C; urasil, U),
2. Beş karbonlu pentoz şeker,
3. Bir fosfat grubu.



Şekil 2.2. Nükleik asiti oluşturan kısımlar

Azotlu bazlar: Pürin ve pirimidin bazları olmak üzere 2 çeşittir. Pürinler (Adenin (A), Guanin (G)) biri 6, diğeri 5 atomdan oluşan iki halkasal yapının kaynaşmasından oluşurken, pirimidinler (Urasil (U), Timin (T), Sitozin (C)) 6 üyeli tek bir halkadan meydana gelir. DNA yapısında A, G, C, T bazları yer alırken, RNA'da A, G, C, U bazları bulunur.

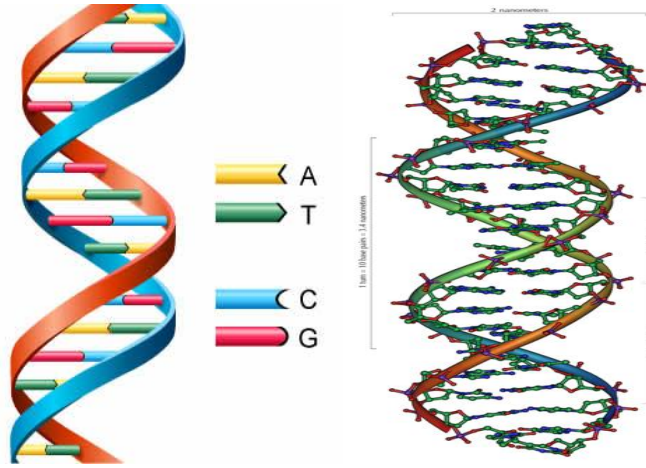
Pentoz şekeri: Nükleotidlerdeki pentozlar, D-riboz ve 2-deoksiribozdur. Bir pürin veya pirimidin bazının riboz veya deoksiriboz şekerinin 1. karbonuna bağlanması ile nükleozitler meydana gelmektedir. Bazların riboz şekerine bağlanması ile ribonükleozitler, deoksiriboz şekerine bağlanması ile de deoksiribonükleozitler ortaya çıkmaktadır.

Fosfat: Bu grup şekerin 5' karbonuna ester bağı ile bağlı bulunmaktadır. Eğer birden fazla fosfat grubu söz konusu ise bunlar birbirine yüksek enerjili asit anhidrit bağı ile bağlanırlar.

Nükleik asitler, DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) olmak üzere iki gruba ayrılır. DNA hücre çekirdeği içinde, protein içerikli kromozomlardan oluşur.

Kromozomların spesifik yerleşmesi ile kalıtım özelliklerini kuşaktan kuşağa taşıyan genler oluşur. DNA ve RNA her ikisi de fosfat grubu içerir, ancak içerdikleri azotlu bazlarda ve şeker yapısında farklılık vardır. DNA, 2-deoksiriboz ve A, G, C, T; RNA ise riboz ve A, G, C, U bazlarını içerir. Nükleik asitler tek bir zincirden oluşabildikleri gibi birbirine sarılmış iki zincirden de oluşabilirler (Lakowicz 2006, Goransson 2005).

Organizmanın genetik bilgisini içeren ve kalıtımda rol oynayan organik bir molekül olan DNA'nın yapısını Watson ve Crick adlı araştırmacılar 1953 yılında hazırladıkları modeller üzerine açıklamaya çalışmışlardır. Buna göre DNA molekülü, sarmal şeklinde kıvrılmış, iki kollu bir ip merdivenine benzemektedir (Şekil 2.3). Çift zincirli sarmal molekülün iki zinciri, pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan **hidrojen bağları** tarafından bir arada tutulmaktadır (Sinden 1994).



Şekil 2.3. Watson – Crick modeli DNA çift sarmal yapısı

1940'ların sonunda Chargeff ve arkadaşlarının bulduğu dört bazın DNA'da farklı sıralamalarda bulunması, organizma farklılıklarıyla yakından ilişkilidir. Bu bilgiler çok sayıda farklı türlerin DNA'larından elde edilmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

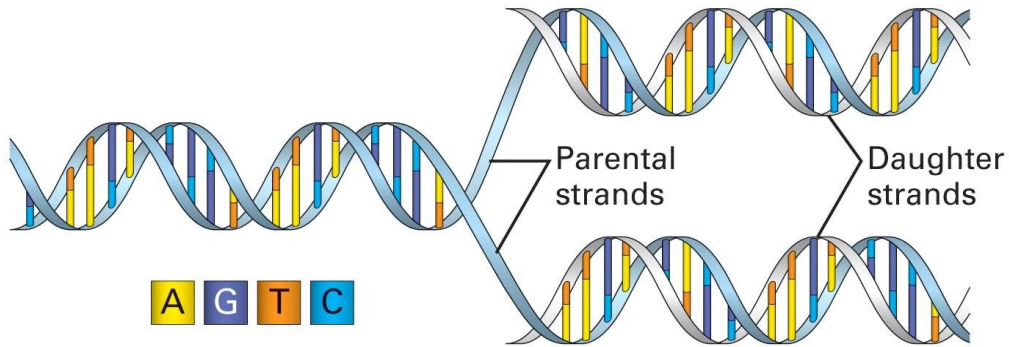
1. DNA'daki baz sıralaması bir türden diğerine değişiklik gösterir.
2. Farklı dokulardan izole edilmiş aynı türlerin DNA örnekleri aynı baz sıralamasına sahiptir.
3. Belirli bir türün baz bileşimi; organizmanın yaşı, beslenme durumu ya da çevresel şartlara göre değişmez.

4. Bütün DNA hücrelerinde tür ne olursa olsun

- Adenin miktarı timin miktarına ($A=T$)
- Guanin miktarı sitozin miktarına ($G=C$)
- Purin bazları toplamı pirimidin bazları toplamına ($G+A=C+T$) eşittir (Lehninger 2005).

İki sarmal yapısını koruyabilmek için, iki şerit arasında hidrojen bağı oluşumu ancak şeritlerden birindeki A'nın diğer şeritteki T'ye, ya da G'nin C'ye karşılık geldiği durumlarda olasıdır.

DNA moleküllerinin kopyalanabilme yeteneği vardır. Yani kendilerinin tam kopyalarını yapabilirler. Bir DNA molekülünün kopyalanmasında kritik basamak, molekülün şeritlere açılmasıdır. Açılma olurken, hücre çekirdeğindeki serbest nükleotitler, iki tek şeridin açılmış kısımların bağlanır (Şekil 2.4). Her biri, bir eski bir yeni şerit içeren yeni bir DNA ikili sarmalı oluşturur.



