

**OLİGONÜKLEOTİT VE DNA İLE YENİ NESİL
FLORESANS MADDELERİN ETKİLEŞİMLERİNİN
KÜTLE SPEKTROMETRİSİ VE SPEKTROSKOPİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF
OLIGONUCLEOTIDE AND DNA WITH NEW
GENERATION FLUORESCENT SUBSTANCES BY MASS
SPECTROMETRY AND SPECTROSCOPIC METHODS**

AYŞEGÜL ÖZGEN

PROF. DR. BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

OLİGONÜKLEOTİT VE DNA İLE YENİ NESİL FLORESANS MADDELERİN ETKİLEŞİMLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRİSİ VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Ayşegül ÖZGEN

Doktora, KİMYA Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Ocak 2023, 284 sayfa

Tez çalışmasında yeni nesil floresans maddeler olan benzimidazol temelli platin (II) ve paladyum (II) içeren metal kompleksleri ve perilen diimit türevi yapıların tek iplik oligonükleotitler, çift iplik kısa ve uzun DNA'lar ile kovalent olmayan etkileşimleri hem DNA ile etkileşime girme mekanizmaları üzerinden hem de oluşan komplekslerin spektroskopik özelliklerinden dolayı DNA görüntüleme amacıyla kullanılabilme üzerinden tartışılmıştır. Bağlama etkileşimleri hakkında kalitatif ve/veya kantitatif bilgi sağlayan çeşitli kütle spektrometrik, spektroskopik ve jel elektroforetik yöntemler kullanılmıştır.

Tez çalışmasında N,N-di(n-butil)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit (FP-3), Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II) (PT-5), Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II) (PT-6) yapıları boyalar olarak kullanılmıştır. Tezde kullanılan boyaların, tek iplik oligonükleotitlerin, çift iplik DNA'ların ve aptamerlerin karakterizasyonu, bu boyalarla nükleik asitlerin etkileşimleri, etkileşim stokiyometrilere, kararlılıkları ve etkileşim oluşumunda etkili olan kovalent olmayan etkileşimin türünün tayini, DNA bağlanma yüzdelere, inkübasyon süresinin ve inkübasyon derişiminin etkileşim üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar Matriks Yardımlı Laser Desorpsiyon/İyonlaştırmalı Kütle Spektrometresi (MALDI-MS) ve/veya Elektrosprey

İyonlaştırmalı Kütle Spektrometresi (ESI-MS) ile incelenmiştir. Aynı molekül kütlesine sahip farklı dizilimdeki oligonükleotitlerin konformasyonel olarak farklılıklarının ve bu oligonükleotitlerin eşleşmesi ile oluşan çift iplik DNA ile PT-5 ve PT-6 yapılarının etkileşimlerinin konformasyonel olarak incelenmesi amacıyla İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi (IM-MS) ile analizleri yapılmıştır.

Bağlanmanın uygun olduğu etkileşimlerin absorbans değişiklikleri Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-vis) ile izlenerek bağlanma sabitleri hesaplanmış ve floresans verimleri Floresans Spektroskopisi ile izlenmiş olup küçük molekül-DNA etkileşim mekanizmaları araştırılmıştır. Ayrıca tez çalışmasında kullanılmak üzere sentezlenen yapıların Agaroz Jel Elektroforezi yönteminde sensör-boyar madde olarak kullanımı ve DNA teşhisinde kullanılıp kullanılmayacağı incelenmiştir. Böylece DNA, RNA ve bunların fraksiyonlarının gözlemlenmesine dayanan, literatürde ve uygulamalarda sıklıkla kullanılan, oldukça kanserojen olan Etidyum Bromür yerine alternatif görüntüleme ajanları tespit edilmeye çalışılmıştır.

Özgün 1:1 stokiyometrideki tüm etkileşimler için optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur.

Perilen diimit türevi FP-3 boyasının uzun zincirli çift sarmal DNA yapıları için iyi bir interkalatör olduğu ve etkin bir şekilde görüntüleme ajanı olarak EtBr'ye alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. Benzimidazol türevi olan platin (II) içeren PT-6 ve paladyum (II) içeren PT-5 yapılarının DNA nükleik asitlerinin tüm nükleobazlarıyla etkileşime girdiği ve platinin paladyuma kıyasla daha kuvvetli ve kararlı etkileşim oluşturduğu belirlenmiştir. Bu boyaların DNA ile bağlanmalarında, EtBr molekülüne kıyasla daha zayıf floresans etki gösterdikleri bulunmuştur ancak özellikle uzun çift sarmal DNA'larla etkileşimler için EtBr'ye alternatif görüntüleme ajanı olabilecekleri belirlenmiştir. Tez çalışmaları sonucunda DNA ile iyi etkileştikleri tespit edilen bu boyaların tıp alanında kanser teşhisi ve ileriki deneysel çalışmalarla birlikte kanser tedavisi alanında, yan etkileri ve direnci bilinen cis-platine alternatif olarak kullanılabilme olasılıklarının yüksek olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Oligonükleotit, DNA, kovalent olmayan etkileşimler, Benzimidazol, Platin (II), Paladyum (II), Perilen diimit, Kütle Spektrometrisi, UV-vis ve Floresans Spektroskopi, Agaroz Jel Elektroforez.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF OLIGONUCLEOTIDE AND DNA WITH NEW GENERATION FLUORESCENT SUBSTANCES BY MASS SPECTROMETRY AND SPECTROSCOPIC METHODS

Ayşegül ÖZGEN

Doctor of Philosophy, Department of CHEMISTRY

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

January 2023, 284 pages

In the thesis study, the non-covalent interactions of benzimidazole-based platinum (II) and palladium (II) containing metal complexes and perylene diimide derivative structures with single-stranded oligonucleotides, double-stranded short and long DNAs were discussed both through their mechanisms of interaction with DNA and their use for DNA imaging due to the spectroscopic properties of the complexes formed. Various mass spectrometric, spectroscopic and gel electrophoretic methods have been used that provide qualitative and/or quantitative information about binding interactions.

N,N-di(n-butyl)-1,6,7,12-tetra(4-hydroxyphenoxy)perylen-3,4,9,10-tetracarboxylic acid diimide (FP-3), Saccharinato-2,6-bis(N-methyl-benzimidazol-2-yl)pyridinepalladium(II) (PT-5), Saccharinato-2,6-bis(N-methyl-benzimidazol-2-yl)pyridineplatin(II) are used in the thesis study as dye structures. Studies on the characterization of the dye structures, single-stranded oligonucleotides, double-stranded DNAs and aptamers used in the thesis, interactions of these dyes and nucleic acids, interaction stoichiometry, stability and determination of the type of non-covalent interaction that is effective in the formation of interaction, DNA binding percentages, the effect of incubation time and incubation concentration on the interaction were examined with Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS)

and/or Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS) analyzes were performed in order to examine the conformational differences of oligonucleotides with the same molecular mass in different sequences and the conformational examination of the interactions of the double-stranded DNA (which is formed by the pairing of these oligonucleotides) with PT-5 and PT-6 structures.

The absorbance changes of the interactions where binding is appropriate were monitored by Ultraviolet-Visible Region Spectroscopy (UV-vis), and binding constants were calculated, fluorescence efficiencies were monitored by Fluorescence Spectroscopy, and small molecule-DNA interaction mechanisms were investigated. In addition, the use of the structures synthesized for use in the thesis study as a sensor-dye in the Agarose Gel Electrophoresis method and whether they can be used in DNA identification were examined. Thus, alternative imaging agents have been tried to be determined instead of Ethidium Bromide, which is highly carcinogenic, which is based on the observation of DNA, RNA and their fractions, which is frequently used in the literature and applications.

The optimum incubation time for all interactions in the specific 1:1 stoichiometry was found to be 24 hours.

It was concluded that FP-3 dye, a derivative of perylene diimide, is a good intercalator for long double-stranded DNA structures and can be an alternative to EtBr as an effective imaging agent. It has been determined that PT-6 containing platinum (II) and PT-5 containing palladium (II) dyes, derivatives of benzimidazole, interact with all nucleobases of DNA nucleic acids and platinum creates a stronger and more stable interaction compared to palladium. It has been found that these dyes show weaker fluorescence compared to the EtBr molecule in binding with DNA, but it has been determined that they can be an alternative imaging agent to EtBr, especially for interactions with long double-stranded DNAs. As a result of the thesis studies, it was concluded that these dyes, which were found to interact well with DNA, have a high probability of being used as an alternative to cis-platin, whose side effects and resistance are known, in the field of cancer diagnosis and treatments with further experimental studies.

Keywords: Oligonucleotide, DNA, non-covalent interactions, Benzimidazole, Platinum (II), Palladium (II), Perylene diimide, Mass Spectrometry, UV-vis and Fluorescence Spectroscopy, Agarose Gel Electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Tüm lisansüstü eğitimim boyunca her türlü bilgi, tecrübe ve bakış açısıyla hayatımda çok fazla emeği, katkısı ve desteği olan saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof. Dr. Bekir SALİH'e çok teşekkür ederim. Sizinle çalışmak akademik hayattaki en büyük fırsatlardan biri ve bu imkânı bana sağladığınız için size minnettarım. Sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Doktora Tez İzleme Komite'mde yer alan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Abdurrahman ŞENGÜL'e ve Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI'ya tez çalışmaları ve savunma sınavı sürecindeki değerli görüşleri ve katkıları için çok teşekkür ederim. Doktora Tez Savunma Sınavı Jüri'mde yer alan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK'a ve Doç. Dr. Ezel BOYACI'ya savunma sürecindeki kıymetli görüşleri ve yönlendirmeleriyle tezime yaptıkları büyük katkılardan dolayı şükranlarımı sunarım.

Tüm yaşantım boyunca bana olan sonsuz sevgisi, saygısı, sabrı, güveni ve desteği ile hep yanımda olan yol arkadaşım canım annem Neşe ÖZGEN'e her şeyden çok teşekkür ederim. Sevgili babam Arif ÖZGEN'e destekleri ve bana güvendiği için çok teşekkür ederim. Hayatımı anlamlandıran canım ailem, her daim yanımda olmanızı diliyorum ve varlığınıza her gün şükrediyorum.

Bu yolda bana olan güveni ve inancı ile Doktor olacağım günü sabırsızlıkla bekleyen ancak artık aramızda olmayan biricik anneannem Ayşe GÜNEŞ'i rahmetle anıyorum.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum kıymetli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAKEY'a bu yoldaki tüm tavsiyeleri, bilgi paylaşımları ve yardımlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim. Motivasyonumu arttıran konuşmalarını, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman unutmayacağım.

Bu yorucu süreçteki her türlü desteğiniz için başta İzzet AVCI ve Serhat ÖZTÜRK olmak üzere SAREG ailesinin tüm üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren Doç Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e ve araştırma laboratuvarındaki öğrencileri Nazım Sergen MISIRLI ve Esin BAYAN'a tüm yardımları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Biyomoleküller ve Biyomoleküler Süreçler.....	6
2.2. DNA Yapısı ve Fonksiyonu	9
2.3. Kovalent Olmayan Etkileşimler	13
2.3.1. Elektrostatik Etkileşimler	14
2.3.2. İyon-Dipol Etkileşimleri	15
2.3.3. Hidrojen Bağı	15
2.3.4. π - π İstiflenme Etkileşimleri.....	15
2.3.5. van der Waals Kuvvetleri	16
2.3.6. Hidrofobik Etkileşimler.....	16
2.4. Moleküllerin DNA ile Kovalent Olmayan Etkileşimleri	17
2.4.1. Yarık bağlanma (Groove binding)	17
2.4.2. İnterkalasyon (Intercalation)	18
2.5. Nükleik Asitler ile Küçük Moleküllerin Etkileşimleri.....	19
2.5.1. Nükleik Asitler ile Metal Bazlı Komplekslerin Etkileşimleri.....	22
2.5.1.1. Platin Temelli Kompleks Yapılar	23
2.5.1.2. Paladyum Temelli Kompleks Yapılar	25
2.5.1.3. Benzimidazol	26
2.5.1.4. Perilen Diimitler	28
2.5.2. Nükleik Asitler ile Floresan Boya Etkileşimleri ve DNA Görüntüleme.....	31

2.5.3. Nükleik Asitlerin Küçük Moleküllerle Etkileşimlerinin Tayin Yöntemleri .	35
2.6. Kütle Spektrometrisi	52
2.6.1. Yumuşak İyonlaştırma Yöntemleri.....	54
2.6.1.1. <i>Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)</i>	56
2.6.1.2. <i>Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)</i>	57
2.6.2. Kütle Analizörleri	59
2.6.2.1. <i>Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (Time of Flight, TOF)</i>	60
2.6.2.2. <i>Dört Kutuplu Kütle Analizörü (Quadrupole, Q)</i>	61
2.6.2.3. <i>Dört Kutuplu/Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (Q/TOF)</i>	62
2.6.3. Kütle Spektrometresi İyon Detektörleri.....	63
2.6.4. İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (IM-MS).....	63
2.6.4.1. <i>Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi</i>	64
2.6.4.2. <i>Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS)</i>	65
2.7. Spektroskopi	65
2.7.1. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi.....	67
2.7.2. Floresans Spektroskopisi	68
2.8. Elektroforez	70
2.8.1. Jel Elektroforezi	70
2.8.1.1. <i>Poliakrilamid Jel Elektroforezi</i>	71
2.8.1.2. <i>Agaroz Jel Elektroforezi</i>	73
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	76
3.1. Kullanılan Kimyasallar	82
3.2. Kullanılan Cihazlar	83
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	87
4.1. Karakterizasyon	87
4.1.1. N,N-di(n-butil)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit (FP-3 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu	87
4.1.2. Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II), [Pd(L ₂)(sac)] (sac) (PT-5 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu	93

4.1.3. Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II), [Pt(L ₂)(sac)] (sac) (PT-6 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu	96
4.1.4. Oligonükleotit analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi	99
4.1.5. Oligonükleotitlerin MALDI-TOF MS ile Karakterizasyonu	103
4.1.6. Tavlanma sürecinin (annealing process) çift iplik DNA oluşumu üzerinde etkisinin MALDI-TOF-MS ile analizleri.....	108
4.1.7. Çift iplik DNA'ların MALDI-TOF MS ile Karakterizasyonu	112
4.1.8. ON9 ve ON10 kodlu oligonükleotitlerin tavlanmasından oluşan DS5 kodlu çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi	116
4.2. Etkileşim.....	120
4.2.1. Kütle Spektrometrik Analizler	120
4.2.1.1. Oligonükleotitler ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin kütle spektrometrik analizleri	120
4.2.1.1.1. ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boya etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri	120
4.2.1.1.2. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri	124
4.2.1.1.3. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimlerinin ESI-QTOF-MS ile analizleri	146
4.2.1.1.4. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin stokiyometrik olarak incelenmesi	163
4.2.1.1.5. İnkübasyon süresinin çift iplik DNA ve oligonükleotitler ile FP-3, PT- 5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimleri üzerine etkisinin incelenmesi	171
4.2.1.2. Oligonükleotitler ile PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin iyon hareketliliği kütle spektrometresi (IM-MS) ile analizleri ve konformasyonel değişikliklerin incelenmesi	180
4.2.1.3. Aptamerler ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin kütle spektrometrik analizleri.....	191
4.2.1.3.1. APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri.....	191
4.2.1.3.2. APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimlerinin ESI- QTOF-MS ile analizleri	202

4.2.1.3.3. APT-2, APT-3, APT-4 ve APT-7 kodlu aptamerler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri.....	205
4.2.2. Spektroskopik Analizler	213
4.2.2.1. Çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ile analizleri	213
4.2.2.1.1. DS-3 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması	214
4.2.2.1.2. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması	218
4.2.2.1.3. Buzağı timüs DNA'sı ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması	221
4.2.2.2. Çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri	223
4.2.2.2.1. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri	224
4.2.2.2.2. Buzağı timüs DNA'sı ile boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri	226
4.2.3. Elektroforetik Analizler	228
4.2.3.1 Buzağı timüs DNA'sı ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Agaro Jel Elektroforez ile analizleri	229
4.2.3.2. Buzağı timüs DNA'sı ile FP-3 kodlu boyanın farklı derişim oranlarındaki etkileşimlerinin Agaro Jel Elektroforezi analizleri ile incelenmesi ve etkileşim türünün belirlenmesi	231
5. SONUÇLAR.....	236
6. KAYNAKLAR	247
EKLER.....	265
EK 1. Spektrumlar	265
EK 1.1 Oligonükleotit analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi	265

EK 1.2. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri	268
EK 1.3. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri	274
EK 1.4. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri	279
EK 6. Tez �alışması Orjinallik Raporu	283
�ZGE�Mİş	284



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. DNA'dan protein sentezi basamaklarının şematik gösterimi	7
Şekil 2. 2. A) Çift iplik DNA (düz yapı), B) Çift sarmal DNA (heliks yapı) [44]	11
Şekil 2. 3. Baz çiftlerinin bağlanmasının şematik gösterimi [44].....	12
Şekil 2. 4. A) Minör ve majör yarı, B) Çift sarmal DNA'nın kısa bir bölümünün şematik gösterimi [47].....	13
Şekil 2. 5. İnterkalasyon (sol), yivli interkalasyon (orta) ve yarı bağlanma (sağ) [56]	19
Şekil 2. 6. A.1. Majör yarı bağlayıcı, 2. Minör yarı bağlayıcı, 3. Elektrostatik bağlanma, 4. İnterkalasyon. B.'de ise DNA sarmalının uzaması ve çözülmesinin şematik gösterimi [60].....	21
Şekil 2. 7. cis-platin, karboplatin ve okzaliplatin moleküllerinin kimyasal yapıları [68]	24
Şekil 2. 8. Benimidazol molekülünün kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2. 9. Perilen dimitin moleküler yapısı [80].....	28
Şekil 2. 10. Bazı perilen dimit türevlerinin moleküler yapıları [79].....	29
Şekil 2. 11. Etidyum bromür boyasının yapısı.....	33
Şekil 2. 12. A) Artan DNA derişiminde ilacın absorpsiyon spektrumları [106], B) artan ilaç derişiminde DNA spektrumları [107]	41
Şekil 2. 13.A) DNA'nın yokluğunda ve varlığında ilacın floresan emisyon spektrumları [111], B) dsDNA ve ssDNA tarafından yarı bağlayıcı ilacın floresan emisyon yoğunluğunun söndürülmesi [112], C) DNA'nın yokluğunda ve varlığında KI tarafından interkalasyon yapan ilacın floresans söndürülmesi [113], D) Yarı bağlayıcı molekül durumunda KI söndürme çalışmaları, E) Denatüre edici maddelerin etkisi [116], F) İlaç-DNA etkileşiminde iyonik gücün rolü [106]	46
Şekil 2. 14. A) Etidyum bromür yer değıştirme deneyi [123], B) Akridin turuncu yer değıştirme deneyi [121], C) Metilen mavisi (MB) kullanılarak yer değıştirme deneyi [107], D)Yarı bağlayıcı boyanın yarı bağlayıcı molekül tarafından yer değıştirmesi [111].....	48
Şekil 2. 15. Kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi [48].....	53

Şekil 2. 16. MALDI mekanizmasının şematik olarak gösterimi [48]	57
Şekil 2. 17. ESI'nın şematik olarak gösterimi [48]	58
Şekil 2. 18. MALDI-TOF kütle analizörlerinin şematik olarak gösterimi. A) lineer mod ve B) reflektör mod [48].....	61
Şekil 2. 19. Dört kutuplu kütle analizörünün şematik gösterimi [135]	62
Şekil 2. 20. Dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle analizörünün şematik gösterimi [136].....	63
Şekil 2. 21. Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometresi şematik gösterimi [141].....	64
Şekil 2. 22. Örnek bir absorpsiyon spektrumu [145]	67
Şekil 2. 23. Elektromanyetik ışımının uyarılması ve emisyonunun şematik gösterimi .	68
Şekil 2. 24. Örnek bir floresans spektrumu	69
Şekil 2. 25. Jel elektroforez yönteminin şematik gösterimi	71
Şekil 2. 26. Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış bir örneğin temsili gösterimi [149]	72
Şekil 2. 27. Agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış bir DNA örneğinin gösterimi [150] ...	73
Şekil 3. 1. Perilen diimit türevi FP-3 molekülü, $C_{56}O_{12}N_2H_{42}$ (M_w : 934,27 Da)	77
Şekil 3. 2. Benzimidazol türevi PT-5 molekülü, $C_{35}O_6N_7H_{25}PdS^{2-}$ (M_w : 810,17 Da) ...	77
Şekil 3. 3. Benzimidazol türevi PT-6 molekülü, $C_{35}O_6N_7H_{25}PtS^{2-}$ (M_w : 898,82 Da)	78
Şekil 4. 1. FP-3 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matrisleriyle analit:matris oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.	90
Şekil 4. 2. FP-3 molekülünün (hacimce 1:200, çözücü-metanol) ESI'da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.	91
Şekil 4. 3. FP-3 molekülünün (hacimce 1:200, çözücü-metanol, ek olarak amonyum asetat eklenmiştir.) ESI'da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.	92
Şekil 4. 4. PT-5 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matrisleriyle analit:matris oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.	94
Şekil 4. 5. $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütle: 445,05 Da)	94
Şekil 4. 6. 1,0 mg/ml derişimde PT-5 molekülü (çözücü= Su:%1 Amonyum asetat), ESI'da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.....	95

Şekil 4. 7. PT-6 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matriksleriyle analit:matriks oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.....	97
Şekil 4. 8 $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütle: 534,11 Da).....	97
Şekil 4. 9. 1,0 mg/ml derişimde PT-6 molekölü (çözücü= Su:%1 Amonyum asetat), ESI’da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.	98
Şekil 4. 10. ON-9 kodlu oligonökleotit ile A)3-HPA, B)THAP, C)ATT, D)CHCA, E)DHAP, F)DHB, G)DIT ve H)PNA matrikslerinin hacimce 1:1 oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan lineer mod MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler ON-9’un protone olmuş moleköler iyon pikine aittir).	102
Şekil 4. 11. A)ON-1, B)ON-2, C)ON-3 D)ON-4, E)ON-5 ve F)ON-6 kodlu oligonökleotitlerin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler oligonökleotitlerin protone olmuş moleköler iyon pikine aittir). ...	106
Şekil 4. 12. A)ON-9 kodlu oligonökleotit, B)ON-10 kodlu oligonökleotit, C)Tavlanmamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D)Tavlanmış DS-5 kodlu çift iplik DNA’ya ait hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.....	110
Şekil 4. 13. A)ON-9 kodlu oligonökleotit, B)ON-10 kodlu oligonökleotit, C)Tavlanmamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D)Tavlanmış DS-5 kodlu çift iplik DNA’ya ait hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile 3300-4200 m/z aralığında genişletilmiş lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.	110
Şekil 4. 14. Tavlanma reaksiyonuna bir örnek [162].....	111
Şekil 4. 15. A)DS-1, B)DS-2 ve C)DS-3 kodlu çift iplik DNA’ların hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler çift iplik DNA’ların protone olmuş moleköler iyon pikine aittir).	113
Şekil 4. 16. A) DS-5-PT-5 etkileşiminin 1:1 onspot 3-HPA matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) DS-5-PT-5 etkileşiminin 1:1 onspot DHB matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu.....	117

Şekil 4. 17. A) DS5-PT-6 etkileşiminin 1:1 onspot 3-HPA matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) DS5-PT-6 etkileşiminin 1:1 onspot DHB matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu.	118
Şekil 4. 18. A) ON-15-FP-3 (1:10, v:v) etkileşiminin ve B) ON-16-FP-3 (1:10, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.....	122
Şekil 4. 19. A)DS-1, B)DS-1-FP-3 etkileşimi, C)ON-1-FP-3 etkileşimi ve D)ON-2-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.	126
Şekil 4. 20. A)DS-3, B)DS-3-PT-5 etkileşimi, C)ON-5-PT-5 etkileşimi ve D)ON-6-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.	128
Şekil 4. 21. A)DS-4, B)DS-4-PT-6 etkileşimi, C)ON-7-PT-6 etkileşimi ve D)ON-8-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.	131
Şekil 4. 22. A)DS-1, B)DS-1-FP-3, C)ON-1-FP-3 ve D)ON-2-FP-3'ün 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları.	147
Şekil 4. 23. A)DS-2, B)DS-2-PT-5, C)ON-3-PT-5 ve D)ON-4-PT-5'in 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları.....	149
Şekil 4. 24. A)DS-4, B)DS-4-PT-6, C)ON-7-PT-6 ve D)ON-8-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları.	154
Şekil 4. 25. A) 0,04:1, B) 0,08:1 ve C) 0,2:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-5 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.....	165
Şekil 4. 26.A) 0,04:1, B) 0,08:1, C) 0,2:1 ve D) 0,4:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-6 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.....	168
Şekil 4. 27. A) DS7'nin kütle spektrumu, B) 0 saat ve C) 1 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-5'in 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.....	172

Şekil 4. 28. A) DS7'nin kütle spektrumu, B) 0 saat ve C) 1 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.	177
Şekil 4. 29. A)ON7 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun, B)ON8 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun, C)DS-4 kodlu çift iplik DNA'ya ait +3 yüklü iyonun ve D) DS-4 kodlu çift iplik DNA'nın içindeki serbest haldeki +3 yüklü ON7 ve +3 yüklü ON8 kodlu oligonükleotit iyonlarının karışımına ait etkin çarpışma kesiti grafikleri.	182
Şekil 4. 30. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	183
Şekil 4. 31. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ¹⁺ H ⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	184
Şekil 4. 32. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-8+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	184
Şekil 4. 33. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun ve B)[ON-8+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	185
Şekil 4. 34. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	186
Şekil 4. 35. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B) [ON-8+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.	186
Şekil 4. 36. A)[DS-4+3H ⁺] ³⁺ iyonun, B) [DS-4+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺ iyonun ve C) [DS-4+2[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺ etkin çarpışma kesiti grafikleri.	187
Şekil 4. 37. A)APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.	192
Şekil 4. 38. A)APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.	193

Şekil 4. 39. A)APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.....	195
Şekil 4. 40. A)APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.....	197
Şekil 4. 41. A)APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.....	198
Şekil 4. 42. A)APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.....	200
Şekil 4. 43. A) APT-2-PT-5 ve B) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası ESI kütle spektrumu.	203
Şekil 4. 44. A) APT-4-PT-5 ve B) APT-2-4-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası ESI kütle spektrumu.	204
Şekil 4. 45. A) APT-2-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) APT-3-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.	208
Şekil 4. 46. DS3-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.....	215
Şekil 4. 47. DS3-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	216
Şekil 4. 48. DS3-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	217
Şekil 4. 49. DS5-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.....	218
Şekil 4. 50. DS5-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	219
Şekil 4. 51. DS5-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	220
Şekil 4. 52. DNA-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	221

Şekil 4. 53. DNA-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.	222
Şekil 4. 54. DS5-FP-3 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .380 nm).	225
Şekil 4. 55. DS5-PT-5 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .427 nm).	225
Şekil 4. 56. DS5-PT-6 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .427 nm).	226
Şekil 4. 57. DNA-FP-3 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .380 nm).	227
Şekil 4. 58. DNA-PT-6 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .427nm).	228
Şekil 4. 59. Soldan sağa sırasıyla, DNA+FP3, DNA, DNA+EtBr, DNA+PT6, DNA+PT5 etkileşimlerine ait agaroz jel görüntüsü	230
Şekil 4. 60. Soldan sağa sırasıyla, DNA, DNA+10 ⁻⁶ M FP3, DNA+10 ⁻⁵ M FP3, DNA+10 ⁻⁴ M FP3 etkileşimlerine ait agaroz jel görüntüsü.....	232
Şekil 4. 61. İleriki çalışmalarda kullanılması planlanan Pt(II) ve Pd(II) geçiş metali bazlı benzimidazol türevi ligandlar içeren perilen diimit temelli yapılar A)C ₉₄ O ₁₂ N ₁₂ H ₇₂ Pt ₂ ve B)C ₉₄ O ₁₂ N ₁₂ H ₇₂ Pd ₂	235

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Kütle spektrometresi bileşenlerinin çeşitlerinin bazıları.....	54
Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan nükleik asit dizileri ve özellikleri.	79
Çizelge 4. 1. FP-3 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.....	91
Çizelge 4. 2. PT-5 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.....	95
Çizelge 4. 3. PT-6 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.....	98
Çizelge 4. 4. Oligonükleotitlerin monoizotopik kütleleri ile protone olmuş, çift yüklü ve dimer iyonlarına ait m/z değerleri.	104
Çizelge 4. 5. Çift iplik DNA'ların monoizotopik kütleleri ile protone olmuş ve çift yüklü iyonlarına ait m/z değerleri.	115
Çizelge 4. 6. Çift iplik DNA'ların %G-C içeriği ve sinyal şiddetleri.	115
Çizelge 4. 7. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-6 ile etkileşim stokiyometrilere....	144
Çizelge 4. 8. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-5 ile etkileşim stokiyometrilere....	145
Çizelge 4. 9. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-5 ve PT-6 ile etkileşim stokiyometrilere.	160
Çizelge 4. 10. Nükleik asit:PT-5 etkileşimine ait sinyal alanının inkübasyon süresine göre değişimi.	175
Çizelge 4. 11. Nükleik asit:PT-6 etkileşimine ait sinyal alanının inkübasyon süresine göre değişimi.	179
Çizelge 4. 12. Optimize edilen ESI-IM-TOF-MS parametreleri.	181
Çizelge 4. 13. Oligonükleotit ve çift iplik DNA'ya ait kütle/yük değeri, konformer sayısı, etkin çarpışma kesiti değerleri.....	189
Çizelge 5. 1. PT-5 ve PT-6 nükleik asit etkileşimlerinin MALDI-MS ve ESI-MS toplu sonuçları.	239

Çizelge 5. 2. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın aptamelerle etkileşimlerinin MALDI-MS ve ESI-MS toplu sonuçları.....	242
Çizelge 5. 3. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın DNA'larla etkileşimlerinin UV-vis Spektroskopi toplu sonuçları.....	244
Çizelge 5. 4. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın DNA'larla etkileşimlerinin Floresans Spektroskopi toplu sonuçları.....	245



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Å	Angstrom
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
Pd	Paladyum
Pt	Platin
m/z	Kütle/Yük
K _b	Bağlanma sabiti
CCS	Etkin Çarpışma Kesiti
λ _{max}	Maksimum absorbands dalga boyu
ε _{max}	Molar absorpsiyon katsayısı

Kısaltmalar

3-HPA	3-hidroksipikolinik asit
APT	Aptamer
ATT	6-aza-2-tiyotimin
CHCA	α-siyano-4-hidroksisinnamik-asit
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
dsDNA	Çift sarmal/iplik DNA
EtBr	Etidyum Bromür
ESI	Elektrosprey iyonlaştırma

FP-3	N,N-di(n-butil)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit
IM	İyon hareketliliği
LC	Sıvı Kromatografisi
MALDI	Matriks yardımcı lazer desorpsiyon / iyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometresi/Spektrometrisi
ON	Oligonükleotit
PDI	Perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit
PT-5	Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)
PT-6	Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)
Q/TOF	Dört kutuplu uçuş zamanlı
ssDNA	Tek iplik DNA
THAP	2,4,6-Trihidroksiasetofenon monohidrat
TIMS	Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi
TOF	Uçuş zamanlı
UV/Vis	Ultraviyole-görünür bölge

1. GİRİŞ

DNA; replikasyon, transkripsiyon, protein kodlaması ve hücre bütünlüğünün yanı sıra kalıtım için genetik bilgiyi taşımada anahtar bir moleküldür ve ilaçların özelliklerini araştırmak için birincil farmakolojik hedef olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [1],[2]. DNA'nın ilaçlarla etkileşimi üzerine yapılan çalışmalar, farmasötik araştırmalar için aktif bir alan oluşturmıştır. DNA ve ilaç molekülleri arasındaki etkileşim mekanizmalarının açıklanması, yeni tip moleküllerin akılcı tasarımı hakkında bilgi edinmek için gereklidir. Bu nedenle, bağlanma modunu ve bunun ilaç aktivitesi ve toksisite ile ilişkisini anlamak elzemdir [1].

İlaçlar, ligandlar ve kimyasallar gibi küçük moleküller, DNA ile kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla etkileşime girmektedirler. Kovalent etkileşimler DNA'da tersinmez olan ve hücre ölümüne neden olan kimyasal değişikliklere yol açmaktadır. Kovalent olmayan etkileşimler, kovalent etkileşimlere kıyasla daha zayıf olan moleküller arası kuvvetlerdir. DNA yapısı, kovalent olmayan etkileşimler için çoğunlukla tersinirdir. İlaç ve DNA molekülleri arasında elektrostatik bağlanma, interkalasyon ve yarık bağlanma (majör ve minör yarıklar) etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimler gerçekleşmektedir. Elektrostatik etkileşim, DNA'nın anyonik fosfat omurgası ile küçük moleküllerin pozitif yükleri arasındaki etkileşimler kaynaklı oluşmaktadır. İnterkalatörler, van der Waals, hidrojen bağı veya hidrofobik etkileşimler gibi farklı bağlanma türleriyle çift iplik DNA yapısına istiflenen moleküller olup kararlı bir DNA- interkalatör kompleksi oluşturmaktadırlar. DNA çift sarmalında minör ve majör olmak üzere iki tane yarık bulunmakta olup bu yarıklar moleküllerin DNA'ya bağlanması için yer oluşturmaktadırlar. Yarık bağlanmada ise, küçük moleküller DNA'nın bazları ile hidrojen bağı [3] veya van der Waals etkileşimleri gibi moleküller arası kuvvetler yoluyla etkileşime girmektedirler. İnterkalasyon ve yarık bağlanma, küçük moleküllerin doğrudan ve seçici olarak çift iplik DNA'ya bağlandığını göstermektedir.