Şekil 2.4. DNA'nın kopyalanması

2.5. DNA'nın Floresan Uçlarla Bağlanma Özellikleri

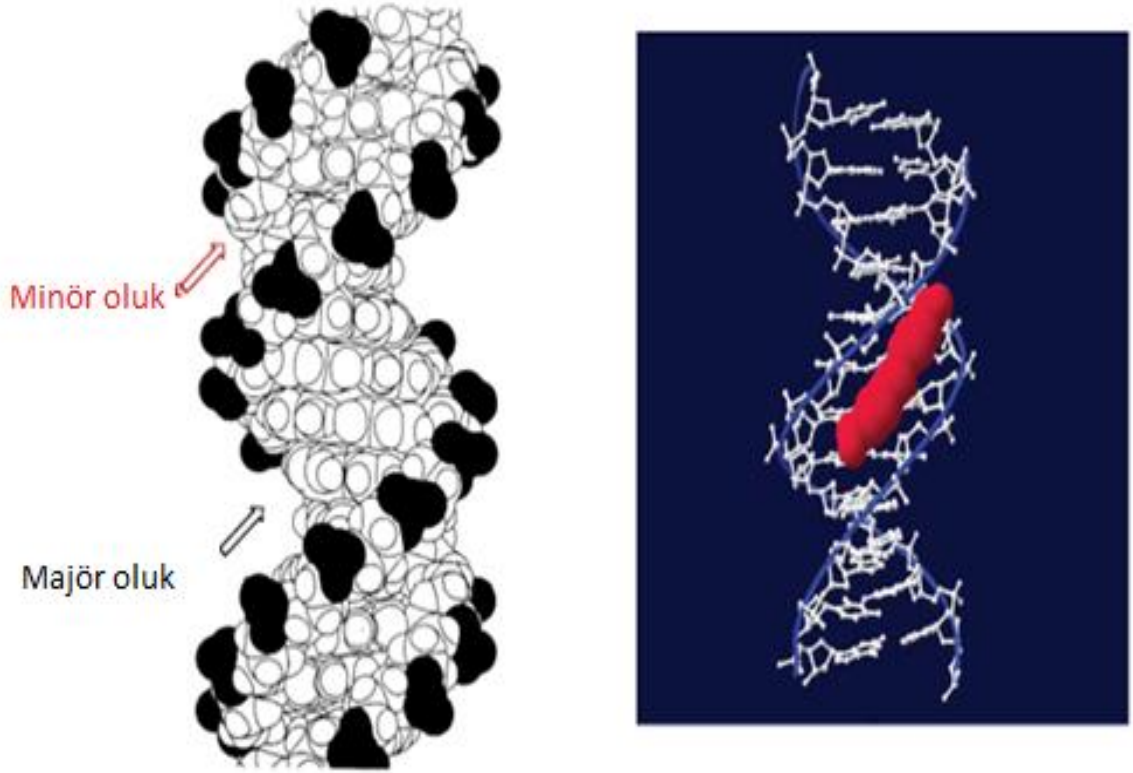
Başta DNA olmak üzere literatürde nükleik asit tayini için spektrofotometri, kemiluminesans (Ding 2008), ışık saçılması, elektrokimya ve kromatografi gibi birçok yöntem önerilmiştir. Bununla birlikte, florimetrik yöntemlerle yapılan çalışmalarda büyük bir artış görülmektedir (Cao 1999, Zhou 2004, Hu 2007, Li 2007). Nükleik asitlerin doğal floresans şiddetinin çok düşük olması nedeni ile floresans emisyonlarının doğrudan kullanılması sınırlıdır. Dolayısıyla, florimetrik nükleik asit çalışmalarında floresan uçların kullanılması gerekmektedir (Haugland 2002).

DNA'nın bağlanma türleri: DNA'ya bağlanma türleri üç grup altında incelenebilir Bu etkileşimler bağlanan türün geometrisine, büyüklüğüne ve stereokimyasal özelliklerine bağlıdır (Vijayalakshmi ve ark. 2006).

Elektrostatik etkileşimler: DNA çift sarmalının dış yüzeyi boyunca gözlenir. DNA sarmalı hem yapısını hem de fonksiyonlarını etkileyen negatif yüklü fosfat grupları içermektedir. Floresan madde çift sarmala dış bağlanma ile bağlandığında genellikle karşı iyonları uzaklaştırır (Manning 1978, Strekowski ve Wilson 2007). Pozitif yüklü iyonlar, DNA'nın negatif yüklü büyük bir kısmının nötrale olmasını sağlarlar. Organik katyonların DNA ile etkileşimi sonucu fosfat yükü nötr hale gelir ve karşıt iyonlar serbest kalır. Bunun sonucunda DNA yapısında değişim meydana gelebilir. DNA ile güçlü bir şekilde bağlanması beklenen küçük moleküllerin yapılarında katyonik bileşenler içermeleri gerekir. Bu tür moleküller, ortamda tuz derişiminin azalması ile DNA'ya daha fazla bağlanma gösterirler (Strekowski ve Wilson 2007). Bu tür etkileşimler genellikle seçici değildir.

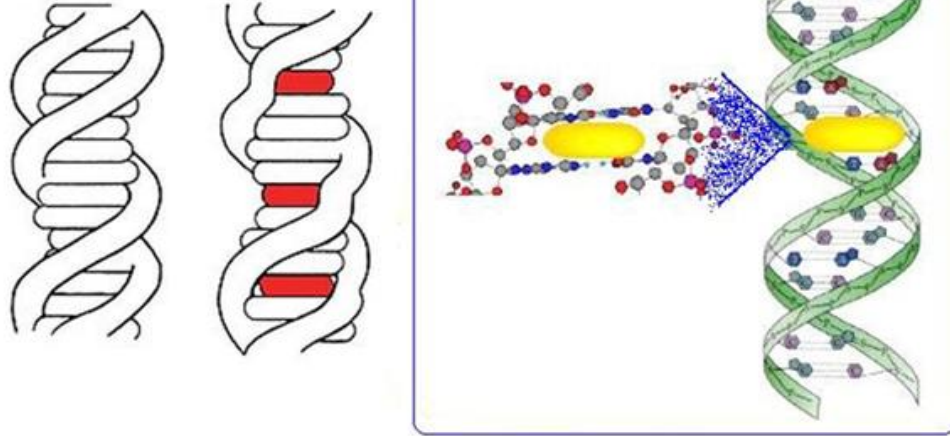
Oluklara bağlanma: Oluklara bağlanma, nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan yüzeydeki fonksiyonel grupları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimi şeklinde gerçekleşir (Blackburn GM, Gait MJ 1996). Oluklara bağlanan moleküller, genellikle A ve T seçiciliği gösterenlerdir. Bunun nedeni A-T bölgelerinin G-C bölgelerinden daha dar olması, bu bölgede daha az sterik engel ve daha fazla elektrostatik potansiyelin olmasıdır (İçsel 2013).

Oluğa bağlanma oldukça güçlü bir bağlanma çeşididir ve bu bağlanma molekül, DNA'nın oluklarının birine uygun büyüklük ve şekilde ise gerçekleşir (Neidle 2001). İnterelasyon ile bağlanan yapılardan farklı olarak, oluklara bağlananlar, DNA yapısında belirgin bir değişime neden olmaz. Küçük oluklara bağlanan moleküller, genellikle olukların şeklini alacak şekilde (yarım ay) etkileşim gösterirler.



Şekil.2.5. Oluklara bağlanma

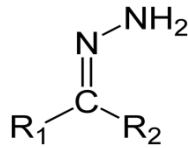
İnterkelasyon: İnterkelasyon, düzlemsel halka sistemine sahip olan bazı moleküllerin DNA baz çiftleri arasına yerleşerek güçlü bir şekilde bağlanması olarak ifade edilmektedir (Psomas 2008). Bağlanan molekül ve baz çiftleri arasında van der Waals kuvvetleri etkindir. İnterkelasyon yapan moleküller DNA’da güçlü yapısal bozukluklara neden olmaktadır. Bu bileşikler, DNA’nın çift sarmal yapısını bozmaktadır. İnterkelasyonun gerçekleştiği bölgede baz çiftleri arasındaki bükülme açısı azalır ve biyopolimerin uzunluğu artar. Bu etki interkelasyon yapan molekülün uzaklaştırılması ile ortadan kaldırılabilir (Lerman 1963).



Şekil 2.6. İnterkelasyon

2.6. Hidrazonlar

Hidrazonlar, aldehit ve keton sınıfından $R_1R_2C = NNH_2$ yapısı içeren organik bileşiklerdir (Uppal 2011). Bu bileşikler; antimikrobiyal, anti-inflamatuar, analjezik, anti-fungal, anti-tüberküloz, anti-viral, anti-kanser gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özellikler gösterirler (Rollas 2007). Literatürde azometin $-NHN = CH-$ yapısını bulunduran birçok hidrazon bileşikler sentezlenmiş ve bu yapıların antimikrobiyal aktiflikleri tayin edilmiştir (Nakka 2011). Hidrazon yapısında triazol içeren Schiff bazı, bunlara örnek verilebilir. Bu bileşiğin patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktifliği tayin edilmiştir (Nakka 2010).



Şekil 2.7. Hidrazon yapısı

Hidrazonlar farklı kimyasal çevreye sahip iki azot atomu ve terminal azot atomunun eşlenmemiş elektron çifti ile konjuge olmuş $C = N$ çift bağı içerirler (Narang 2012). Hidrazon yapısında bulunan her iki azot atomu da nukleofilik özellik gösterir fakat amino yapısında

bulunan azot atomu daha reaktiftir. Hidrazon grubunun karbon atomu hem elektrofilik hem de nükleofilik özelliğe sahiptir.

Organik kimyacıların vurguladığı diğer bir biyolojik aktif grup ise tetrahidrokarbazol yapılarıdır. Tetrahidrokarbazol yapısı, birçok biyolojik aktif doğal ürünün yapısında bulunmaktadır. Bu bileşiklerin anti-kanser etkileri incelendiğinde oldukça yüksek aktifliğe sahip oldukları görülmüştür. Son yıllarda DNA'ya küçük moleküllerin bağlama çalışmalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Gurova (2009)'nın yaptığı çalışmada anti-kanser özelliğe sahip küçük moleküllerin anti-kanser ilaç geliştirme için ön şart olduğu, DNA'nın bu moleküllere bağlanma şeklinde seçicilik gösterdiği ortaya konmuştur. DNA'nın yapısını değiştirmeden DNA'ya bağlanabilen küçük moleküllerin tasarımı onkolojik çalışmalar için gereklidir ve kanser tedavisinde güvenli ve etkili bir yaklaşım sunabilir.

Antioksidan özellik taşıyan, 6-hidroksi kromon-3-karbaldehit-(20-hidroksi) benzol hidrazon'un floresans ve viskozite ölçümleri alınmış, DNA ile bağlanma çalışması florimetrik yöntemle incelenmiştir. Florimetrik titrasyon ile sönüm çalışması yapılmış, F_0/F -Derişim grafikleri çizilip Ksv değerleri bulunmuştur. Elde edilen veriler yorumlanarak molekülün DNA'ya interkelyasyon ile bağlı olduğu ve sistematik çalışmaya uygun olduğu gözlenmiştir (Li 2010).

Diğer bir çalışmada, çeşitli hidrazon türevleri sentezlenmiş ve DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Aldehit ile modifiye edilmiş hidrazin türevlerinin ilgi çekici spektral özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Hidrazonlar DNA ile hızlı reaksiyona girdiğinden ve DNA'ya seçimli olarak bağlandığından yapılacak sönüm çalışmalarında hidrazonların avantajlı olduğu anlaşılmıştır (Cristalli 2012).

Li ve ark. (2006) diğer bir çalışmasında 2 farklı hidrazon kompleksi sentezlenmiştir. Bu iki türevin elektronik absorpsiyon titrasyon spektrumu, floresans spektrumu EtBr ile yarışmalı bağlanma çalışması ve viskozite ölçümleri alınarak, hidrazonlarla DNA'nın muhtemel bağlanma şekilleri (oluğa bağlanma, interkelyasyon) araştırılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Floresans ve UV-görünür bölge absorpsiyon çalışmaları 150W ozone-free xenon lambalı Edinburgh Instruments Spectrofluorometer FS5 ile yürütüldü. Ölçümlerde 1cm'lik quartz küvet kullanıldı. pH ölçümleri Ohaus Starter 3100 pH metre ile yapılmıştır.

Hidrazon sentezinde kullanılan tüm kimyasallar Aldrich Chemical Co. 'da temin edildi. Erime noktaları dijital erime noktası cihazı kullanılarak sızdırmaz tüplerde ölçülmüş ve düzeltilmemiştir. IR spektrumları Nicolet iS 10 spektrometresi ile kaydedilmiştir. APT-NMR ve ¹H-NMR spektrumları, bir Bruker DPX-400 enstrüman ile elde edilmiştir. Tüm kimyasal kayma değerleri δ (ppm) olarak kaydedildi. Rotamerik hidrojenlerin kimyasal kayma değerleri, (*) şeklinde gösterilerek sunulmuştur. Bileşiklerin saflığı, silika jel ile kaplanmış alüminyum levhalar üzerinde, ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir.

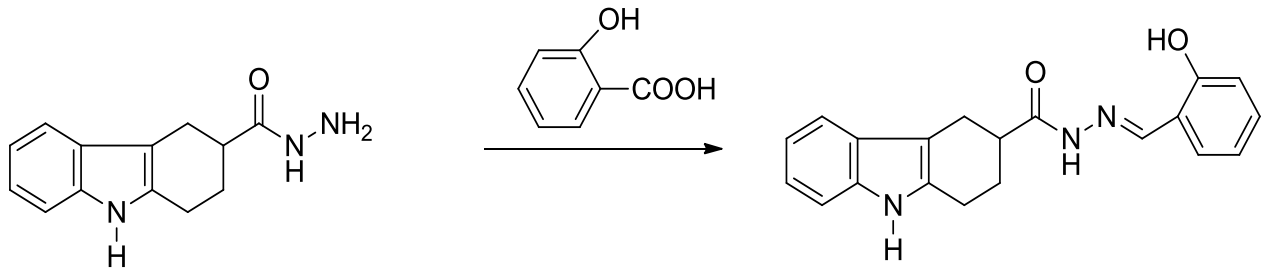
3.2. Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışma çözeltileri günlük olarak stok çözeltiden alınarak ve seyreltilerek kullanılmıştır. Çalışmalarda destile su kullanılmıştır. Çözeltiler buzdolabında 4° C'de saklanmıştır. Bütün reaktifler analitik saflıkta ileri saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır.

Calf Thymus DNA (ct Deoksiribonükleik asit, çift sarmal, calf thymus, tür I sodyum tuzu, Sigma) 6.0×10^{-3} M stok çözeltisi hazırlanmıştır. DNA, pH 8'de Tris-HCl tampon içerisinde oda sıcaklığında çözülmüş, 24 saat tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. Daha sonra 4°C de buzdolabında saklanmıştır. Çalışmalar süresince tampon çözelti olarak Tris-HCl pH 8 kullanılmıştır. Sentezlenen hidrazon türevleri 2.0×10^{-3} M derişimdeki stok çözeltileri DMSO içinde hazırlanmıştır.

3.3. N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazid Sentezi

Başlangıç bileşiği, 2,3,4,9-tetrahidro-1 H-karbazol-3-karbohidrazit, Sarıgöl ve ark. (2015) tarafından geliştirilen metoda göre hazırlanmıştır. 15ml etanol içerisinde karıştırılan 2,3,4,9-tetrahidro-1 H-karbazol-3-karbohidrazid (0,5 g, 2.2 mmol) çözeltisine salisilaldehit (2,2 mmol) ilave edilmiş, daha sonra karışım, 90-95 °C ye reaksiyon tamamlanincaya kadar ısıtılmıştır (TLC takibiyle). Karışım, oda sıcaklığına kadar soğutulup; çözücü, döner bir buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Reaksiyon karışımı, su ile muamele edilmiştir. Süzülüp ve kurutularak istenilen madde elde edilmiştir. Sentez tepkimesi Şekil 3.1 'de verilmiştir.



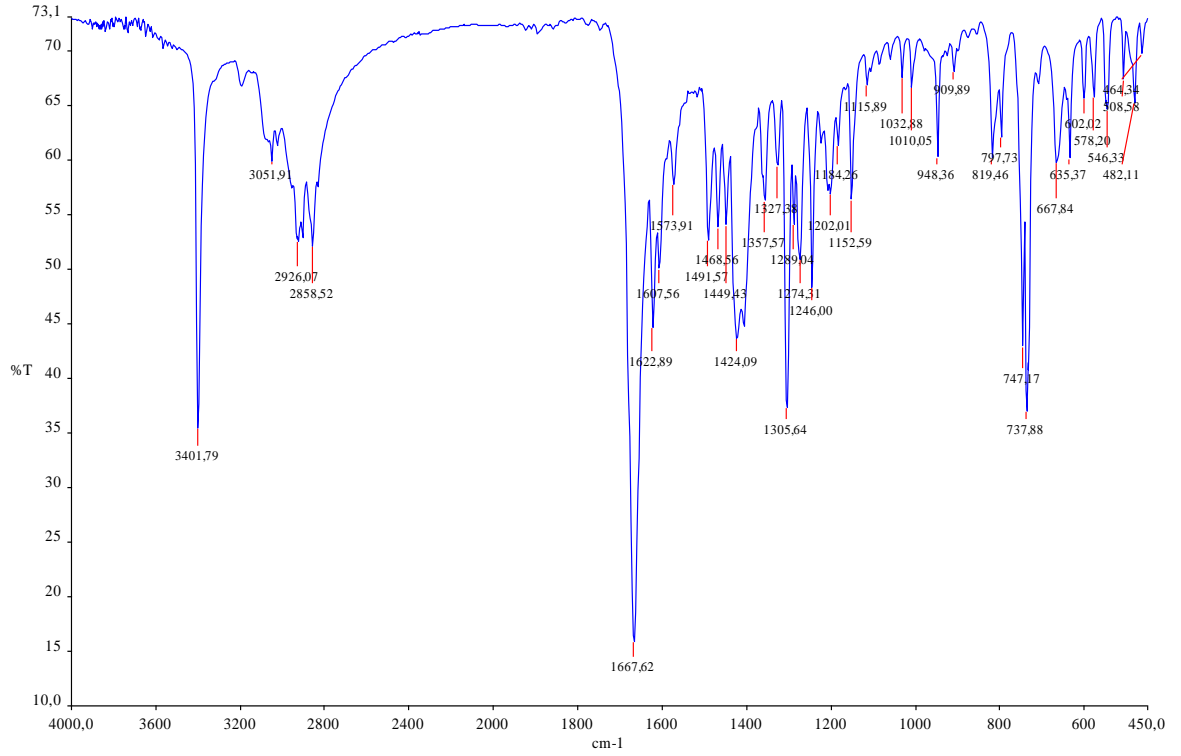
Şekil 3.1. N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit sentezlenme şeması

Soluk sarı katı, verim 85 %, erime noktası 248-249 °C.