DNA ile küçük moleküllerin etkileşimleri birçok yöntemle izlenebilmekte olup moleküler modelleme [4],[5], ayak izi (foot-printing) [6], Nükleer Manyetik Rezonans [7], Kütle Spektrometresi [8], FTIR [9], Raman Spektroskopisi [1], Kapiler Elektroforez [10], Yüzey Plazmon Rezonansı [11], Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi [12],

Floresans Spektroskopisi [13] ve kolorimetri [14] gibi teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Platin, biyouyumluluk, elektriksel iletkenlik, radyoopasite ve dayanıklılık gibi üstün özelliklerinden dolayı tıpta aktif olarak kullanılmaktadır [15]. Kanser hala tüm dünyada insan sağlığı için önemli bir sorundur. Antikanser ilaçların en aktif sınıfı olan cis-platin, karboplatin ve oksaliplatin dünya çapında klinik olarak çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Geniş bir antitümör aktivite spektrumu sergileyen bu antikanser ilaçlarının klinik uygulamalarının önündeki başlıca engeller; yan etkiler, toksisite (nefrotoksisite) ve ilaç direnci olarak sayılabilir [16]. Bu engelleri ortadan kaldırabilmek için platin kompleksleri üzerine çok sayıda çalışma yürütülmektedir. DNA hedefli antitümör platin komplekslerinin araştırılması, toksisitesi az, ilaç direnci düşük ve etkinliği daha yüksek yeni nesil platin bazlı komplekslerin keşfedilmesi için umut verici çalışmalardır. Cis-platin (cis-diamindiklorplatin(II)) yapısı testis, yumurtalık, mesane, akciğer, mide gibi çeşitli kanser türlerinde dikkate değer bir kematerapötik potansiyel sergileyen en etkili antikanser ajanlarından biridir. Bir antitümör ilaç olarak cis-platinin başarısı, daha iyi farmakolojik özelliklere sahip yeni metal komplekslerinin arayışını motive etmiştir. Uzun zamandır platin kimyasının ana hedefi cis-platin ve türevlerinden daha az ciddi yan etkiye sahip veya cis-platine dirençli tümörlerin tedavisi için geniş bir kapsama sahip yeni ilaçların tasarımına yönelmiştir.

Çeşitli hastalıkların tedavisinde platin (II) ve türevleri haricindeki farmakolojik potansiyele sahip türler arasında paladyum (II) bileşikleri, esas olarak paladyum (II) ve platin (II) bileşikleri arasında var olan yapısal analogi nedeniyle özel ilgi görmektedir [15],[17]. Paladyum (II) bileşikleri sitotoksiteleri, seçicilikleri ve çözünürlükleri nedeniyle platin ilaçlarla rekabet eder [15]. Paladyum komplekslerinin yapısal kararlılığı ve değişkenliği, paladyum (II)'yi terapötik metallerin araştırılmasında tercih edilen metal haline getirmiştir. Ayrıca, paladyum (II) bileşiklerinin mutajenik olmadığı ve bu nedenle terapötiklerde uygulama için güvenli olduğu gösterilmiştir [15],[18].

Heterosiklik yapılar, organik kimyada olduğu kadar tıbbi alanda da merkezi bir rol oynamaktadır. Azot heterosiklikleri, birçok doğal ve sentetik molekülle benzerlikleri nedeniyle çeşitli farmakolojik aktiviteler sergiler. Bu yapısal benzerlik nedeniyle canlı sistemlerin biyomolekülleri ile kolayca etkileşime girebilirler [19]. Benzimidazol yapısı,

DNA nükleotitlerinin yapısında bulunan pürinlerle belirli bir kimyasal analojiye sahip olmaları sebebiyle avantajlı bir bileşik olup güçlü biyolojik aktivite sergileyerek nükleik asit sentezini engellemektedir. Benzimidazol ligandları ile metallerin kombinasyonu ve etki mekanizmaları klinik deneylerde çalışılan antikanser ilaçların tasarımında önemli faktörlerdir. Raporlanan sonuçlara göre koordinasyon komplekslerinin incelenen metal iyonundan bağımsız olarak benzimidazol ligandına göre sitotoksik veya hücre büyümesini engelleyen (antiproliferatif) aktiviteyi her zaman arttırdığı gözlenmiştir [15].

Perilen diimit türevleri, hastalıkların erken teşhisinde ve antikanser ve antibakteriyel etkilerde büyük potansiyel göstermektedir [20]. İn vivo deneyler, perilen diimitlerin normal hücreler üzerinde daha az yan etki ile kanser hücrelerini ve tümörleri baskılamak için iyi bir kapasiteye sahip olduğunu desteklemektedir [21]. Üstün kimyasal ve foto kararlılıkları nedeniyle yüksek floresan özelliğe sahip olan perilen diimitler, polar olmayan çözücülerde pigment renklendiriciler olarak uzun yıllardır kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır [21]–[23].

Son yıllarda, fonksiyonel perilen dimitlerin potansiyel biyo-uygulamalarını keşfetmek, biyokimyanın ön saflarında popüler bir araştırma alanıdır. 1,8-naftalimid, naftalin diimitler, akridinler, amonafid, etidyum bromür, daunomisin ve doksorubisin gibi birçok aromatik ve düzlemsel mutajen, DNA'nın iki bitişik baz çifti arasındaki boşluğa interkalasyon yapabilir. İnterkalasyon yoluyla etkileşim ile hem DNA transkripsiyonu hem de replikasyonu inhibe edilir fakat bu interkalasyon sitotoksikite ve mutasyonlara neden olur.

Perilen dimitler; sert ve tamamen düzlemsel bir aromatik nano-iskelet içermekte olup son yıllara kadar biyo-görüntüleme ve anti-kanser ajanı olarak kullanımlarıyla ilgili fazla araştırma yapılmamıştır [21],[22]. Perilen dimit ve DNA arasındaki kovalent olmayan etkileşimler nadiren rapor edilmiştir [24]. Bu kompleks yapıların interkalasyon kabiliyeti; koordinasyon geometrisi, ligand verici atom tipi ve metal iyon tipi ile ilişkilidir. Bununla birlikte, DNA interkalatörlerinin boyut, şekil ve elektrik yükleriyle ilgili moleküler özellikleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, farklı boyut, şekil ve elektrik yüklerine sahip fonksiyonel perilen dimitleri sentezlemek ve bunların DNA interkalatörleri olarak kullanımlarını araştırmak ve hücrel dağılımlarını ve antikanser aktivitelerini araştırmak büyük ilgi çekmektedir [21],[22].

Ticari olarak birçok küçük molekül interkalatörü bulunmakta olup Etidyum Bromür DNA'ya sıkıca bağlanan ve güçlü floresan doğası nedeniyle farklı biyolojik deneylerde DNA'yı etiketlemek için kullanılan en bilinen interkalatörlerden biridir. Etidyum bromür güçlü bir boya olmasına rağmen orta derecede toksisiteye sahip güçlü bir mutajen olarak kabul edilir [25]. Alternatif boyalar, EtBr'ye eşit veya daha fazla hassasiyet iddia etse de, fiyat ve hassasiyet açısından büyük farklılıklar göstermektedir. Piyasada etidyum bromüre alternatif olarak farklı bağlanma türlerine, toksisiteye, hassasiyete, kararlılığa, optik özelliklere sahip birçok ticari boya bulunmakta olup bunların en yaygın kullanılanları; Methylene blue (metilen mavisi), Crystal violet (kristal mor), SYBR safe, Gel Red isimli boylardır. Diğer bir alternatif boya olan Akridin turuncusu yüksek membran geçirgenliğine sahip olup bu mutajen boya tarafından DNA hasarının güçlendirildiği gösterilmiş ve sitotoksitesinden dolayı anti-tümör ajanı olarak bile kullanımı önerilmiştir [26].

Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimi literatürde kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup DNA ile çok iyi bağlanma gösteren benzimidazol temelli yeni nesil metal kompleksleri ve perilen diimide türevleri kullanılarak yapılan DNA görüntülenmesi hakkında birçok çalışma yer almaktadır [20],[22],[24],[27]–[36]. DNA sarmalının içinde bulunan hidrofobik yapı, moleküllerin floresans özelliklerinde büyük değişikliklere yol açmaktadır. DNA ile etkileşime girdiğinde floresan özelliğinde değişiklik kazanan birçok maddenin DNA görüntüleme, teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanımı literatürde geniş yer tutmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, bu maddelerin florometrik yöntemlerle çok düşük derişimlerde analizleri yapılabilmektedir. Floresans katsayısı yüksek olan bileşikler çok küçük miktarlardaki tayine olanak verebilmektedir.

Molekül-DNA etkileşimlerini araştırmak için onların DNA-bağlanma modunu bulmak küçük molekül tasarımı için önemli olan yapı-aktivite faktörlerini belirlememizi sağlamaktadır. Küçük moleküller ile DNA etkileşimlerini kapsamlı bir şekilde aydınlatmak ve elde edilen verileri hücresel yanıtlarla birleştirmek teşhis ve tedavi amaçlı kullanım basamaklarının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

Literatürde çok geniş bir şekilde gerçekleştirilen çalışmalara rağmen günümüzde hem DNA görüntüleme hem de DNA ile etkileşime girip değişik özellikler yaratacak değişik molekül ve geçiş metal kompleksleri ile ilgili hala yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Tez

alışmaları kapsamında, DNA ile kompleks yapan perilen dimit türevi bileşikler ve benzimidazol temelli metal içeren bileşikler sentezlenerek bunların DNA ile bağlanma stokiyometrilerinin, kararlılıklarının, bağlanma bölgelerinin ve etkileşim mekanizmalarının tayini ile ilgili alışmalar ESI-MS ve MALDI-MS ile incelenmiştir. Bağlanmanın uygun olduğu kompleks yapıların absorbans değışiklikleri UV-Vis Spektroskopisi ile ve floresans verimleri Floresans Spektroskopisi ile izlenmiştir. Ayrıca sentezlenen bu yapıların Agaroz Jel Elektroföresi yönteminde sensör-boyar madde olarak kullanımı ve DNA görüntölemesinde, teşhisinde kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiş olup bu boyar maddelerin Etidyum Bromür yerine alternatif görüntöleme ajanları olarak kullanılıp kullanılamayacağı tartışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomoleküller ve Biyomoleküler Süreçler

İnsan vücudu, toplu olarak yaşamın temel işlevlerini yerine getiren yaklaşık otuz trilyon hücreden oluşmaktadır. Hücreler, içlerinde bulunan çeşitli organik moleküllerin yardımıyla bu yaşamı sürdürme görevlerini yerine getirebilmektedirler. Bu organik moleküllere biyomoleküller denmektedir. Biyomoleküller çok çeşitli boyutlara ve yapılara sahiptir ve çok çeşitli yaşamsal süreçlerde yer almaktadırlar. Birincil elementleri karbon, hidrojen, oksijen, fosfor ve sülfür olan yirmi beşten fazla doğal elementten oluşmaktadırlar [37].

Vücut fonksiyonunu düzenlemek için bir hücrede yaklaşık 10.000 ile 100.000 molekül bulunmaktadır. Ancak karbonhidratlar, yağlar, nükleik asitler ve proteinler olarak dört ana biyomolekül türü bulunmaktadır. Diğer bileşiklerin çoğu, bu ana birincil bileşiklerin türevleridir. Her biyomolekülün kendine has özellikleri vardır ve yaşam için gerekli olan bazı özel işlevleri yerine getirmek üzere tasarlanmıştır [38].

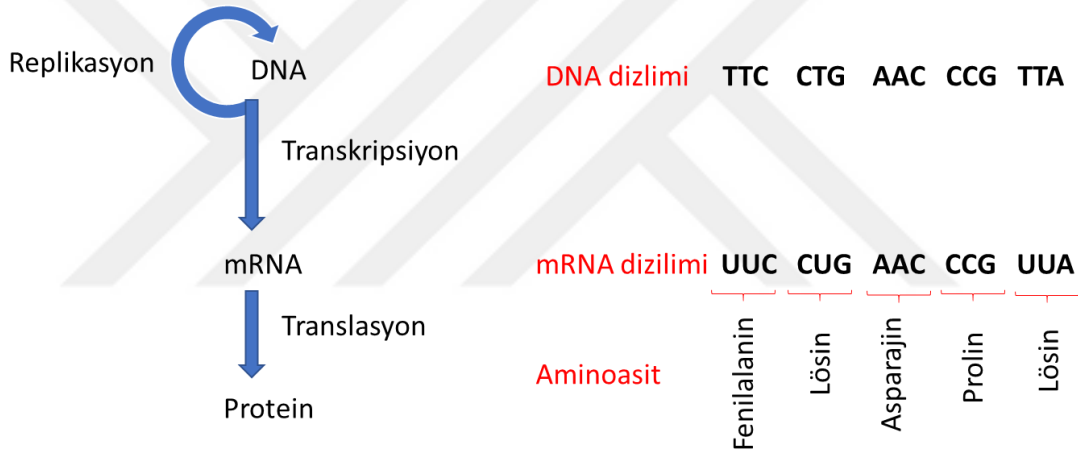
Nükleik asitler, hücrelerde ve virüslerde bulunan makromoleküller olup genetik bilginin depolanması ve transferinde yer almaktadırlar. Nükleik asitler doğasına, yapısına ve işlevine göre Deoksiribonükleik asitler (DNA) ve Ribonükleik asitler (RNA) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Nesillere aktarılması gereken tüm bilgileri depolayan genetik materyal olan nükleik asitler tüm canlı organizmaların ve virüslerin biyolojik gelişimini belirlemektedir.

RNA tüm canlı hücrelerde bulunan bir nükleik asittir. Farklı organizmalarda farklı rollere sahip olan bu materyal bazı virüslerde genetik materyal görevi görmekte diğer organizmalarda enzimatik aktivite göstermektedir. Organizmalar arasında üç tip RNA bulunmakta olup bunlar; ribozomal RNA (rRNA), mesajcı RNA (mRNA) ve taşıyıcı RNA (tRNA) olarak adlandırılmaktadır. Üçünün de yaşamın gelişmesinde ve sürdürülmesinde temel rolleri bulunmaktadır.

Nükleik asitler; DNA ve RNA, canlıların işlevlerini yerine getiren RNA ve proteinleri yapmak için hücrelerde okunan genetik bilgiyi taşımaktadırlar. DNA, canlı hücrelerdeki en önemli moleküllerden biridir. Yaşam için kullanım kılavuzunu kodlayan genetik bir materyaldir. Bir hücredeki genetik materyal taşıdığı bilgilerin kalıtımına izin veren DNA

replikasyonu yoluyla kopyalanabilir ve genetik devamlılık sağlanarak sonraki nesillere aktarılabilir. Bilgi akışı DNA'dan RNA'ya ve ardından proteine doğrudur. DNA'daki bilgilerin büyük bir kısmı önce mRNA'ya kopyalanır ve ardından proteinlere çevrilir [39].

DNA'nın tek ipliği üzerindeki üç bazlı nükleotit dizilerine “kodon” denilmektedir. Kodonlar ise proteinleri oluşturan farklı yapıdaki aminoasitleri kodlamaktadır. RNA polimeraz enziminin görevi DNA çift sarmal yapısını oluşturan iki ipliği ayırarak sonrasında tek ipliği okuyup nükleotit dizisini kopyalayarak DNA'dan mRNA oluşturmaktır. Bu sürece transkripsiyon basamağı denilmektedir. Translasyon basamağında ise mRNA'nın taşıdığı genetik kod, ribozomlar tarafından aminoasitlerden proteinlere dönüştürülmektedir. Şekil 2.1'de DNA'dan yola çıkarak protein sentezinin basamaklarının şematik bir gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 1. DNA'dan protein sentezi basamaklarının şematik gösterimi

RNA ve DNA'nın önemi kıyaslanamaz. Genetik bilgiyi taşıyan DNA, çekirdeği terk edemez ve bu nedenle RNA, transkripsiyon ve çekirdeğin dışında gerçekleşen translasyon süreçleri yoluyla protein sentezi için genetik bilginin transferinde yer almakta ve gen ekspresyonunu da kontrol etmektedir [37].