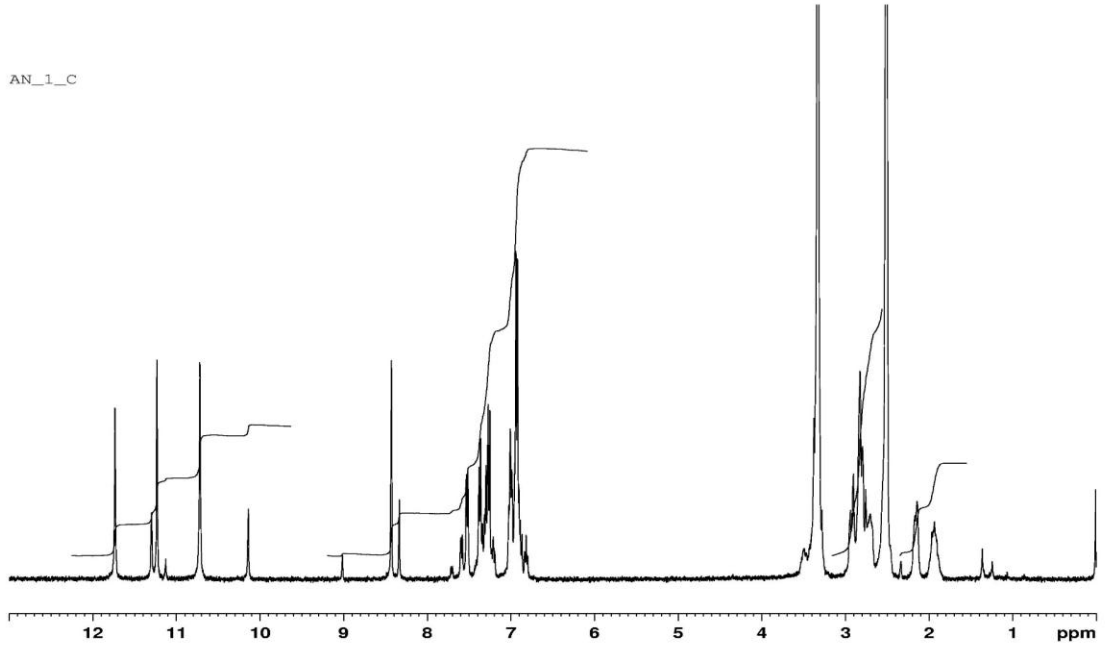
IR spektrumu IR (ν_{\max}): 3401 (N-H), 3052 (C-H), 2926 (C-H), 2858 (C-H), 1668 (C=O), cm^{-1} . ^1H

^1H NMR spektrumu (400 MHz, DMSO): δ = 1.93-1.96 (ç, 1H, CH), 2.11-2.18 (ç, 1H, CH), 2.72-2.95 (ç, 4H), 3.51 (ç, 1H, CH), 6.88-7.61 (ç, 8H, ArH), 8.44 (8.34*, b, 1H, =CH), 10.75 (10.75*, b, 1H, $\text{NH}_{\text{indole}}$), 11.25 (10.17*, b, 1H, OH), 11.77 (11.33*, b, 1H, NH.)

APT-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO): δ = 22.6, 24.6, 26.5, 107.2, 111.1, 116.8, 117.6, 118.6, 119.1, 119.8, 120.7, 127.5, 129.9, 131.7, 134.1, 136.4, 147.2, 157.8.



Şekil 3.2 N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-karbazol-3-karbohidrazit'in IR spektrumu



Şekil 3.3 N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-karbazol-3-karbohidrazit'in ¹H-NMR spektrumu

3.4. Yöntem

Sentezlenen hidrazon türevinin floresans özellikleri incelenmiştir. Tüm deneysel çalışmalarda florimetrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Floresans ölçümler pH 8.0 Tris-HCl tamponunda kuartz hücre içerisinde alınmıştır. Hücreye 2×10^{-3} M'lık stok hidrazon çözeltisinden ortamdaki derişimi 5.0×10^{-6} M olacak şekilde eklenmiş ve 6×10^{-3} M stok *ct*-DNA çözeltisi ile florometrik titrasyon gerçekleştirilmiştir. 25, 37 ve 45°C'de titrasyon tekrarlanmıştır. AN1 için $\lambda_{ex}=360$ nm, $\lambda_{em}=480$ nm olarak kullanılarak floresans şiddeti ve emisyon spektrumlarındaki değişimler kaydedilmiştir. Floresans şiddeti, artan DNA derişimi ile düzenli olarak azalma göstermiştir. Farklı sıcaklıklarda tekrarlanan sönüm çalışmalarının titrasyon verileri Stern-Volmer eşitliğine göre analiz edilerek türevin DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Ayrıca DNA-türev bağlanma özellikleri UV-görünür absorpsiyon spektrumları, iyonik şiddet ve iyodür iyonu sönüm etkileri kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

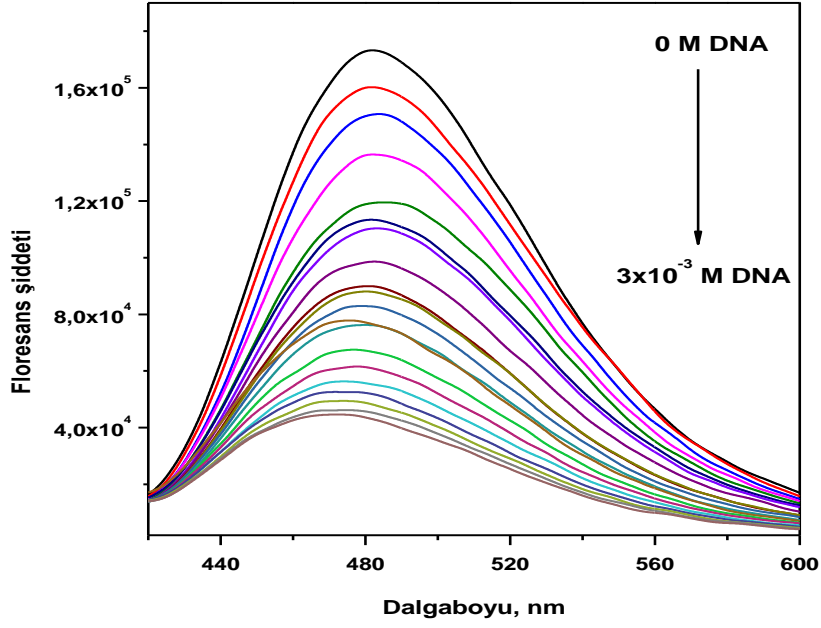
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

DNA küçük moleküller için kayda değer bir biyoreseptör olup, anti-kanser maddeleri tasarlamak için önemli bir biyolojik hedef olarak kabul edilir. Hidrazonlar anti-kanser, anti-bakteriyel, anti-fungal gibi özelliklere sahip DNA'yla hızlı etkileşime geçebilen küçük moleküllerdir. Literatürde hidrazonlar ile DNA sönüm çalışmalarının sayısı hızla artmaktadır. Floresans sönüm, DNA'nın çeşitli boyar maddelerle etkileşimini açıklamak için etkili bir spektroskopik yöntemdir.