Proteinler ise, amino asit kalıntılarının dallanmamış polimerleridir. Konumlarına ve işlevlerine göre proteinlerin sentezinde yer alan yaklaşık yirmi iki amino asit bulunmaktadır. Proteinler organizmaların temel bileşenleri olup hücrelerdeki hemen hemen her sürece katılmaktadırlar. DNA replikasyonu, hücre sinyali, metabolik reaksiyonları katalize etme, hücre ve doku yapılarının inşası ve moleküllerin bir yerden

bir yere taşınması gibi süreçlerde yer almaktadırlar. Fonksiyonel özelliklerine göre yapısal proteinler, enzimler, hormonlar, solunum pigmentleri, taşıyıcı proteinler, motor proteinleri, depolama proteinleri, toksinler şeklinde sınıflandırılmaktadırlar.

Yaşamsal olaylar, nesilden nesile miras kalan genetik bilgi tarafından düzenlenen bir dizi ve bir kimyasal reaksiyonlar ağıdır. Genetik bilginin kendisi bir dizi kimyasal işlemle üretilmekte ve iletilmektedir. Bu reaksiyonların her birinde, biyokimyasal reaksiyonları çözümlerdeki sıradan kimyasal reaksiyonlardan ayıran bazı karakteristik süreçler gerçekleşmektedir. Bu süreç genellikle “moleküler tanıma (molecular recognition)” olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, enzimatik reaksiyonun meydana gelmesi için, "enzim-substrat kompleksi" oluşturmak amacıyla substrat moleküllerinin ilk olarak protein tarafından reaksiyon sürecinde barındırılması gerekir. Moleküler tanıma süreci son derece seçici ve spesifiktir ve spesifiklik kadar seçicilik de canlı sistemlerin yaşamlarını sürdürmelerinin anahtarıdır [40].

Biyomoleküler tanıma, biyomoleküllerin genellikle oldukça spesifik, yüksek afiniteli ve tersinir moleküler hedeflerini tanıdığı ve bunlara bağlandığı süreçtir. Çok çeşitli teşhis ve sentetik teknolojilerde kullanılmaktadır. Biyomoleküler tanıma, tipik olarak uyum içinde çalışan birçok zayıf etkileşim tarafından yönlendirilmektedir. Bu etkileşimlerin en önemlileri (i) kalıcı yükler, dipoller ve dörtlü kutuplardan kaynaklanan elektrostatik etkileşim, (ii) indüksiyon ve dağılma kuvvetlerine yol açan etkileşim ortağı tarafından yük dağılımlarının polarizasyonu, (iii) Pauli ilkesinden türetilmiş atomlar arası itme ve (iv) büyük ölçüde çözücünün entropisinden kaynaklanan ve hidrofobik etki olarak adlandırılan güçlü, "çekici" kuvvetlerdir. Sulu ortam, elektrostatik ve indüksiyon etkileşimlerinin etkisini önemli ölçüde azalttığından, hidrofobik etki genellikle doğru biyomolekül-hedef komplekslerinin oluşum kararlılığını sağlayan baskın güçtür. Diğer etkiler ise, iki etkileşim ortağı arasında ideal olmayan bir etkileşim ağının kurulacağı bağlanma olaylarını kararsızlaştırarak makromolekülün hedefine yönelik spesifikliğini tanımlamada önemlidir [40].

Moleküler tanıma, moleküller arasındaki spesifik bağın sürecini ifade eder. Bu moleküllerden biri genellikle bir makromolekül veya moleküler birleştirmedir (molecular assembly), diğeri ise küçük bir molekül veya başka bir makromolekül (ligand, analit) olmak üzere bağlandığı hedef moleküldür. Bu tür komplekslerin oluşumunu yönlendiren kuvvetleri ve bu kuvvetlerin etkileşen moleküllerin fiziksel özellikleri ve çevreleriyle

nasıl ilişkili olduğunu anlamak, belirli, istenen şekillerde etkileşime giren moleküllerin ve malzemelerin rasyonel tasarımına izin vermektedir [41].

Biyomoleküller, organizmaların büyümesine, devam etmesine ve çoğalmasına yardımcı olduğu için yaşamsal hayati öneme sahiptir. Birbirleriyle etkileşime girerek, tek hücrelerden insanlar gibi karmaşık canlılara kadar organizmaların inşasında yer almaktadırlar. Şekil ve yapılarındaki çeşitlilik ile birlikte işlevlerinde de çeşitlilik sağlanmaktadır. Biyolojik moleküllerin birçok işlevi hala bir sırdır ve daha fazla molekül keşfetmek ve yaşamı sürdürme süreçlerindeki rollerini anlamak için güncel ileri teknikler kullanılmaktadır [38].

2.2. DNA Yapısı ve Fonksiyonu

1940'larda, DNA'nın kimyasal olarak birbirine benzeyen sadece dört tip alt birimden oluşan uzun bir polimer olduğu bilgisi bilinmekteydi. Görünürdeki kimyasının basitliği nedeniyle biyologlar o yıllarda DNA'yı genetik materyal olarak kabul etmekte zorlandılar [42]. 1952'de Rosalind Franklin, bir X-ışınları demetinin saf bir DNA lifinden saçılma şeklini görüntüleyerek DNA'nın üç boyutlu yapısı hakkında bilgi veren 51. X-ışını kırınım modelini fotoğrafladı [43]. Erken X-ışını kırınım sonuçları, DNA'nın bir sarmal halinde sarılmış iki polimer dizisinden oluştuğunu gösterdi. DNA'nın çift sarmallı (double-stranded DNA) olduğu gözlemi çok önemliydi ve DNA'nın Watson-Crick yapısına yol açan başlıca ipuçlarından birini sağlayan bu model ile birlikte DNA'nın replikasyon ve bilgi kodlama potansiyeli ortaya çıktı [42]. Franklin'in 51. Fotoğrafı (Photo 51), bilim adamlarının DNA'nın üç boyutlu yapısı hakkında daha fazla bilgi edinmelerine yardımcı oldu ve bilim adamlarının DNA'nın kalıttaki rolünü anlamalarını sağladı [43].

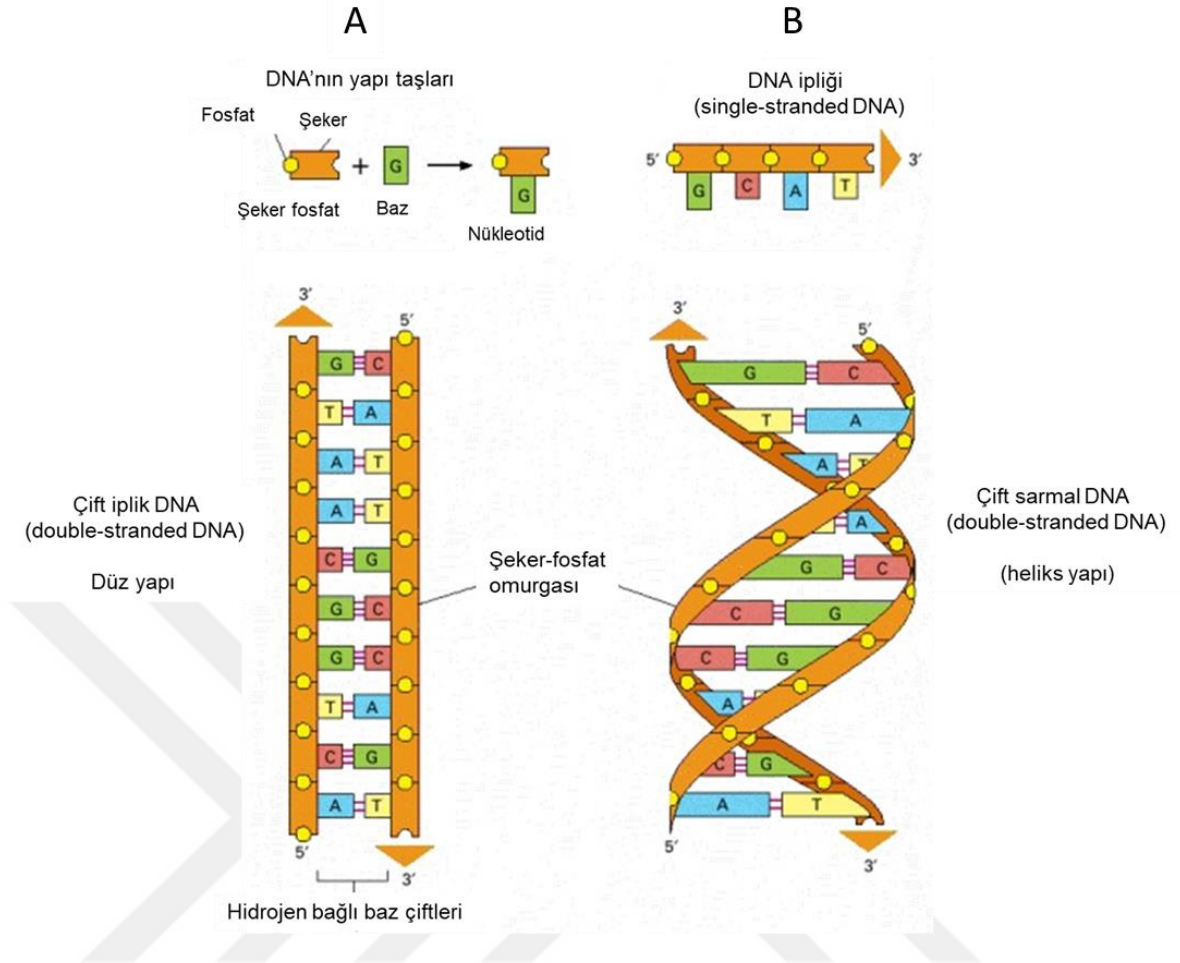
Bir DNA molekülü, dört tip nükleotit alt biriminden oluşan iki uzun polinükleotit ipliğinden oluşmakta olup bu ipliklerin her birine bir DNA ipliği (single-stranded DNA) adı verilmektedir. Nükleotitler, bir veya daha fazla fosfat grubunun bağlı olduğu beş karbonlu bir şeker ve azot içeren bir bazdan oluşan DNA'nın alt birimleri olup şekerler ve fosfatlar aracılığıyla bir zincirde birbirlerine kovalent olarak bağlanırlar. Fosfodiester bağı olarak adlandırılan bu kovalent bağ ile ardışık iki şekerden birinin 3. karbon atomu ile diğerinin 5. karbon atomu arasındaki fosfat grubunun bağ oluşturmasıyla şekerler birbirine bağlanır. Böylece bir iplikte bitişik konumda bulunan nükleotitler birbirlerine

kovalent olarak bağlanır ve bu bağlanma türü şeker-fosfat-şeker-fosfat omurgasını oluşturur.

DNA'daki şeker, tek bir fosfat grubuna bağlı 5 karbonlu 2-deoksiriboz şekerdir. Her bir şeker grubuna, azot içeren molekül yapısına sahip adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve timin (T) adı verilen nükleobaz yapıları bağlanır [42]. Bu dört bazın şeker-fosfat grubuna bağlanması ile nükleotitler meydana gelir. Bu nükleotitler; adenozin monofosfat, guanozin monofosfat, sitidin monofosfat, timidin monofosfat olarak adlandırılırlar. DNA'nın bir ipliğinde yer alan bir baz ile diğer iplikteki tümleyici (komplementer) bazı ile hidrojen bağı kurarak eşleşir. Adenin nükleobazı sadece timin nükleobazına, sitozin nükleobazı ise sadece guanin nükleobazı ile bağlanır. DNA'nın çift sarmal yapısında birbirleriyle karşılıklı olarak eşleşerek bağlanan iki baza bir baz çifti denilir. Nükleotitlerin eşleştirilmiş baz kısımları arasındaki hidrojen bağları iki ipliği bir arada tutar ve böylelikle çift sarmal DNA zinciri oluşur.

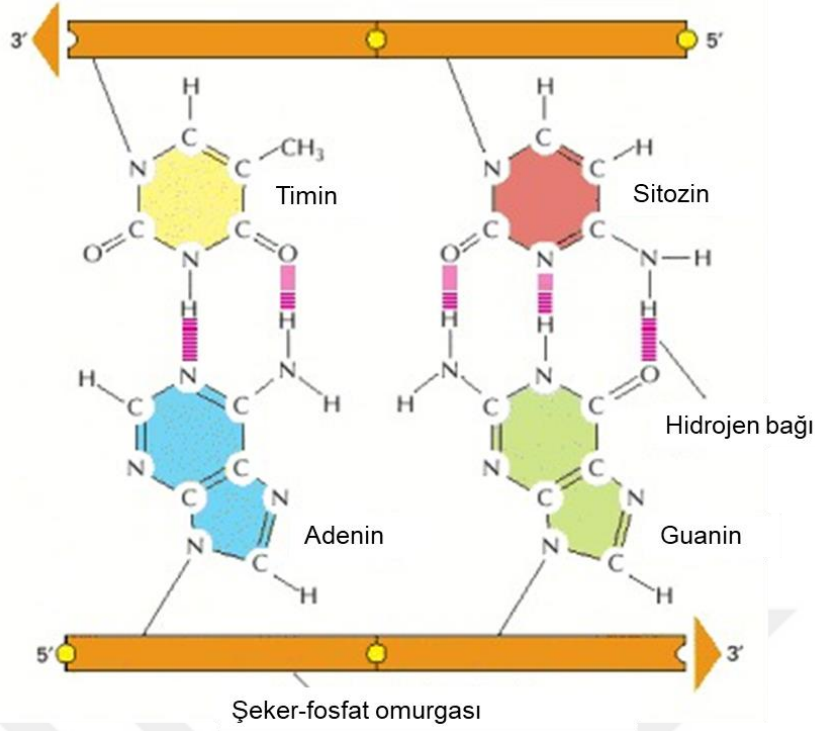
Fosfodiester bağı ise asimetrik bir yapıya sahip olup bu durum her bir DNA ipliğinin bir yönü olmasına neden olmaktadır. Çift sarmal DNA yapısında bir iplikte bulunan nükleotitlerin birbirleri ile bağlanma yönleri diğer iplikte yer alan nükleotitlerin yönlerinin tam tersidir. Şekil 2.2.A'da DNA molekülü çift iplik şeklinde düz olarak gösterilmiştir ancak gerçekte birbirine antiparalel olarak çalışan iki iplik B'de gösterildiği gibi çift sarmal (heliks) şeklinde bükülür [44].

DNA'nın çift sarmal üç boyutlu yapısı, iki polinükleotid ipliğinin kimyasal ve yapısal özelliklerinden kaynaklanır. Bu iki iplik, farklı ipliklerdeki bazlar arasındaki hidrojen bağı ile bir arada tutulduğu için, tüm bazlar çift sarmalın iç kısmında, şeker-fosfat omurgaları ise dış tarafta yer almaktadır. Şekil 2.2.B'de bu durumu görülmektedir.



Şekil 2. 2. A) Çift iplik DNA (düz yapı), B) Çift sarmal DNA (heliks yapı) [44]

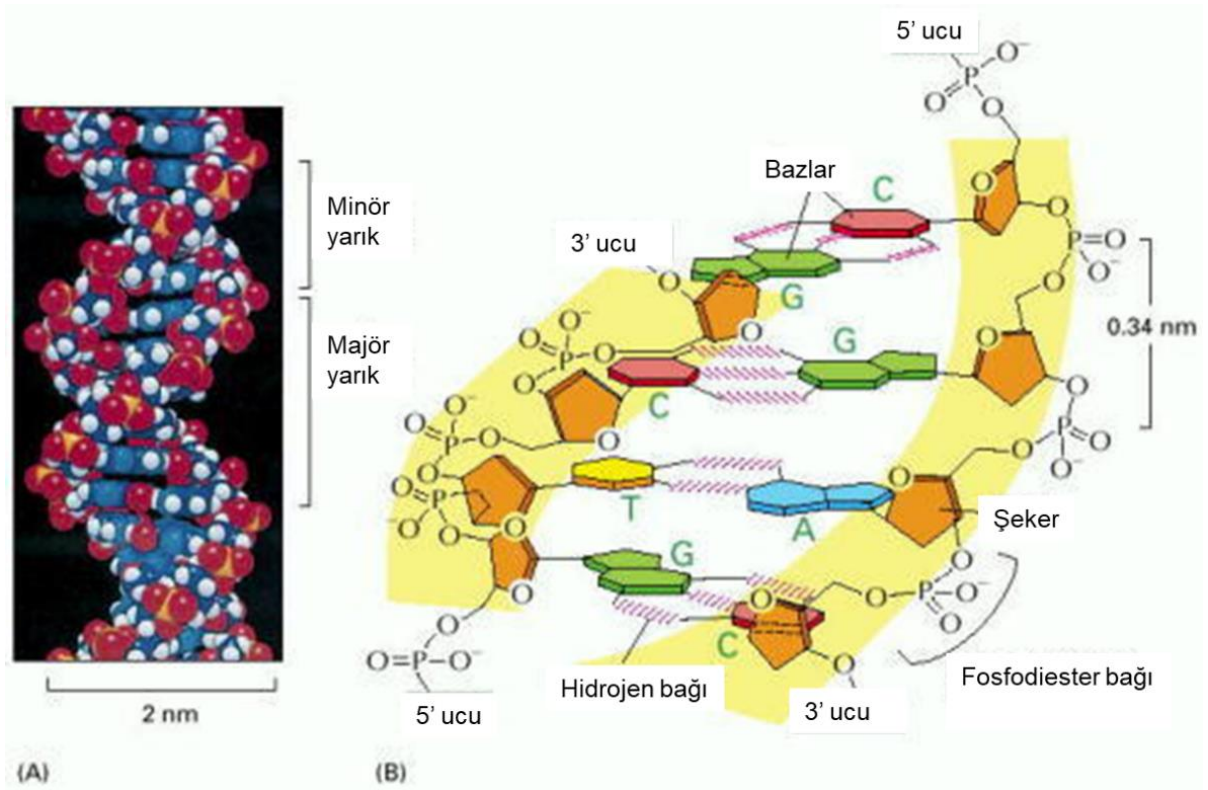
Nükleobazlar iki türde sınıflandırılmakta olup adenin ve guanin beş ve altı üyeli halkaların kaynaşmasından oluşan heterosiklik yapıda pürin türevi bileşikler, sitozin ve timin, altı üyeli halka yapıda pirimidin türevi bileşiklerdir. Birbirleri ile etkileşen iki baz çifti arasında oluşan hidrojen bağı sayıları farklılık göstermekte olup adenin ve timin baz çiftleri (AT) arasında iki hidrojen bağı, guanin ve sitozin baz çifti (GC) arasında 3 hidrojen bağı oluşmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda guanin sitozin (GC) baz çiftinin, adenin timin (AT) baz çiftinden daha kuvvetli yapıda olduğu yorumu yapılabilir. Hidrojen bağları kovalent bağlara kıyasla zayıf etkileşimler olmaları sebebiyle kolaylıkla kopup tekrar oluşabilir. Bu sebeple çift sarmal DNA'nın içerdiği birbirinin tamamlayıcısı olan iki iplik mekanik güçle veya yüksek sıcaklık altında fermuar gibi açılarak kolaylıkla birbirinden ayrılabilir [45]. Şekil 2.3'te baz çiftlerinin bağlanmasının şematik bir gösterimi yer almaktadır [44].



Şekil 2. 3. Baz çiftlerinin bağlanmasının şematik gösterimi [44]

DNA yapısının bağlanma özellikleri, çift sarmalı oluşturan GC baz çiftlerinin yüzde oranı ve sarmal uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yüzde olarak yüksek oranda guanin-sitozin baz çifti içeren uzun çift sarmal DNA'daki iplikler birbirlerine daha kuvvetli şekilde bağlı olup oransal olarak daha yüksek adenin-timin baz çifti içeren kısa çift sarmal DNA'daki iplikler ise birbirleriyle daha zayıf etkileşirler [46]. Ayrıca, DNA zincirinin baz diziliminden bağımsız olarak çift sarmal yapısının kararlılığı hidrofobik etkileşimler ve π istiflenmesine de bağlıdır.

Tamamlayıcı baz eşleşmeleri, baz çiftlerinin çift sarmalın iç kısmında enerji açısından en uygun düzenlemede paketlenmesini sağlar. Bu düzenlemede, her baz çifti benzer genişliktedir, böylece şeker-fosfat omurgalarını DNA molekülü boyunca eşit mesafede tutar. Baz çifti paketlenmesinin verimliliğini en üst düzeye çıkarmak için, iki şeker-fosfat omurgası, yaklaşık her on baz çiftinde bir tam dönüşle bir çift sarmal oluşturmak üzere birbirinin etrafında dolar. Şekil 2.4.A'da DNA çift sarmalının dönüşü ile oluşan minör ve majör yarıklar gösterilmekte, B'de ise baz çifti eşleşmelerini, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlanmayı, fosfodiester bağlanmasını da içeren çift sarmal DNA'nın kısa bir bölümünün şematik gösterimi yer almaktadır [44].



Şekil 2. 4. A) Minör ve majör yarıklar, B) Çift sarmal DNA'nın kısa bir bölümünün şematik gösterimi [47]

DNA'nın her dönüşü 10.4 nükleotit çiftinden oluşur ve bitişik nükleotit çiftleri arasındaki merkezden merkeze mesafe 0.34 nm'dir. İki ipliğin birbirinin etrafına sarılması, çift sarmalda iki yarıklar oluşturur [44]. Şekil 2.4.A'da gösterildiği gibi, daha geniş olan boşluğa majör yarıklar, daha küçük olana ise minör yarıklar denir.

Nükleotitler, bir şekerin 3'-hidroksil grubu ve diğerinin 5'-fosfat grubu aracılığıyla fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak birbirine bağlanmakta böylece, her polinükleotit ipliğin bir kimyasal polaritesi oluşmakta olup ipliklerin her iki ucu kimyasal olarak farklıdır. 3' uç, şeker halkası üzerindeki 3' konumuna bağlı bağlantısız bir -OH grubu taşımakta 5' uç ise şeker halkası üzerindeki 5' konumuna bağlı bir serbest fosfat grubu taşımaktadır.

2.3. Kovalent Olmayan Etkileşimler

Kovalent olmayan etkileşimler doğada her yerde bulunan ve kimyasal sistemlerin uyumuna, bütünlüğüne katkıda bulunan etkileşim türleridir. Kovalent bağlarla karşılaştırıldığında, genel olarak, molekül içi ve moleküller arası kovalent olmayan

etkileşimler bölgesel olarak zayıflardır. Bu bağlar kovalent bağlara kıyasla çok daha düşük enerji ve bağ yönlülüğü sergilemektedirler. Bununla birlikte, birçok durumda bu etkileşimler, yapıların sentez, kataliz ve tasarımında toplu olarak baskın rol oynayabilmektedirler. Kovalent olmayan etkileşimler genellikle bağların ve etkileşimlerin alt sınıflarında sınıflandırılmaktadır. Kovalent etkileşimlerden farklı olarak, kovalent olmayan etkileşimler elektron paylaşımını içermezler ve genellikle çekici-itici kuvvetleri (attractive and repulsive forces) kapsarlar [48]. Bu kuvvetler sayesinde etkileşimler zayıf olarak gerçekleşir görev tamamlandıktan sonra etkileşim ortadan kalkıp yeni bir etkileşim başlatmak üzere görev alırlar. Aksi takdirde kovalent etkileşimler olsaydı etkileşimden sonra orijinal bileşiklere dönüş olmayacak ve yeni etkileşim için yeni bileşiklerin sentezinin yapılması gerekecektir. Bu durum ise biyolojik sistemlerin tıkanmasına neden olacaktır.

En yaygın kovalent olmayan etkileşim türleri ve tez çalışmaları kapsamında görülen etkileşim türleri aşağıda açıklanmaktadır.

2.3.1. Elektrostatik Etkileşimler

Elektrostatik etkileşimler, yüklü moleküller arasında (iyon-iyon) etkileşimleridir. Bu etkileşimler 50-350 kJ/mol enerjiye sahiptir. Etkileşim enerjisi, Coulomb Yasası'na göre hesaplanmakta olup Eşitlik 2.1'de Coulomb Yasası'nın denklemsel gösterimi verilmiştir.

$$V = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \quad \text{Eşitlik 2.1}$$

Burada q_i ve q_j yüklerin büyüklüğü, r_{ij} iki yük arasındaki uzaklık, ϵ_0 vakumdaki geçirgenlik, ϵ_r ise yüklerin bulunduğu ortamdaki bağıl dielektrik sabiti olarak adlandırılmaktadır. Eşitliğe göre, iki yük arasındaki etkileşimin çekici veya itici kuvvetler ile sağlandığını söyleyebiliriz. İki iyon arasındaki uzaklık arttığında bağ kuvveti azalır. Ayrıca, ϵ_r sabitinin kısmi elektriksel etkileşim kuvvetleri üzerinde önemli etkisi vardır. van der Waals kuvvetleri ile birlikte, polar ortamda elektrostatik etkileşimin büyüklüğü azalma gösterir. Elektrostatik etkileşim, kovalent olmayan etkileşimler içerisinde en kuvvetli olanıdır ve biyomoleküller ile kompleks oluşumunda önemli rol oynamaktadır [48].

2.3.2. İyon-Dipol Etkileşimleri

İyon-dipol kuvvetleri bir iyon ve bir polar molekülün etkileşiminden meydana gelir. Polar molekül üzerindeki kısmi yükler ile zıt yükteki iyonlar arasında etkileşim gerçekleşmektedir. Örneğin sodyum klörür gibi iyonik bir bileşiğin sulu çözeltisinde sodyum iyonu komşu su moleküllerinin üzerindeki (oksijende) kısmi negatif yüklerle ve klor iyonu ise komşu su moleküllerinin üzerindeki (hidrojende) kısmi pozitif yüklerle etkileşime girerler. İyonların etrafını saran çözücü molekülleri bir kabuk oluşturarak iyonların örgü (lattice) enerjisine karşı yeterli kararlılıkta olmasını sağlar. İyon-indüklenmiş dipol kuvvetleri ise bir iyon ve bir apolar molekülün etkileşiminden meydana gelmektedir. Tıpkı dipol-indüklenmiş dipol kuvveti gibi, iyonun yükü apolar molekülün üzerindeki elektron bulutunun biçimlenmesine neden olur. İyon-dipol ve iyon-indüklenmiş dipol kuvvetleri, dipol-dipol etkileşimlerinden daha kuvvetlidir çünkü herhangi bir iyonun yükü, bir yönelmiş dipol yükünden çok daha büyüktür [48].

2.3.3. Hidrojen Bağı

Hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimin özel bir türü olup genellikle, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf fakat van der Waals kuvvetlerinden daha kuvvetli bir bağlanmadır. Hidrojen bağı, moleküllerin bir araya gelip bağ oluşturması (self-assembly) ve moleküler tanımlama (molecular recognition) sistemlerinde karşımıza çıkan ideal bir etkileşim türüdür [48]. Bu bağlanma, her ikisi de elektronegatif olan atomların elektron çiftlerini kullanarak heteroatoma bağlı hidrojen atomunu paylaşma eğilimleriyle oluşan bağlanma olarak ifade edilebilir. Hidrojen atomu; F, O, N gibi elektronegativitesi yüksek bir atomla kovalent olarak bağlanma yaptıktan sonra bağ elektronları elektronegativitesi yüksek olan atom tarafından çekilir ve bağda kutuplaşma meydana gelir. Bu durumda; komşu molekülde bulunan elektronegatif atomdaki eşleşmemiş elektron çifti, elektron açısından fakirleşen hidrojen atomu tarafından çekilir. Böylelikle hidrojen atomu komşu moleküller arasında köprü görevi gören özel bir elektrostatik etkileşime girer. Hidrojen bağı enerjisi $\sim 4-120 \text{ kJ/mol}$ 'dür.

2.3.4. π - π İstiflenme Etkileşimleri

π - π istiflenme (stacking) etkileşimleri $0-50 \text{ kJ/mol}$ enerjiye sahip zayıf etkileşim türüdür. Bu etkileşim, π -konjuge sistemlerde genel olarak, biri elektronca zengin diğeri

elektronca fakir iki aromatik halkanın p orbitallerinin molekülerarası örtüşmesi ile gerçekleşmekte olup π elektron sayısı arttıkça etkileşim kuvveti artmaktadır.

2.3.5. van der Waals Kuvvetleri

van der Waals kuvvetleri, yörünge elektronlarının bir atom veya molekülün bir tarafına kısa süreli kaymasından kaynaklanan ve bitişik atomlarda veya moleküllerde benzer bir kayma yaratan geçici olarak dalgalanan bir dipol momentinin neden olduğu elektrostatik kuvvetler olarak tanımlanabilir [49].

Geçici olarak oluşan dipoller arasındaki zayıf kuvvetler olan van der Waals kuvvetleri (enerjisi < 5 kJ/mol), mesafeye bağlı olan bir etkileşim olup atomlar, moleküller arasındaki çekme ve itmenin yanı sıra diğer moleküler arası etkileşimleri de içermektedir. Keesom kuvveti olarak adlandırılan kalıcı dipol-dipol etkileşimleri, Debye kuvveti denilen kalıcı dipol-indüklenmiş dipol etkileşimleri ve London dağılım kuvveti olarak bilinen aynı anda indüklenen iki dipol arasındaki etkileşim kuvvetleri van der Waals kuvvetlerini tanımlamaktadır.

Moleküllerin kutuplaşmasından kaynaklanan van der Waals kuvvetleri genellikle zayıf etkileşimler olup etkileşim kuvveti; etkileşimin mesafesine ve ortama bağlı olarak değişmektedir. Bağlanmaya katkısı oldukça fazla olan bu kuvvetler, çokça etkileşimin bir anda oluşmasıyla güçlü bir bağ oluşturabilirler. Kimyasal yapıdan bağımsız olarak her türlü molekül arasında oluşabilen van der Waals kuvvetleri, bu özelliğinden dolayı spesifik olmayan etkileşim olarak ifade edilebilir.

2.3.6. Hidrofobik Etkileşimler

Moleküllerin polar olmayan kısımları, sulu çözeltide veya diğer protik ortamlarda bir araya gelme eğiliminde olup bu eğilimi sağlayan kuvvete hidrofobik etkileşim denilmektedir. Bu etkileşimler direkt olarak etkileşim büyüklüğüne ve yüzeyinin yapısına bağlıdır. Supramoleküler kimyada, nükleik asitlerin eşleşmesinde, protein gibi büyük moleküllerin katlanma (folding) ve tanımlanmasında, hidrofobik etkileşimlerin önemi büyüktür. Hidrofobik etkileşimler, özellikle, sulu çözeltide bulunan, hidrofobik kaviteye sahip halkasal konak moleküllerin (siklodekstrin, kaliksaren vb.) apolar konuk moleküller ile inklüzyon komplekslerinin oluşumunda büyük öneme sahiptir [48].

2.4. Moleküllerin DNA ile Kovalent Olmayan Etkileşimleri

DNA'nın birçok potansiyel bağlanma bölgesine sahip olan büyük ve karmaşık bir yapıda olması sebebiyle koordinasyon bileşikler iki temel etkileşim türü ile DNA'ya bağlanabilmekte olup bu etkileşimler tersinmez ve tersinir bağlanma olarak gerçekleşmektedir. Tersinmez bağlanma; kovalent veya koordine kovalent bağlanmayı içeren tersinmez bağlanma şeklinde, tersinir bağlanma ise elektrostatik etkileşimler, interkalasyon (intercalation) ve yarık bağlanma (groove binding) gibi molekülerarası etkileşimler kaynaklı oluşmaktadır.

DNA'nın dış yüzeyinde bulunan gruplarla olan dış bağlanma denilen etkileşimlerin büyük bir çoğunluğu elektrostatik etkileşimlerdir [50]. Elektrostatik etkileşimler diğer etkileşim türlerine kıyasla daha zayıf olmasına rağmen ilaçların biyolojik etkinliklerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Elektrostatik etkileşimler DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla küçük moleküllerin pozitif yüklü uçlarının etkileşmesiyle gerçekleşir ve DNA'nın kararlılığını artırır. Bu etkileşim fosfat gruplarının sahip olduğu negatif yük nötralize edilerek ortadan kaldırılabilir. DNA ile yapılan diğer etkileşim türleri de molekülde bulunan fonksiyonel grupların özelliklerine bağlı olarak elektrostatik etkileşimi bünyesinde barındırabilirler [28],[36].

2.4.1. Yarık bağlanma (Groove binding)

DNA'nın küçük moleküller ve proteinler tarafından moleküler olarak tanınması, yapısal biyoloji ve ilaç tasarımında temel bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bağlanma türlerinin ve bağlanma bölgesi seçiciliğinin başarılı bir şekilde tahmin edilmesi güçlü ve seçici gen düzenleyici ilaçlar olarak yeni moleküllerin tasarımı ve sentezindeki gelişmeler için yararlı olacaktır [51].

İkiz sarmal iplikler DNA omurgasını oluşturmakta olup iplikler arasındaki boşluklar takip edilerek minör ve majör olmak üzere iki tane yarık bulunabilir. Bu yarıklar baz çiftlerine bitişiktir ve moleküllerin DNA'ya bağlanması için yer oluşturabilirler. İplikler birbirlerine göre simetrik konumda olmadıkları için yarıklar eşit olmayan boyutadırlar. Minör yarık 12 angström (1.2 nm) büyük yarık ise 22 angström (2.2 nm) genişliğindedir [52]. Majör yarığın daha geniş olması nedeniyle minör yarığa göre bazların kenarları majör yarıktaki daha erişilebilirdir. Sonuç olarak, çift sarmallı DNA'daki spesifik dizilere

bağlanabilen transkripsiyon faktörleri gibi proteinler genellikle majör yarıktaki açığa çıkan bazların kenarlarıyla temas ederler [53].