Çalışmada, sentezlenen hidrazon türevinin (N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit) floresans özelliği, DNA'nın bu türev üzerinde gösterdiği floresans sönüm ve absorpsiyon özelliklerindeki değişimler incelenmiştir.

4.1. Floresans Sönüm Çalışmaları

Floresans sönüm reaksiyonlarında, floroforun söndürücü molekülle etkileşime girmesi ile floresans şiddetinde azalma görülmektedir. Hidrazon türevlerinin *ct*-DNA'nın artan konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Spektrumdan anaşılacağı gibi *ct*-DNA eklenmesiyle hidrazon türevinin floresans şiddetinde düzenli bir azalma ve emisyon dalgalı boyalarında 2-5 nm hipsokromik kayma gözlenmiştir. Bant şekillerinde ise bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Çözelti 360 nm'de uyarılmış, emisyon spektrumundaki değişimler 400 – 600 nm dalgalı boyu aralığında kaydedilmiştir. Bundan yola çıkarak bu iki molekül arasında bir etkileşim olduğu söylenebilir.



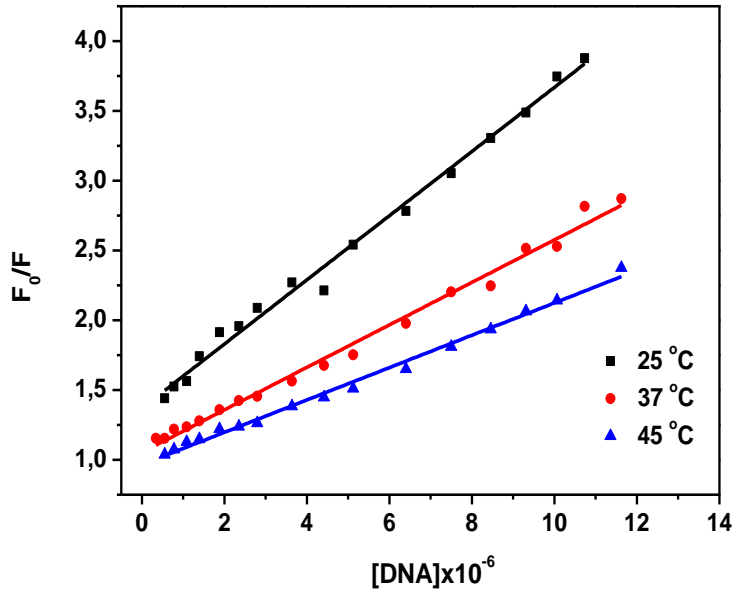
Şekil 4.1. AN1 hidrazon türevinin floresans emisyon şiddetine ct-DNA çözeltisinin oda sıcaklığında etkisini gösteren spektrum

Floresans sönüm verileri aşağıda gösterilen *Stern-Volmer* eşitliği ile incelendi.

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q]$$

F_0 ve F , sırası ile DNA yokluğunda ve varlığındaki floresans şiddetlerini gösterir. $[Q]$ söndürücü madde olarak DNA derşimidir. K_{sv} Stern-Volmer sönüm sabiti, k_q biyomoleküler sönüm hız sabiti, τ_0 ise ortamda söndürücü molekül yokken floresan molekülün ortalama ömrüdür.

Türevin, farklı sıcaklıklarda (25, 37 ve 45°C) ct-DNA ile yapılan floresans titrasyonlarından doğrusal Stern-Volmer grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.2). Artan ct-DNA derişimine karşı F_0/F değerleri grafik eldesinde kullanılarak doğrusal grafiklerin eğimlerinden K_{sv} değerleri elde edilmiştir (Çizelge 1).



Şekil 4.2. 25, 37 45° C'lerde N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit'in *ct*-DNA ile titrasyonundan elde edilen Stern-Volmer grafiği

Statik sönüm olayında söndürücü, floroforun aktif bölgesiyle bir kompleks oluşturduğu için sönüm sabiti (K_{sv}) sıcaklık artışıyla azalmaktadır. Dinamik sönümde ise, sıcaklığın artmasıyla birlikte söndürücü maddenin difüzyonu arttığı için sönüm sabiti artmaktadır. *ct*-DNA söndürücü olarak görev yapar. DNA titrasyonu farklı sıcaklıklarda yapıldığında elde edilen sonuçlarla çizilen Stern-Volmer grafiğinden bulunan K_{sv} değerlerine göre sıcaklık artarken K_{sv} değerleri düşmüştür. Bu da Türevin DNA ile muhtemel ilişkisinin statik sönüm olduğunu gösterir. Sönüm hız sabitleri (k_q) $K_{sv} = \tau_0 \times k_q$ eşitliğinden hesaplanmıştır. Literatüre göre, biyomolekül için τ_0 değeri, 10^{-8} kabul edilmektedir (Wang 2006). Dinamik sönüm için sönüm sabitinin üst sınırı $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'dir. k_q değerlerinin 10^{10} 'dan büyük olması statik sönüm gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

Çizelge 4. 1. Hidrazon türevi-DNA sistemi için Stern-Volmer verileri

T(°C)	Lineer Regrasyon Eşitliği	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$k_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	R^2
25	$F_0/F = 1,370 + 2,299 \times 10^4 [\text{DNA}]$	$2,299 \times 10^4$	$2,299 \times 10^{11}$	0,9925
37	$F_0/F = 1,053 + 1,522 \times 10^4 [\text{DNA}]$	$1,522 \times 10^4$	$1,522 \times 10^{11}$	0,9910
45	$F_0/F = 0,9654 + 1,159 \times 10^4 [\text{DNA}]$	$1,159 \times 10^4$	$1,159 \times 10^{11}$	0,9941

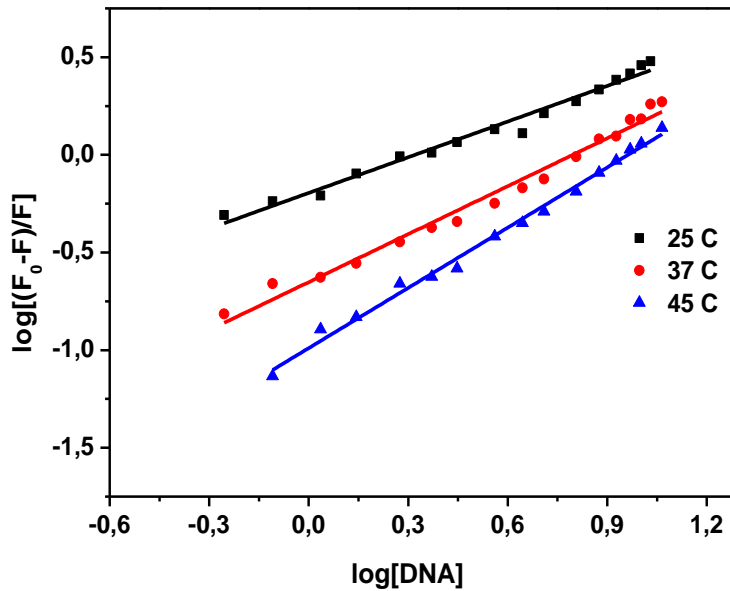
4.2. Bağlanma Dengelerinin Analizi

Statik sönümde, biyomolekülde bağ yapmaya uygun birbirinden bağımsız ama benzer kısımlar olduğunu varsaydığımızda türev-*ct*-DNA sistemleri için bağlanma sabitleri ve bağlanma kısım sayıları aşağıdaki çift logaritma eşitliği kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$\log (F_0-F) / F = \log K_b + n \log [Q]$$

K: bağlanma sabiti

n: bağlanma kısım sayısı



Şekil 4.3. 25, 37,45°C'lerde N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit'in *ct*-DNA ile titrasyonundan elde edilen çift-log grafikleri

n, çift logaritma grafiğinde elde edilen eğrilerin eğiminden bulunur. Türev için üç farklı sıcaklıkta *ct*-DNA ile gerçekleştirilen floresans titrasyonlarından doğrusal çift logaritma grafikleri elde edilmiştir. Şekil 4.3 $\log (F_0-F) / F$ değerinin $\log [Q]$ 'ya karşı grafiğe geçirilerek elde edilen grafiklerini göstermektedir. Sonuçlar ise Çizelge 4. 2 ile verilmiştir.

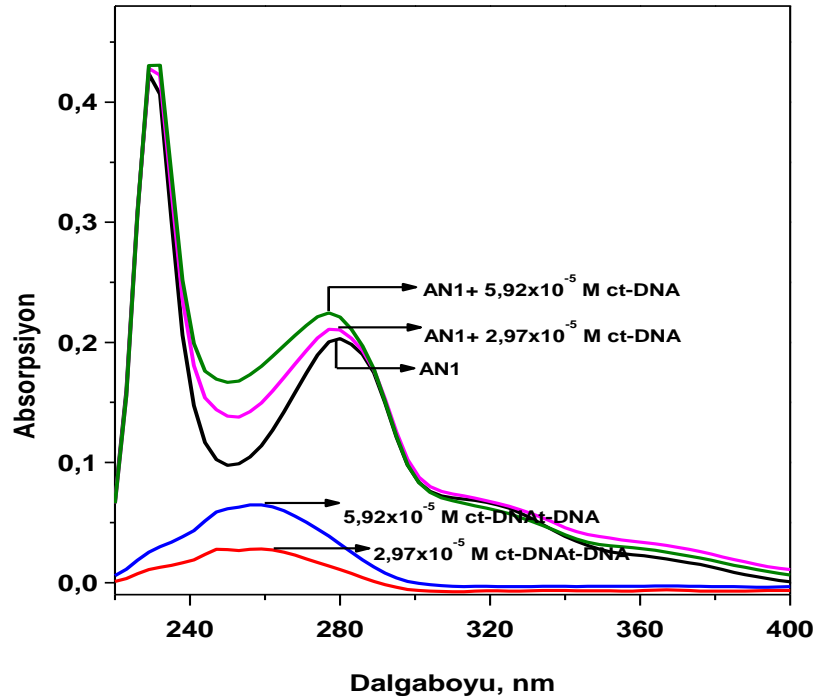
n değerlerinin yaklaşık 1 olması hidrazon türevinin DNA ile bir noktadan etkileştiğini gösterir. Sıcaklık artışı ile türev-DNA komplekslerin kararlılığı arttığı için bağlanma sabitlerinde artış gözlenmiştir.

Çizelge 4. 2. Hidrazon türevi-DNA sistemi için bağlanma sabiti K ve bağlanma kısım sayısı, n, değerleri

T (°C)	Çift Logaritma Eşitliği	K (M ⁻¹)	n	R ²
25	$\log (F_0-F)/F=\log 3,461 +0,6093\log [\text{DNA}]$	$2,89 \times 10^3$	0,609	0,9813
37	$\log (F_0-F)/F=\log 4,2624 +0,819\log [\text{DNA}]$	$1,83 \times 10^4$	0,819	0,9841
45	$\log (F_0-F)/F=\log 5,1813 +1,0285\log [\text{DNA}]$	$1,52 \times 10^5$	1,03	0,9934

4.3. Absorpsiyon Çalışmaları

Hidrazon türevinin DNA ile etkileşiminden elde edilen UV-vis absorpsiyon spektrumu Şekil 4.4'te gösterilmiştir. AN1-ct-DNA absorpsiyon spektrumları aynı miktardaki DNA'nın absorpsiyon spektrumları ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.4. N'-(2-hidroksibenzilidin)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-3-karbohidrazit'in - DNA ile etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları

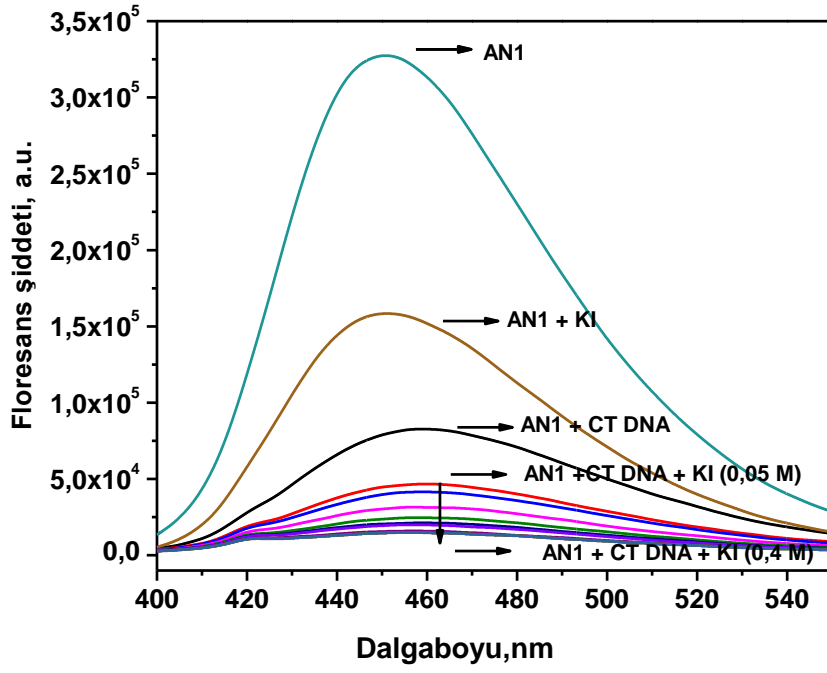
Spektrumdan eklenen DNA miktarının artması ile absorpsiyon miktarlarında da artış olduğu gözlenmektedir. Absorpsiyon bantlarının şeklinde herhangi bir değişiklik söz konusu değildir. Absorpsiyondaki artış ve bant şekillerinin aynı kalması etkileşim türünün oluğa tutunma olduğunu göstermektedir.

4.4. İyodür İyonu Sönüm Çalışmaları

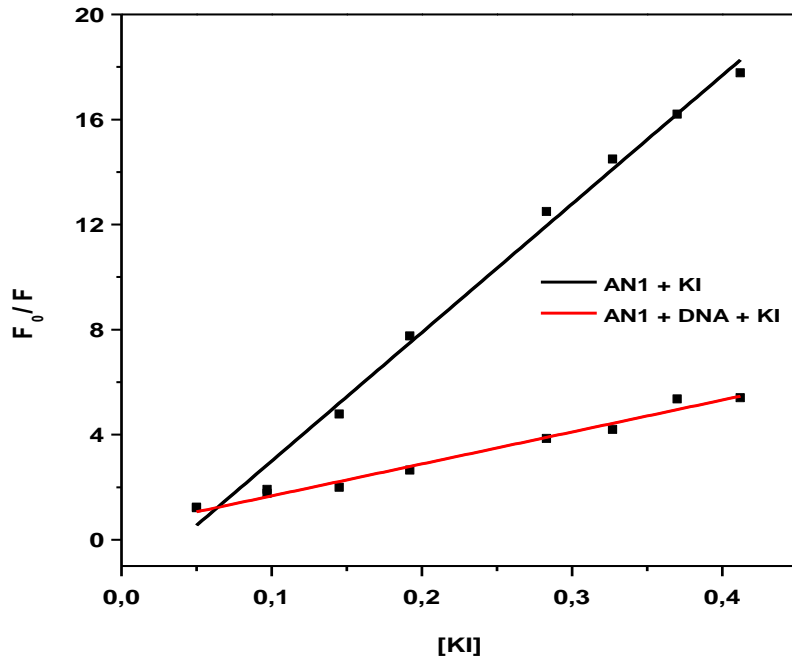
İnterkelatörlerin altında ve üzerinde bulunan baz çiftleri anyonik söndürücülerin floresan proba ulaşmasını engellemektedir. Aynı zamanda anyonik söndürücü ile DNA fosfat gurpları arasındaki elektrostatik itme etkisi floresan probun korunmasına yardım etmektedir (Qui ve ark. 2007). Oluğa tutunan floresan probun interkelatörlere göre DNA sarmalının içinde bulunduğu çevreden daha çok etkilenmektedir. İyodür iyonu küçük floresan moleküller için iyi bilinen dinamik veya çarpışmalı söndürücülerden bir tanesidir. İyodür iyonunun durgun-hal floresans sönüm çalışmaları floresan prob ile DNA'nın bağlanma türü hakkında ek bilgi sağlamaktadır.