Artan sayıdaki yüksek çözünürlüklü yapılar, DNA'nın hem küçük hem de büyük yarıklarının proteinler ve küçük moleküller için reseptörler olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Kompleks oluşumu hem DNA'da hem de ligandlarda değişen derecelerde konformasyonel değişikliklerle sonuçlanmaktadır [54]. Protein ve oligonükleotit gibi uzun yapılar DNA ile majör yarık üzerinden etkileşime girerken ilaçlar gibi küçük moleküller genellikle minör yarık üzerinden DNA ile bağlanırlar [55]. Minör yarık çok sayıda kovalent olmayan bağlayıcı ajanın hedefi durumundadır. Bağlanmanın hangi yarık yoluyla gerçekleşeceği molekül ve yarık üzerindeki elektrostatik çeşitlilik, H bağı yapabilme olasılığına göre değişkenlik göstermektedir.

Minor yarık bağlayıcı moleküller, genelde birbirine amid ve vinil gruplarıyla bağlı birçok heterosiklik halkaya sahip olan ve minör boşluğun şekline uygun şekildeki moleküllerdir. Minör yarık üzerinden yapılan bağlanmalarda yapı; DNA fosfat gruplarıyla yapılan elektrostatik etkileşimler, bazlar üzerinde bulunan elektronegatif atomlar sayesinde yapılan hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri sayesinde daha kararlı hale getirilmektedir [28],[36].

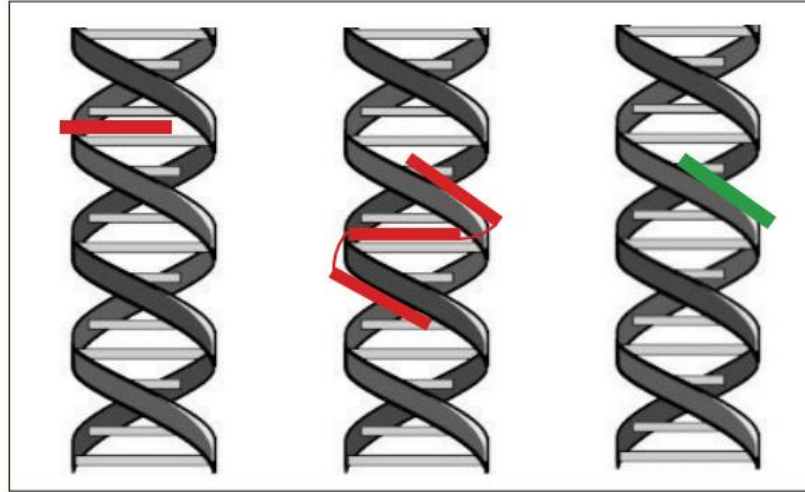
Küçük moleküller DNA ile birkaç farklı türde etkileşime girebilirler. Katyonik moleküller için DNA omurgası boyunca anyonik fosfodiester gruplarına elektrostatik çekim mümkündür ancak bu çekim genellikle fizyolojik koşullar altında zayıftır. Çift sarmalın majör yarığı içindeki bağlanma, proteinler için daha yaygın olmasına rağmen, küçük moleküller için nadirde olsa gözlenmektedir. DNA ile şimdiye kadar, en yaygın iki bağlama türü, çift sarmalın merkezindeki baz çifti yığına interkalasyon ve minör yarığa yerleştirmedir [27].

2.4.2. İnterkalasyon (Intercalation)

İnterkalasyon, tipik olarak düzlemsel heterosiklik, aromatik halkalara sahip katyonik moleküller için gözlenir. Pozitif yükün halka sisteminin bir parçası olması gerekmez, bunun yerine bir süstituent üzerinde de olabilir. Bu bağlanma türü, ligand için bir bağlanma cebi oluşturmak üzere iki bitişik baz çiftinin birbirinden ayrılmasını gerektirir [27],[28]. İnterkalasyon komplekslerinin kararlılığı; van der Waals, hidrofobik ve

elektrostatik kuvvetler tarafından sağlanmaktadır. Ardışık baz çiftlerinin birbirinden ayrılarak boşluk oluşturmasıyla DNA'nın sarmal yapısında yapısal değişiklik oluşur ve sarmal yapı uzar. Bu yapısal değişiklikler DNA'nın translasyon ve transkripsiyon gibi tipik süreçlerini engellemektedir.

İnterkalasyon, majör yarığın genişlemesi, çift sarmalın uzaması, sertleşmesi ve çözülmesiyle sonuçlanmakta, ancak aksi takdirde DNA yapısında minimum bozulmaya neden olmaktadır. Çözülme derecesi değişkenlik göstermekte olup örneğin, floresan yer değiştirme deneylerinde yaygın olarak kullanılan etidyum katyonu DNA'yı 26° çözmemektedir. DNA interkalatör etkileşimleri için bağlanma sabitleri tipik olarak 10^5 - 10^{11} M⁻¹ arasındadır. Klasik ve yivleme olarak iki tür interkalasyon türünden bahsedilebilir. Klasik interkalatörler aromatik yapılarını baz çiftleri arasına yerleştirirler. Bir yivleme interkalatörü ise majör ve minör her iki yarık ile güçlü ve aynı anda etkileşime giren terminal grupları olan bir kısım içerir. Şekil 2.5'te interkalasyon türleri ve yarık bağlanma gösterilmektedir. Büyük hacimli sübstitüentlerin varlığında tam interkalasyon engellenebilir, bu durumda kısmi interkalasyon meydana gelebilir [56].



Şekil 2. 5. İnterkalasyon (sol), yivli interkalasyon (orta) ve yarık bağlanma (sağ) [56]

2.5. Nükleik Asitler ile Küçük Moleküllerin Etkileşimleri

Floresan boyalar, metal kompleksleri ve ilaçlar gibi küçük moleküllerin nükleik asit araştırmalarında yaygın olarak kullanıldığı birçok çalışma literatürde son yıllarda geniş bir yer tutmaktadır. Nükleik asit yapılarıyla kovalent olmayan bir şekilde etkileşime giren

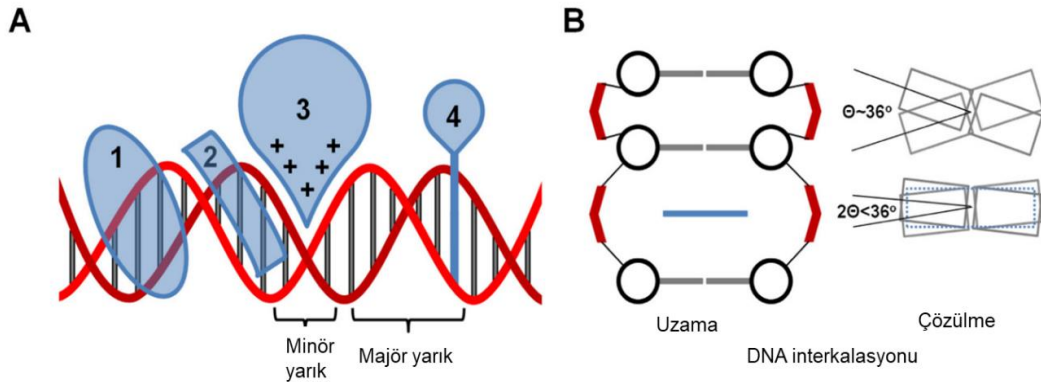
küçük moleküller antikanser, antitümör ve antibakteriyel tedavilerle ilgili çalışmalarda oldukça önem kazanmıştır [29].

Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanmasında afinite ve seçiciliği belirleyen faktörlerin aydınlatılması epeyce ilgi çekici bir alandır. DNA bölgelerinin tanınmasını belirleyen faktörlerin nicel olarak anlaşılması, kemoterapide uygulama için diziye özgü DNA bağlama moleküllerinin tasarımında ve biyoteknolojik araçların geliştirilmesinde değerli olacaktır. Pek çok çalışma, küçük doğal moleküller ve bunların sentetik türevleri ile DNA arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin aydınlatılmasına odaklanmıştır. Bu küçük moleküller; baz çiftleri arasındaki aromatik heterosiklik grupların interkalasyonu ile bağlantılı π istifleme etkileşimleri ve DNA sarmalındaki yarıklar boyunca bağlanmaya katkı sunan hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri gibi bir dizi zayıf etkileşimlerle DNA'ya bağlanarak stabilize edilirler. Bu bağlanma türlerinin DNA'ya bağlı kompleksin stabilizasyonuna katkılarını araştırmak değerli veriler sunmaktadır [57]. Küçük moleküllerin, belirli bir bağlanma modu ile DNA ile etkileşime girdiği bilinmekte olup bununla birlikte, birkaç çalışma, DNA ile etkileşime giren çeşitli küçük moleküller için karışık veya birden fazla bağlanma modu bildirmiştir. Karışık bağlanma modunun bu özelliği, etki mekanizmalarına ve ilaçlar için terapötik etkinliğine bağlanabilir.[28].

Spesifik moleküller tarafından DNA yapı kontrolü düşünüldüğü zaman bu moleküllerin DNA'ya nereden ve nasıl bağladıklarını göz önünde bulundurmak çok önemlidir [58], [59]. DNA, küçük moleküller ile kovalent olmayan etkileşimler için farklı bağlanma türlerine sahip olup interkalasyon ve minör yarık bağlanması en yaygın olanlarıdır. İnterkalasyon, çift sarmallı DNA'da istiflenmiş bazların arasına düzlemsel bir molekülün istiflenmesi anlamına gelir. Doğrudan DNA'ya zarar vermemekle birlikte, DNA-interkalatör kompleksi, DNA replikasyon süreçlerinde yer alan topoizomerez enzimlerinin aktivitesini inhibe eder. İnterkalasyon, DNA sarmal bükülmesini azaltır ve DNA'yı uzatır. Birçok küçük molekül interkalatörü bulunmakta olup Etidyum Bromür DNA'ya sıkıca bağlanan ve güçlü floresan doğası nedeniyle farklı biyolojik deneylerde DNA'yı etiketlemek için kullanılan en bilinen interkalatörlerden biridir. İnterkalasyonun aksine, yarık bağlanması DNA konformasyonlarını değiştirmez, ancak küçük molekül sadece DNA'nın minör yarığı boyunca oturur ve yarığın temel kalıntıları ile hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri ile stabilize edilir. Yeni ligand, yarık boyunca su moleküllerinin yerini işgal eder. Bu nedenle, böyle bir etkileşim entropik olarak

elverişlidir. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), DNA'da A-T açısından zengin bölgeye bağlanan minör bir yarık bağlayıcıdır ve floresan doğası nedeniyle DNA etiketi olarak da kullanılır. Tek bir bileşik, örneğin hem interkalasyon hem de yarık bağlama gibi birden fazla DNA bağlama modu olarak kullanılabilir [58].

Katyonic veya nötr olabilen DNA interkalatörleri, DNA'yı elektrostatik olarak ya da majör veya minör yarıklara bağlanan ligandların aksine, kodlanmış genomun sürekliliğini bozar. Tekli DNA interkalasyon olayları, doğal bükümün %50'sini aşabilen DNA sarmalının çözülmesine ve ayrıca interkale olan kısmı yerleştirmek için baz çifti ayrılmasını neredeyse iki katına çıkaran sarmal uzamasına neden olur. İnterkalasyona eşlik eden DNA sarmalının çözülmesi sarmal uzamasını telafi ederken ve baz-interkalatör istiflenmesini en üst düzeye çıkarırken, DNA-ligand kompleks deformasyonu ise doğal DNA omurga yapısının, bitişik fosfat grupları arasındaki neredeyse hiç değişmeyen mesafesi gibi kritik yönlerini korur. Şekil 2.6.A'da farklı DNA bağlama türlerinin B.'de ise DNA sarmalının uzaması ve çözülmesinin şematik gösterimi bulunmaktadır [60].



Şekil 2. 6. A.1. Majör yarık bağlayıcı, 2. Minör yarık bağlayıcı, 3. Elektrostatik bağlanma, 4. İnterkalasyon. B.'de ise DNA sarmalının uzaması ve çözülmesinin şematik gösterimi [60]

Şekil 2.6.B'deki diyagramlar (Fosfat grupları kırmızı, deoksi şeker siyah, baz çiftleri gri ve interkalatör mavi ile gösterilmiştir) aralanmış baz çiftleri arasındaki ayrımın neredeyse iki katına çıktığını, doğal DNA sarmalının yarısından fazlasının uzamayı telafi etmek için çözüldüğünü göstermektedir [60].

DNA ile kovalent olmayan etkileşime giren hem doğal hem de sentetik küçük moleküllerin ilaç tasarımında kullanımları ve farmasötik olarak optimize edilmeleriyle ilgili çalışmalar birçok araştırmacı tarafından yürütülmektedir [60]. Ayrıca, küçük moleküllerin biyoteknoloji araştırmaları için floresan etiketler ve probalar olarak kullanımı [27] ve DNA bağlanması ile ilişkili optik özelliklerin tanımlanması ve görüntüleme uygulamaları [60] için büyük ilgi görmektedir.

2.5.1. Nükleik Asitler ile Metal Bazlı Komplekslerin Etkileşimleri

Kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde metallerin ve bileşiklerinin terapötik önemi hakkında bazı çalışmaların raporları metal bileşiklerinin tıp alanında uygulanmasının 16. yüzyıla kadar uzandığını göstermektedir. Günümüzde, yaygın olarak reçete edilen metal içeren bileşiklerin sayısı çok fazladır ve antimon antiprotozoal, bizmut antiülser, demir antimalaryal, altın antiartritik, gümüş antimikrobiyal, platin antikanser ve vanadyum ise antidiyabetik olarak kullanılmaktadır [15]. Eşleşen şekil ve boyut nedeniyle belirli DNA yapıları veya dizileri ile etkileşime giren metal kompleksleri, özellikle geçiş metal bileşiklerinin zengin fotofiziksel ve elektrokimyasal özellikleri göz önüne alındığında, yapısal probalar, floresan işaretleyiciler, elektrokimyasal probalar veya DNA ayak izi (footprinting) ajanları olarak muazzam bir potansiyele sahiptir [56].

DNA veya proteinler gibi çoğu biyolojik molekül elektron yoğunluğu bakımından zengindir, metal iyonlarında ise elektron eksikliği vardır. Bu nedenle, metal iyonlarının biyolojik olarak çeşitli moleküllerle etkileşime girmek için belirgin bir eğiliminin olduğu gözlemlenmektedir. Ayrıca metal iyonları, moleküler oksijen gibi yaşam için gerekli olan çeşitli küçük moleküller için de büyük bir afiniteye sahiptir [15].

DNA'nın nükleobazları ve fosfat grupları, metal iyonlarının ve açık koordinasyon bölgelerine sahip metal komplekslerinin bağlanabileceği donör atomları sağlar. Metal iyonları ve kompleksleri ayrıca DNA nükleobazlarını, özellikle guanini oksitleyebilir veya şeker fosfat omurgasını oksidatif, fotolitik veya hidrolitik mekanizmalarla parçalayabilir. DNA çift sarmal kopmaları ve oksidasyon veya tersinmez kovalent bağ oluşumu gibi geri dönüşü olmayan DNA hasarı, metal toksisitesi ve mutajeniteden sorumludur [56].

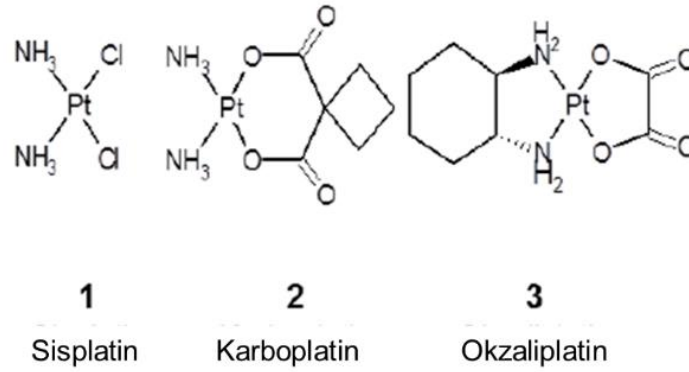
Bir hücre onarılamayacak bir hasara uğradığında, hasarın kalıtsal olmasını önlemek için hücre genellikle kendini yok etmektedir. Ancak hücreler bazen hücre bölünmesinin kontrolünü kaybederek kansere yol açmakta bu nedenle kanser kemoterapisi kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlamaktadır. Son altmış yıl boyunca, başta metal içeren ve koordinasyon bileşikleri olmak üzere çeşitli yeni metal türevleri, esas olarak geçiş metalleri (d-blok) olmak üzere, çok çeşitli metallere dayanan olası antikanser ve/veya antitümör ajanlar olarak yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Kemoterapötik özelliklere sahip koordinasyon komplekslerinin tasarımında göz önünde bulundurulması gereken faktörler; çözünürlük, moleküler yapı ve geometri, kompleksin toplam yükü, süstituentler dikkate alınarak uygun ligand seçimi olarak sayılabilir [15].