Bu bölümde serbest AN1 ve AN1-*ct*-DNA sistemi üzerine değişen miktarlarda (0-0.05 M KI) KI çözeltisi eklenerek floresans şiddetindeki değişimler izlenmiştir. AN1 türevinin *ct*-DNA varlığında ve yokluğundaki emisyon spektrumları şekil 4.5'de gösterilmiştir. Ortamdaki iyodür derişimi ile orantılı olarak AN1 türevinin floresans şiddetinde sönüm olduğu gözlenmiştir. *ct*-DNA-AN1 sisteminin floresans emisyonundaki sönümün ise eklenen iyodür miktarının artışı ile arttığı gözlenmiştir. Serbest probun sönüm oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni oluğa tutunan problemlerin interkelatörler kadar iyi olmasa da DNA sarmalı ile kısmen korunmalarıdır.

Serbest boyanın ve DNA bağlı boyanın iyodür sönüm çalışmalarından elde edilen veriler Stern-Volmer eşitliğine göre grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.6'da serbest ve bağlı problemlerin karşılaştırmalı grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.5. AN1-ct-DNA sisteminin KI varlığında floresans emisyon spektrumu

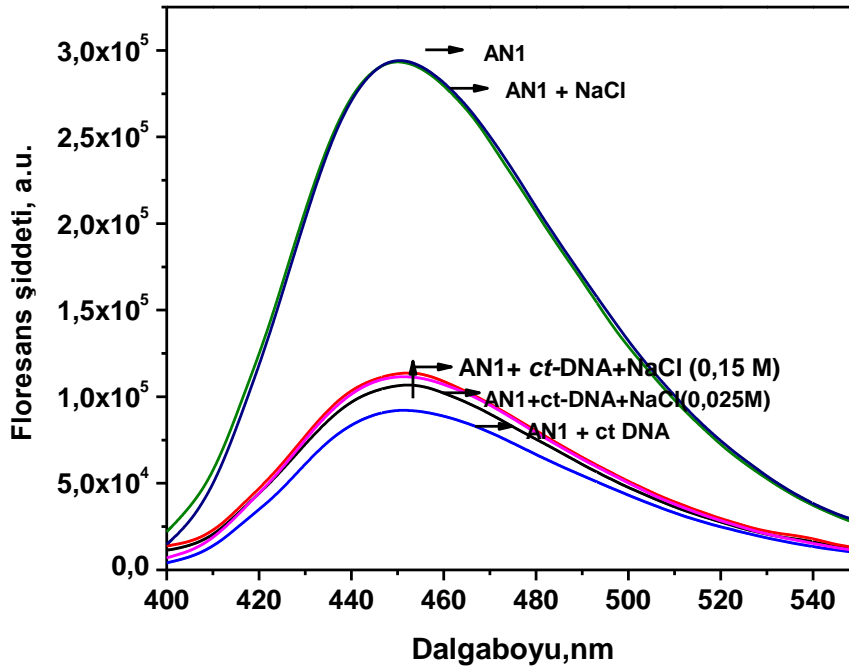


Şekil 4.6. Serbest AN1 ve AN1-ct-DNA sisteminin iyodür sönümünden elde edilen Stern-Volmer grafikleri

4.5. Sodyum Klorür Sönüm Çalışmaları

Küçük moleküller ile DNA'nın bağlanma türlerinin aydınlatılmasında ortamın iyonik şiddetindeki değişikliğin sistemin floresans şiddetine etkisinin incelenmesi etkin yöntemlerden bir tanesidir. Ortamdaki katyon miktarının artması DNA yapısındaki fosfat grupları ile bağlanacak tür sayısını arttırmaktadır. Ortamın iyonik şiddetinin artması ile oluşa tutunan proplar ile katyonlar arasında fosfat grupları ile yarışmalı bir etkileşim meydana gelmektedir.

NaCl kuvvetli bir elektrolit olması nedeni ile deneysel çalışmalarda ortamın iyonik şiddetini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda 0,025M - 0,15M arasında değişen NaCl çözeltisi ortama eklenerek floresans şiddetlerindeki değişiklik izlenmiştir. Artan iyonik şiddet ile floresans emisyon şiddetinde artış gözlenmiştir. Bunun nedeni iyonik şiddetin artması ile beraber AN1 molekülleri ve Na⁺ arasında fosfat grupları ile yarışmalı bir etkileşim başlaması ve AN1- *ct*-DNA etkileşimlerinin zayıflamasıdır.



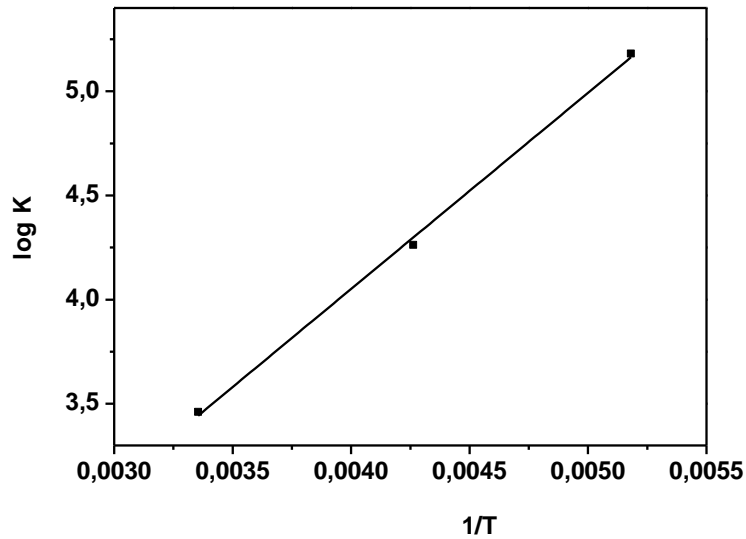
Şekil 4.7. AN1-*ct*-DNA sisteminin NaCl varlığında floresans emisyon spektrumu

4.6. Termodinamik parametreler ve etkileşim türleri

Küçük moleküller ve biyomoleküller arasındaki etkileşimler hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimleri içerebilir. Etkileşim türünün belirlenmesinde termodinamik parametreler (ΔG , ΔH and ΔS) büyük öneme sahiptir. AN1-ct-DNA sistemleri için $\log K$ (bağlanma sabitleri) değerleri üç farklı sıcaklık (20, 30 ve 37°C) için hesaplanarak van't Hoff eşitliğine göre, sıcaklığın tersine karşı grafiğe geçirildi.

$$\log K = - \Delta H / 2,303 RT + \Delta S / 2,303 R$$

ΔH ve ΔS değerleri doğrusal van't Hoff grafiklerinin eğim ve kesim noktası değerlerinden elde edildi. ΔG , $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ eşitliğinden hesaplandı.



Şekil 4.8. AN1-ct-DNA sisteminden elde edilen van't Hoff grafiği

Van't Hoff grafiğinden elde edilen eşitlik, $\log K = 0,285 + 941,56 / T$ ve grafiğin R^2 değeri 0,9987'dir.

Çizelge 4.3. AN1-*ct*-DNA sistemi için van't Hoff eşitliğinden hesaplanan termodinamik değerler

Türev	°C	ΔH (kJ/mol)	ΔS (j/molK)	ΔG (kJ/mol)
AN1	25	-18,03	5,46	-19,66
	37			-19,72
	45			-19,76

Küçük moleküller ve biyolojik makromoleküller supramolekülleri oluştururken genellikle non-kovalent etkileşimler olan hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimleri gösterirler. Termodinamik değerler etkileşimin kendiliğinden olup olmadığı ve türü hakkında bilgi sunar. $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ olduğu takdirde etkileşim türünün hidrofobik; $\Delta S < 0$ ve $\Delta H < 0$ olduğu takdirde hidrojen bağı oluşumu ve van der Waals kuvvetleri; $\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ olması durumunda ise baskın etkileşim türünün elektrostatik etkileşim olduğu düşünülür (Ross 1981). Elde ettiğimiz değerlere göre AN1-*ct*-DNA sisteminde bütün sıcaklıklarda serbest enerjinin (ΔG) negatif işaretli olması etkileşimin kendiliğinden olduğunu, entalpinin (ΔH) negatif olması ise ekzotermik bir etkileşim olduğu göstermektedir. $\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ olması ise ortamdaki baskın etkileşim türünün elektrostatik etkileşim olduğuna işaret etmektedir.

5. SONUÇLAR

- Tetrahydrocarbazol karboksilat etil esterinin hidrazin hidrat ile reaksiyonu sonucu tetrahydrocarbazol karbohidrazit bileşiği sentezlendi. Bu bileşiğin hidroksi benzaldehitler ile reaksiyonu sonucu floresan prob olarak kullanılacak yeni tetrahydrocarbazol yapısına sahip açıl hidrazon bileşikleri sentezlendi. Sentezlenen yeni türevlerin kimyasal yapıları ¹H-NMR, APT-NMR, UV ve IR spekturumları ile karakterize edilmiştir.
- Yapılardan orto- formda olan türev (AN1) 300 nm'nin üzerinde uyarma dalgaboyuna sahip olduğu için ct-DNA ile bağlanma türü incelendi. Meta- ve para- formları ise 280 nm'de uyarılma dalgaboyuna sahip oldukları için iç filtre etkisinden dolayı bağlanma çalışmaları incelenmedi. Florimetrik titrasyon yöntemi ile yapılan çalışmalar üç farklı sıcaklıkta (25, 37, 45°C) yürütüldü.
- ct-DNA floresans sönümünden elde edilen Stern-Volmer grafiklerinden, sıcaklık artışı ile K_{sv} (sönüm sabiti) değerlerinde azalma olduğu görüldü. Buna göre türevin ct-DNA etkileşiminin kompleks oluşumuna dayalı statik sönüm mekanizması olduğu sonucuna varıldı.
- AN1-ct-DNA sisteminin üç farklı sıcaklıkta elde edilen doğrusal çift logaritma grafiklerinden K_b (bağlanma sabiti) ve n (bağlanma kısım sayısı) değerleri hesaplandı. Sıcaklık artışı ile birlikte kompleks kararlılıkları arttığı için K_b ve n değerlerinde artış görüldü.
- AN1-ct-DNA sisteminin farklı DNA derişimlerinde göstermiş olduğu absorpsiyon değerleri serbest DNA ve serbest floresan prob absorpsiyon değerleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen değerler etkileşim türünün oluğa tutunma olduğunu gösterdi.
- İyodür sönüm çalışmaları ve iyonik şiddet değişim çalışmaları bağlanma türünün oluğa tutunma olduğu sonucunu destekledi.

- Termodinamik parametreler kullanılarak bağlanma türü belirlendi. Negatif ΔG değerleri etkileşimin kendiliğinden oluştuğunu, negatif ΔH ve pozitif ΔS değerleri türevin ct-DNA bağlanmasındaki etkin türlerin elektrostatik etkileşimler olduğunu gösterdi.

6. KAYNAKLAR

- Blackburn GM, Gait MJ (1996). DNA and RNA structure: nucleic Acids in Chemistry and Biology, 3rd ed. Blackburn GM, Gait MJ. England: Oxford University Press, 28-39.
- Cao Y, He X, Gao Z, and Peng L (1999). Fluorescence energy transfer between acridine orange and safranin T and its application in the determination of DNA, *Talanta*, 49, 377-383.
- Crisalli P, Hernandez AR, Kool ET (2012). Fluorescence Quenchers for Hydrazone and Oxime Orthogonal Bioconjugation, Department of Chemistry, Stanford University Stanford, *Bioconjug Chem.* 23(9): 1969–1980.
- Ding C , Zhong H , and Zhang S (2008). Ultrasensitive flow injection chemiluminescence detection of DNA hybridization using nano CuS tags, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1314-1318.
- Goransson E, Karlsson I, Oxblad C (2005). DNA Technology, Chalmers University of Technology, s.4-14.
- Gurova K (2009) New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents, *Future Oncol*, 5, 1685–1704.
- Haugland R.P (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th Edit., Molecular Probes Inc., Eugene.
- Hu Z, Tong C (2007). Synchronous fluorescence determination of DNA based on the interaction between methylene blue and DNA, *Analytica Chimica Acta*, 587.2.187-193.
- İçsel C (2013). 2-(Hidroksimetil)Piridin ve 2-(2-Hidroksietil)Piridin ligantları içeren palladyum(II) ve platin(II) komplekslerinin sentezi, kristal yapıları, spektroskopik, termik ve DNA bağlanma özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Bursa.
- Lakowicz JR (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, Springer, New York, 954 pp.
- Lakowicz JR (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd edn.Plenum Press, New York.
- Lerman LS (1963). Structure of DNA-acridine complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 49(1): 94–98.
- Li J, Wei Y-X, Wei Y-L and Dong C (2007). Study of the spectral behavior of four fluorescent dyes and their interactions with nucleic acid by the luminescence method, *Journal of Luminescence*, 124: 143-150.

- Li, H ,Yang Y , Wang BD, Wu JC (2010). Synthesis, crystal structure, antioxidation and DNA-binding properties of the Ln complexes with 1-phenyl-3-methyl-5-hydroxypyrazole-4 carbaldhyde-(benzoyl)hydrazone, *Journal of Organometallic Chemistry*, 695, 415–422
- Manning GS (1978). The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 11: 179–246.
- Nakka M , Nallapati SB , Khagga M ve Sarbani P (2011). 2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)propionic acid (1,3-dimethyl-butylidene) drazide , *Molbank*, M741.
- Nakka M, Begum MS, Varaprasad M, Reddy LV, Bhattacharya A, Helliwell M, Mukherjee AK, Beevi SS, Mangamoori LN, Mukkanti K Ve Pal S (2010). Naproxen and ibuprofen based acyl hydrazone derivatives: Synthesis, structure analysis and cytotoxicity studies, *J. Chem. Pharm. Res*, 2(6), 393-409.
- Narang R, Narasimhan B, Sharma S (2012). A review on biological activities and chemical synthesis of hydrazide derivatives. *Curr Med Chem*. 19:569–612.
- Nelson DL, Cox MM (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edn. USA.
- Neidle S (2001). DNA Minor-Groove Recognition by Small Molecules. *Nat Prod Rep* 18: 291-309.
- Psomas G (2008). Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and DNA-binding properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102:1798–1811
- Qui B, Guo L, Wang W, Chen G , (2007). Synthesis of a novel fluorescent probe useful for DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2629-2635.
- Rollas S, Küçükgülzel SG (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*.12:1910–39.
- Ross PD, Subramanian S, (1981). Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistr*. 20: 3096-3102.
- Sarıgöl D, Yüksel D, Okay G, Uzgören A (2015). Synthesis and structural studies of acyl hydrazone derivatives having tetrahydrocarbazole moiety. *Journal of Molecular Structure*. 1086: 146-152.
- Sinden RR (1994). DNA structure and Function; Chapter 1-Introduction to the Structure, properties, and reactions od DNA, *Academic Press,California*, 1994, s. 1-57.
- Skoog, D. A. Holler, F. J.& Crouch, S. R. (2013). *Enstrümental Analiz İlkeleri* (E. Kılıç ve H. Yılmaz, Çev.). Ankara, Bilim yayıncılık
- Strekowski L, Wilson B (2007). Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623: 3–13.

- Uppal G, Bala S, Kamboj S, Saini M (2011). Therapeutic review exploring antimicrobial potential of hydrazones as promising lead, *Der Pharma Chem*, 2011;3:250–68.
- Wang BD, Yang ZY, Li TR (2006). *Bioorg Med Chem*. Sep 1;14(17):6012-21, Epub 2006 Jun 14.
- Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC (2006). Studies of the interaction between palmatine hydrochloride and human serum albumin by fluorescence quenching method, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1041-1046.
- Valeur B.(2002). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley–VCH, Weinheim.
- Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Parthasarathi R, Nair BU (2006). Interaction of chromium(III) complex of chiral binaphthyl tetradentate ligand with DNA, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 3300–3306.
- Zhou Y, and Li Y (2004). Studies of the interaction between poly(diallyldimethyl ammonium chloride) and DNA by spectroscopic methods, *Colloid Surface A*, 233, 129-135.

ÖZGEÇMİŞ

Şule ÖZKAN 24.06.1989 yılında Tekirdağ'da doğdu. Lise eğitimini 2007 yılında Kırklareli Kepirtepe Anadolu öğretmen lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya bölümünde 2012 yılında tamamladı.2013 yılından beri Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde Yüksek Lisans Eğitimine devam etmektedir.