2.5.1.1. Platin Temelli Kompleks Yapılar

Platin, biyoyumluluk, elektriksel iletkenlik, radyoopasite ve dayanıklılık gibi üstün özelliklerinden dolayı tıpta kullanılmaktadır [15]. Kanser hala tüm dünyada insan sağlığı için önemli bir sorundur. Antikanser ilaçların en aktif sınıfı olan cis-platin, karboplatin ve oksaliplatin dünya çapında klinik olarak çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Geniş bir antitümör aktivite spektrumu sergileyen bu antikanser ilaçların klinik uygulamalarının önündeki başlıca engeller; yan etkiler, toksisite (nefrotoksisite) ve ilaç direnci olarak sayılabilir [16]. Bu engelleri ortadan kaldırabilmek için platin kompleksleri üzerine çok sayıda çalışma yürütülmektedir. DNA hedefli antitümör platin komplekslerinin araştırılması, toksisitesi az, ilaç direnci düşük ve etkinliği daha yüksek yeni nesil platin bazlı komplekslerin keşfedilmesi için umut verici çalışmalardır [16],[17],[19],[59],[61]–[68]. Şekil 2.7’de cis-platin, karboplatin ve okzaliplatin moleküllerinin kimyasal yapıları yer almaktadır [68].

Cis-platin ve diğer platin komplekslerinin DNA ile genel olarak kabul edilen bağlanma mekanizmasının; birincil donör atom olarak kabul edilen guanin bazlarının N7 atomunun Pt(II) merkezine bağlanması ve bu bağlanmanın daha sonra DNA’daki komşu pürin bazları (%60-65 oranında 1,2-GG veya % 20-25 oranında 1,2-AG) arasında yaklaşık %90 oranında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağlar oluşturması ile sonuçlanması şeklinde olduğu bilinmektedir [16],[66],[68]–[70]. 1970 yılında, DNA cis-platinin biyolojik hedefi olarak tanımlanmıştır ve cis-platinin pürin bazlarına özellikle de majör yarıktaki guanin bazlarının N7 atomuna kovalent bağlandığı gösterilmiştir [71]. Cis-platinin aynı iplik üzerindeki ardışık guaninlerdeki N7 atomlarına bağlanması ile platin-bağlanma

bölgesindeki bazların ayrılmasının indüklenmesi [71] ve çapraz bağlanmalarla DNA sarmalı önemli ölçüde bükülür (yaklaşık 35-40 derecelik) [68], majör yarıktaki sıkışma ve minör yarıktaki genişleme ve düzleşme meydana gelir [52],[72],[73]. Ayrıca çok daha az sıklıkla gözlemlense bile, adenin ve sitozin de N atomları aracılığıyla Pt'yi bağlayabilir [66]. Platinlerin nükleobazlara kararlı şekilde bağlanması DNA'nın replikasyon basamağının kesintiye uğramasını sağlar [66],[68] ve sonunda kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemesinin ardından kanserli hücrelerin ölümü gerçekleşir [16].



Şekil 2. 7. cis-platin, karboplatin ve okzaliplatin moleküllerinin kimyasal yapıları [68]

Platin bağlanmasının neden olduğu DNA çift sarmalının eşzamanlı bükülmesi ve yerel çözülmesi, hasarlı DNA'nın onarım enzimleri tarafından tanınması veya lezyonu onarımdan koruyan proteinlerin bağlanması gibi önemli yapısal motiflerdir [71].

Platin içeren ilaçların hem aktif bir hidroliz ürünü oluşturabilmeleri hem de serum proteinlerine ya da kükürt içeren aminoasit/peptidlerle etkileşime girerek inaktif hale gelmemeleri DNA ile koordinasyon yapabilmeleri açısından çok önemlidir. Hidroliz kinetiği platinin diğer moleküller ile etkileşiminden negatif yönde etkilendiği için metal içerikli ilaçların kanda bulunan makromoleküllerle etkileşimi çok önemlidir. Yapılan araştırmalarda platin içeren ilacın hidroliz olduktan sonra oluşan türlerinin nasıl bir yol izlediği ya da serum proteinlerine bağlanarak nasıl engellendikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır [68].

Metal bazlı antikanser ilaçların çoğu, DNA'nın yarıklarına koordine ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla bağlanması hedeflenmektedir. Bu tür etkileşimlere; π - π istiflenme, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları aracılık eder. DNA ve metal bazlı antikanser ilaçları arasındaki etkileşimlerin doğası, metalin oksidasyon durumuna ve metal merkeze

bağlı organik kısımlara bağlı olup bu ligandlar bağlanma modunu belirler (sterik etkiye bağlı olarak) ve tasarımları klinik uygulamalar için kilit öneme sahiptir [15],[74]. Platin (II) komplekslerinde taşıyıcı ligandların modifikasyonu; bu ligandların etkinliklerini, DNA ile bağlanma şeklini, hasarlı DNA'nın tanınmasını ve antitümör aktivitesinin spektrumunu değiştirebilir [16]. Yeni nesil platin kompleksleri, yapı-aktivite ilişkisine bağlı olarak geliştirilmekte olup potansiyel olarak aktif komplekslerin; nötr olması, cis oryantasyonunda en azından biri N-H bağı içeren iki adet inert amin ligandı içermesi ve iki yarı kararlı (semi-labile) ayrılan grup içermesi gerekmektedir. Liganddaki NH grubu hem biyolojik hedef yaklaşımında hem de yapının son şeklinin hidrojen bağı donör özelliklerinden sorumludur [61].

2.5.1.2. Paladyum Temelli Kompleks Yapılar

Çeşitli hastalıkların tedavisinde platin (II) ve türevleri haricindeki farmakolojik potansiyele sahip türler arasında paladyum (II) bileşikleri, esas olarak paladyum (II) ve platin (II) bileşikleri arasında var olan yapısal analogi nedeniyle özel ilgi görmektedir [15],[17]. Birkaç paladyum (II) bileşiğinin antiviral, antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal, antiparaziter ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Paladyum (II) iyonları, in vivo ve in vitro olarak çoğu ana hücresel işlevi inhibe etme yeteneğine sahiptir. Paladyum (II) iyonları; amino asitler, proteinler, DNA ve B6 vitamini gibi diğer makromoleküllerle kolaylıkla kompleksler oluşturur. Paladyum komplekslerinin yapısal kararlılığı ve değişkenliği, paladyum (II)'yi terapötik metallerin araştırılmasında tercih edilen metal haline getirmiştir. Ayrıca, paladyum (II) bileşiklerinin mutajenik olmadığı ve bu nedenle terapötiklerde uygulama için güvenli olduğu gösterilmiştir [15].

Paladyum (II) bileşikleri sitotoksiteleri, seçicilikleri ve çözünürlükleri nedeniyle platin ilaçlarla rekabet eder [15]. Paladyum (II)'nin koordinasyon bileşiklerinin ligand değişim kinetiği, platin (II) analoglarına kıyasla 10^3 - 10^5 kat daha hızlı olup bu bileşiklerin antikanser aktiviteye sahip olmaları büyük bir heyecan yaratmıştır [15],[17]. Ancak, paladyum (II) bileşiklerinin yüksek reaktivitesi, sitoplazmadaki yapısal bütünlüklerini DNA'ya ulaşacak kadar uzun süre korumalarına izin vermemekte ve antikanser ajanları olarak kullanımlarını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, kinetik yükümlülüğü azaltmak ve sitotoksik aktiviteyi maksimize etmek için ligandların seçimi önemlidir. Bazı yazarların ligandların sterik engellemesinin, DNA/protein bağlama kapasitesini, sitotoksik aktiviteyi ve yer değiştirme (substitution) kinetiklerini de olumsuz etkileyebileceğini

tespit etmiş olmalarına rağmen başka bir görüş olarak diğer yazarlar tarafından sterik engellenmenin DNA ile etkileşimi ve koordinasyon bileşiklerinin antitümör aktivitesini geliştirdiği iddia edilmekte olup kinetik reaktivitenin yavaşlayarak sitoplazmadaki diğer biyolojik moleküllerin müdahalesi olmadan DNA'ya ulaşmalarına izin verdiği görüşüne sahiplerdir. Bu gibi dezavantajlarına rağmen, paladyum (II) koordinasyon bileşikleri, çeşitli tümör tiplerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip maddeler olarak hazırlanmış ve test edilmiş olup cis-platine kıyasla yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Yüksek kararsızlıktan kaçınmak için, paladyum (II) bileşiklerine termodinamik kararlılık sağlayan ve onları kinetik olarak inert yapan çeşitli ligandlar kullanılmıştır. Paladyum (II)'nin alifatik aminlerle koordinasyon bileşiklerinin dengesi üzerine, bunu (1H-benzo[d]imidazol-2-il) metanamin gibi aromatik heterosikliklere kadar genişleten çok sayıda çalışma yapılmıştır [15].

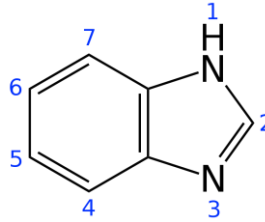
Heterosiklik yapılar, organik kimyada olduğu kadar tıbbi alanda da merkezi bir rol oynamaktadır. Azot heterosiklikleri, birçok doğal ve sentetik molekülle benzerlikleri nedeniyle çeşitli farmakolojik aktiviteler sergiler. Bu yapısal benzerlik nedeniyle canlı sistemlerin biyomolekülleri ile kolayca etkileşime girebilirler [19].

Son zamanlardaki araştırmalar, sitotoksik platin (II) koordineli heterosiklik amin ligandlarına sahip olan cis-platin analoglarına yönelmiştir [61],[75]. İmidazol, tiyazol, benzimidazol, benzotiyazol, benzoksazol, piridin ve fenantridin gibi N-heterosiklik ligandlarla çeşitli platin komplekslerinin antitümör aktivitelerine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda bu yapıların antitümör aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir [16],[17]. Son yıllarda antitümör, anti-HIV ve antimikrobiyal maddeler gibi biyolojik olarak aktif bileşikler hazırlamak için yapısal iskeleler olarak benzimidazollerin kullanıldığı heterosiklik amino ligandları içeren birkaç paladyum (II) koordinasyon bileşiği sentezlenmiştir [15].

2.5.1.3. Benzimidazol

Benzimidazol, heterosiklik ve aromatik olan organik bir bileşiktir. Benzen ve imidazol halka sistemlerinin birleşimi ile oluşan bisiklik florofor bir yapı olan benzimidazol ve türevleri lüminesan malzemeler, duyarlılaştırılmış güneş pilleri, organik absorpsiyon, boya sanayii ve ilaç endüstrisi (antimikrobiyal, antiviral, antikanser, antiprotozoal, antienflamatuvar ve analjezik aktiviteler) gibi alanlarda büyük ilgi görmektedir [76],[77].

Ayrıca, benzimidazol bazlı kromoforlar, ayırt edici lineer ve lineer olmayan optik özellikleri ve benzimidazol türevlerinin metal iyonları ile kararlı kompleksler oluşturma yetenekleri nedeniyle artan bir ilgi görmüştür [76]. Şekil 2.8’de benzimidazolün kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2. 8. Benzimidazol molekülünün kimyasal yapısı

Benzimidazol, ilaç kimyasında önemli bir farmakofor ve ayrıcalıklı bir yapıdır [19]. Benzimidazol, yapısal olarak pürin bazlarına benzer ve B12 vitamini ve türevleri gibi doğal olarak oluşan çeşitli bileşiklerde bulunur [15]. Benzimidazol iskelesi, biyolojik olarak aktif moleküllerde kimyasal fonksiyonellik göstermek için yararlı bir yapısal motiftir. Türevlerinden bazılarının geçiş metalleri ile koordinasyon komplekslerinin anti-tümör, anti-HIV, anti-Parkinson, anti-mikrobiyal ajanlar [17] ve sitotoksik, anti-proliferatik olarak güçlü biyolojik aktivite sergiledikleri ve nükleik asit sentezini engelledikleri [15] bilinmektedir. Aynı zamanda, geçiş metali bileşiklerinde ligand olarak görev yapan azollerin koordinasyon kabiliyeti nedeniyle, benzimidazol gruplarını içeren şelatlayıcı ligandlar, bu tür türevler ve sitotoksik aktiviteleri hakkında geniş bir bilgi birikimine izin veren biyolojik sistem modellemesi bağlamında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [15],[17],[61]. Cis-platine direnç mekanizmasını kanıtlamak için, metal merkezin amin tipi ligandlarının benzimidazollerle değiştirildiği çok çeşitli paladyum (II) ve platin (II) koordinasyon bileşikleri hazırlanmıştır [15] Pd(II) ve Pt(II) kompleksleri, NNH donör bölgeleri boyunca kare düzlemsel geometriye sahiptir. Son zamanlarda 2-arilaminometilbenzimidazol türevleri ve bunların metal kompleksleri hakkında yapısal çalışmalar, antimikrobiyal, in vitro sitotoksikite ve yapı-aktivite ilişkileri ile ilgili sonuçlar raporlanmıştır [17].

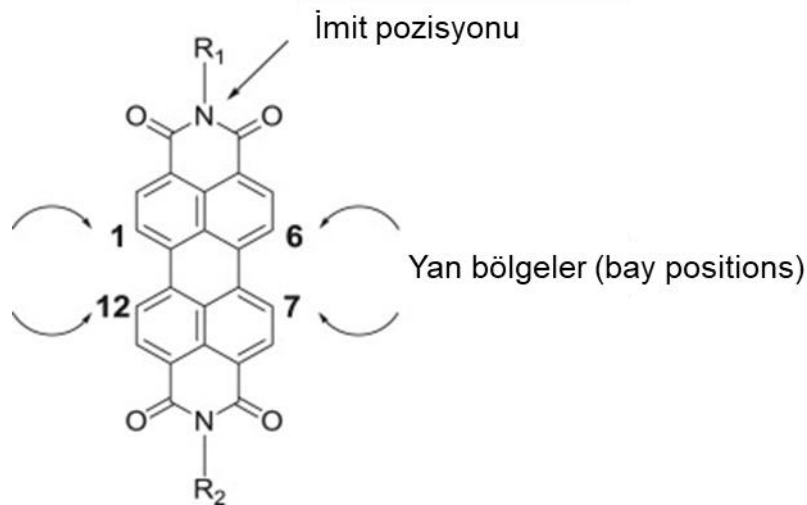
Aromatik heterosiklikler π -vericileri olarak hareket eder ve sıklıkla verimli π -alıcıları olarak işlev görür. π -alıcı özellikleri, pürin ve pirimidin gibi bazlarla π - π istiflenmesinde rol oynayabilir, DNA alt birimleri ile kompleks oluşumunu iyileştirir, tümöre yönelik

kemoterapide ana amaç olan ilacın etkinliğini arttırır. Bu nedenle (1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-metanamin ligandı ile paladyum (II)'nin bazı biyolojik olarak ilgili yardımcı ligandlar (kükürt ve azot donörleri) ile koordinasyon komplekslerinin oluşumu incelenmiştir [15].

Heterosiklik kromoforlar, mükemmel spektral özellikleri ve çeşitli analitleri saptama yetenekleri nedeniyle en çok araştırılan optik algılama molekül sınıflarından biridir. Bunların arasında benzimidazol genellikle bilim adamlarının dikkatini çekmektedir. Terapötik olarak aktif bir bileşik olan benzimidazolün ilaç keşfi ve tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanıldığı bilinmekte olup türevleri de yeni optik kimyasal sensörlerin geliştirilmesi için önemli adaylardır. Benzimidazol kısmı, heteroaromatik moleküler sistemlerde çok işlevli bir birim olarak görev alabilir. Kromojenik pH duyarlılığı/anahtarlama, metal iyon şelatlama özellikleri ve biyomoleküllerle uyumluluğu ile birlikte elektron alma ve π -köprüleme özellikleri, benzimidazol kısmının optoelektronik ve doğrusal olmayan optik, fotovoltajik, algılama ve biyogörüntüleme gibi farklı uygulamalar için moleküler sistemlerde özellikle çekici bir yapı taşı haline getirir [78].

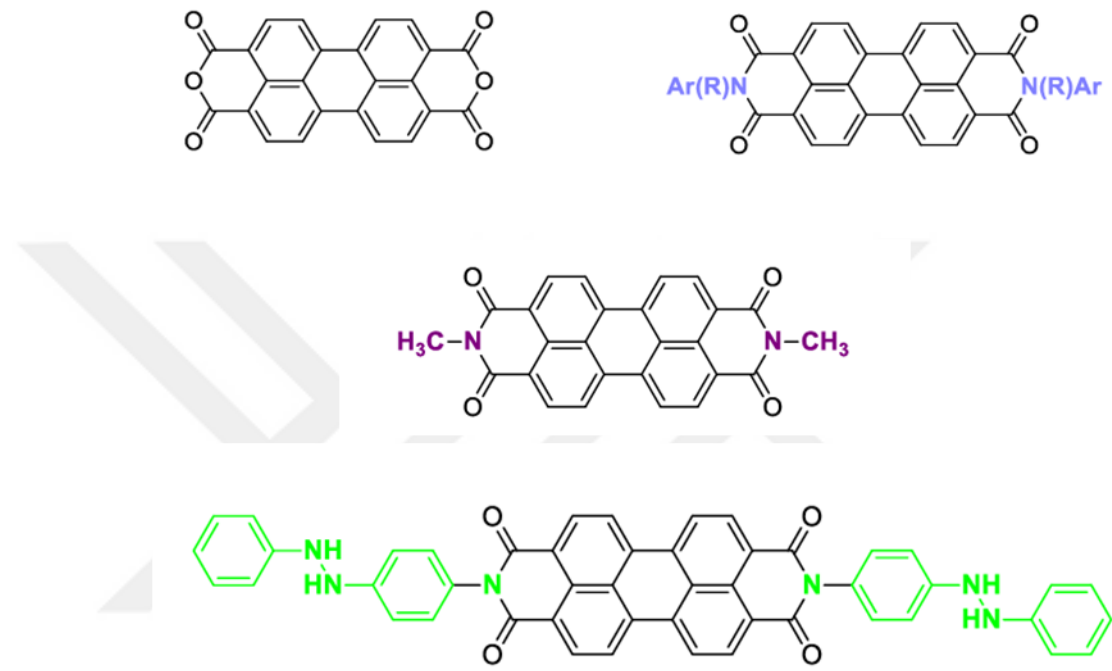
2.5.1.4. Perilen Diimitler

Perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit türevleri (PDI'ler) yüksek konjugasyona sahip kromoforik boyalardır. Perilen dimitler donör bir çekirdek ve alıcı özelliklere sahip karbonil grupları içermektedir [79]. Şekil 2.9'da perilen dimitin moleküler yapısı yer almaktadır [80].



Şekil 2. 9. Perilen dimitin moleküler yapısı [80]

Perilen dimit yapısının kimyasal modifikasyonu, optimize edilmiş elektronik ve optik özelliklere sahip çözünür perilen dimitler üreterek, imit pozisyonlarına ve/veya yan pozisyonlarına (1, 6, 7, 12 pozisyonlarına) alkil veya aril ikame edicileri dahil ederek kolaylıkla gerçekleştirilebilir [80] Şekil 2.10’da bazı perilen dimit türevlerinin moleküler yapıları yer almaktadır [79].



Şekil 2. 10. Bazı perilen dimit türevlerinin moleküler yapıları [79]

Perilen diimit türevlerini kırmızıdan mora hatta gölgeli siyaha kadar geniş bir renk skalasında görmek mümkündür [79]. Olağanüstü renk görünürlüğüne ve ısısal kararlılığa sahip kimyasal olarak inert olan boyalardır ve bu nedenle floresan ışık toplayıcıları, lazer boyaları, tek molekül spektroskopisi materyalleri ve otomotiv cilaları gibi pigmentler olarak kullanılmaktadır [30]. Perilen dimitler en değerli fonksiyonel boyalar arasında olup çok yönlülükleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir [31],[32]. Çok sayıda potansiyel uygulamaya sahip olan bu boyalar kimyasal ve fotofiziksel kararlılıkları, olağanüstü optik ve elektronik özelliklerinin bir sonucu olarak organik elektronik ve fotovoltaiiklerde pigmentler, floresans sensörleri ve n-yarı iletkenler olarak kullanılmıştır [20]–[23],[32]. Isısal ve ışık kararlılığının yanı sıra nispeten kolay bir sentez mekanizmasına sahip olması görünür spektrumun büyük bir aralığında ışığı absorbe edebilen analoglarını elde etmek için kullanılan önemli bir özelliğidir [31].

Tedavi sonuçlarını iyileştirmek için hastalıkların kesin tedavisi ve teşhisi için biyolojik süreçleri izlemek için görüntüleme teknolojisini kullanan entegre tedavi, sıcak bir konu haline gelmiş olup perilen diimitler, hastalık tedavisi ve teşhisi için iyi bir materyal olarak kullanılabilen mükemmel fotoisıl dönüşüme ve fotokararlılığa sahiptir [20].

Perilen dimitlerin özellikleri analitik kimya alanında da ilgi çekicidir. Yüksek duyarlı analiz elde etmek için güçlü bir potansiyele sahiptir, çünkü florofor; yüksek fotokararlı ve görünür bölge ışık bölgelerinde kuvvetli floresans gösterir. Bazı perilen dimit türevleri DNA, protein membran etiketleme ve hücre içi pH ölçümleri için kullanılmışlardır [30].

Üstün kimyasal ve foto kararlılıkları nedeniyle yüksek floresan özelliğe sahip olan perilen diimitler, polar olmayan çözücülerde pigment renklendiriciler olarak uzun yıllardır kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır [21]–[23]. Bu yapıların tek potansiyel dezavantajı, hücre görüntüleme uygulamalarını sınırlayan perilen kormoforlarının kümelenmesi ve çökmesi (agregasyonu) nedeniyle zayıf çözünürlük ve çok zayıf floresans göstermeleridir [30],[32]. Biyolojik sistemlerde perilen dimitlerin kullanımındaki en büyük zorluk suda çözünür floresan analogları geliştirmektir, çünkü perilen diimit türevleri sulu çözeltide güçlü π - π istifleme etkileşimleri gösterir, bu da floresansın şiddetli şekilde kendi kendini söndürme etkisine neden olmaktadır [22],[23]. Perilen dimitlerin polar çözücülerde çözünürlüğünün olmaması bu floroforların biyolojik ve tıbbi alanlarda kullanımını engellemiştir [21],[22]. Polar çözücülerde (suda) çözünürlüğün artırılması için Şekil 2.10'da gösterilen yan bölgelere (bay positions) ve/veya imit konumlarına hidrofilik grupların dahil edilmesi gereklidir [15],[21]–[23],[32]. Bunun için en güçlü yöntemlerden biri, protonlanmış amin ve kuaternize edilmiş amino tuzları, karboksilik veya sülfonik asitler gibi iyonik grupları imit azotlarına ve/veya yan bölgelere dahil etmektir [23]. Geçtiğimiz yıllarda, suda çözünür perilen dimitler, kararlı floresan performansları sayesinde seçici algılama ve özel etiketleme için optik platformlar olarak artan bir ilgi görmüştür [21],[22],[30].

Son yıllarda, fonksiyonel perilen dimitlerin potansiyel biyo-uygulamalarını keşfetmek, biyokimyanın ön saflarında popüler bir araştırma alanıdır. 1,8-naftalimid, naftalin diimidler, akridinler, amonafid, etidyum bromür, daunomisin ve doksorubisin gibi birçok aromatik ve düzlemsel mutajen, DNA'nın iki bitişik baz çifti arasındaki boşluğa interkalasyon yapabilir. Daha önce detaylıca anlatıldığı üzere bu interkalasyon, hem DNA transkripsiyonunu hem de replikasyonunu inhibe eder fakat sitotoksosite ve mutasyonlara

neden olur. DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe etme yetenekleri nedeniyle, kanser hücrelerinin büyümesini engellemek için kemoterapide bazı toksinler kullanılır. İmit pozisyonlarında birkaç amin ve poliamin taşıyan perilen dimitlerin bu amaçla kullanıldıkları çalışmalar rapor edilmiştir [21]. Ligand yan zincirleri ve DNA yarıkları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin sadece G dörtlü (G quadruplex) miktarının oluşumunda değil, aynı zamanda topolojisinin seçiminde de ana rol oynadığı gösterilmiştir [23].

Son zamanlarda, yapay DNA'da bağlayıcı veya taşıyıcı baz olarak işlev gören geniş hidrofobik yüzeylere sahip perilen dimitler hatırı sayılır derecede merak uyandırmıştır [22],[23]. Perilen dimitler; sert ve tamamen düzlemsel bir aromatik nano-iskelet içermekte olup son yıllara kadar biyo-görüntüleme ve anti-kanser ajanı olarak kullanımlarıyla ilgili fazla araştırma yapılmamıştır [21],[22]. Perilen dimit ve DNA arasındaki kovalent olmayan etkileşimler nadiren rapor edilmiş olup daha önce, Xu ve arkadaşları kanser hücresi büyümesini engelleyebilen hücre çekirdeğinde yüksek zenginliğe sahip PBI tabanlı bir DNA interkalatörü geliştirdikleri çalışmalarını yayınlamışlardır [21]. Bu kompleks yapıların interkalasyon kabiliyeti; koordinasyon geometrisi, ligand verici atom tipi ve metal iyon tipi ile ilişkilidir. Bununla birlikte, DNA interkalatörlerinin boyut, şekil ve elektrik yükleriyle ilgili moleküler özellikleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, farklı boyut, şekil ve elektrik yüklerine sahip fonksiyonel perilen dimitleri sentezlemek ve bunların DNA interkalatörleri olarak kullanımlarını araştırmak ve hücresel dağılımlarını ve antikanser aktivitelerini araştırmak büyük ilgi çekmektedir [21],[22].

2.5.2. Nükleik Asitler ile Floresan Boya Etkileşimleri ve DNA Görüntüleme

Son yıllarda floresan boyalar, metal kompleksleri ve ilaçlar nükleik asit araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok çeşitli antikanser ve antibiyotik ilaçları için hücre içi hedef DNA olduğu için küçük moleküllerin DNA ile bağlanma çalışmaları, ilaç-DNA etkileşimlerinin anlaşılmasında, klinik kullanım için yeni ve gelecek vaat eden ilaçların tasarlanmasında ve nükleik asit yapısının hassas kimyasal problemlerinin geliştirilmesinde çok faydalıdır [33].

DNA doğal bir floresansa sahip olmasına rağmen, şiddeti o kadar zayıftır ki, DNA'nın floresans emisyonunun doğrudan kullanımı, özelliklerini incelemek için sınırlıdır [81].

Etidyum bromür (EtBr), akridin turuncusu, metilen mavisi ve benzeri floresan bileşikler ilaç-DNA ve protein-DNA etkileşimlerinde DNA'nın yapısını araştırmak için kullanılır [82]. Bu pigmentlerin çift sarmallı DNA'ya bağlanması, pigmentlerin floresan şiddetini ve ömrünü büyük ölçüde artırır [33]. EtBr'nin çift sarmal DNA'ya afinitesi daha yüksektir çünkü EtBr, akridin turuncusu ve metilen mavisinden ziyade DNA bağlanması için daha fazla erişilebilirlik sağlar [83].

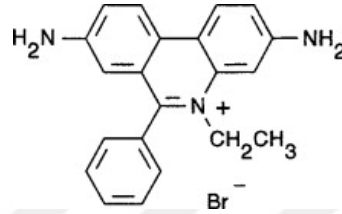
Floresan boyalar, çözelti içinde serbest olduklarında düşük floresansa sahip olan, ancak nükleik asitlere kovalent olmayan bir şekilde bağlanma üzerine floresansta (floresan güçlendirme) önemli artışlar sergileyen boyalardır. Bu tür boyalar esas olarak fenantridinler ve siyanin boyaları olarak iki farklı kimyasal sınıfa aittir. İndoller, imidazoller ve akridinler, hücreler için iyi bilinen nükleik asit boyalarıdır. Ancak genellikle jel elektroforezi ile kombinasyon halinde kullanılmazlar. Bunun başlıca nedeni, mavi floresan boyalarla boyanmış jellerin fotoğrafını çekmenin zorluğu, uyarma dalga boylarının yaygın olarak bulunan ışık kaynaklarıyla zayıf eşleşmesi ve bunların nispeten zayıf floresan güçlendirmesidir [84].

Nükleik asit boyalarının bağlanması; etidyum bromürde olduğu gibi ardışık baz çiftleri arasında interkalasyon şeklinde, YOYO-1 (simetrik olmayan siyanin boya çeşidinin dimer versiyonu) ve etidyum homodimer (fenantridin çeşidi boya) boyaları gibi bis-interkalasyon şeklinde, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), Hoechst 33258 ve Hoechst 33432 boyaları (bis-benzimid türü boyalar) gibi DNA sarmalının minör yarığına bağlanma dahil olmak üzere birçok farklı yolla gerçekleşmektedir. Çoğu nükleik asit boyası katyonik olmakla birlikte, akridinler gibi bazı boyalar nötrdür [84].

Floresan güçlendirmesinin esas olarak iki faktörden kaynaklandığı düşünülmektedir: boya molekülünün düzlemsel bir konformasyonda immobilizasyonu (geniş elektron delokalizasyonunun meydana gelmesine izin verir) ve çözücünün boya ile etkileşimin dışında bırakılması (aksi takdirde floresans sönümlenebilir). En büyük floresans güçlendirmesini sergileyen moleküller, çözelti içinde serbest haldeyken en büyük moleküler esnekliğe sahip olanlar ile birlikte nükleik asitlerle bağlandıklarında en büyük immobilizasyon derecesine (böylece en büyük kalıcılığa) sahip olanlardır. Bağlanmamış halde kayda değer floresansa sahip olan fenantridinler gibi boyalar, genellikle katı moleküllerdir [84]. Simetrik olmayan siyanin boyalarının çoğu, nispeten esnek olma eğiliminde olup bu nedenle çözeltide serbest haldeyken neredeyse hiç floresansı yoktur

ancak bu boyaların nükleik asitlere bağlanmasıyla birlikte floresans verimlerinde 300 kata kadar artış olabilmektedir [85].

Etidyum bromür, çift sarmallı DNA'ya bağlanması üzerine 20 ila 25 kat floresan artışı sergileyen bir fenantridin monomer boyası [86] olup çift sarmallı DNA molekülündeki bitişik baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yapar [87]. Şekil 2.11’de etidyum bromür boyasının yapısı yer almaktadır.



Şekil 2. 11. Etidyum bromür boyasının yapısı

İnterkalasyon yapan etidyum bromürün ultraviyole ışıyla uyarılması üzerine gözlemlenen floresan artışının DNA bazlarından boyaya enerji transferinden kaynaklandığı düşünülmektedir [86]. DNA'nın birincil dizisinin, boya nükleik asit bağlanması üzerinde nispeten az etkisi olması etidyum bromürü genel olarak iyi bir boya haline getirmektedir. Bu boya elektroforetik jellere hızlı ve verimli bir şekilde nüfuz eden bir boya olup jellere elektroforezden önce veya elektroforezden sonra eklenebilir. Ayrıca bazen formaldehit-agaroz jel elektroforezinde bir RNA ön boyası olarak da kullanılmaktadır [84].

İnterkalasyon yapan boyalar, DNA moleküllerinin yükünü ve esnekliğini değiştirmekle birlikte boyanın da ağırlığıyla birlikte jel boyunca DNA'nın hareketini de değiştirir [88]–[90]. Bu nedenle elektroforez sonrası boyama yöntemi, DNA parçalarını boyutlandırmanın en doğru yoludur, ancak bu yöntemde daha fazla boya kullanımı gerektiğinden hem zaman alıcı ve hem de maliyetlidir [90].

Etidyum bromür güçlü bir boya olmasına rağmen orta derecede toksisiteye sahip güçlü bir mutajen olarak kabul edilir [25]. Alternatif boyalar, EtBr'ye eşit veya daha fazla hassasiyet iddia etse de fiyat ve hassasiyet açısından büyük farklılıklar göstermektedir. Boyaların çoğu, etidyum bromür ile aynı şekilde elektroforezden önce veya elektroforez sonrası boyamada kullanılmak üzere tasarlanmıştır [90].

Floresan reaktiflerinin ticari satış ve pazarlamasını yapan bir şirket olan Biotium, ticari olarak tasarlanmış GelRed™ ve GelGreen™ isimli boyaların etidyum bromürden çok daha büyük bir kütleye sahip olduğunu ve böylece hücre zarlarını geçemeyeceklerini ve canlı hücrelerin DNA'larıyla etkileşime girmeyeceğini belirtmektedir. Bu nitelikler bu boyalara toksik ve mutajenik olmayan özellikler katmakla beraber jel içerisinde hareket ederken DNA'yı yavaşlatmalarına sebebiyet vermektedir [91]. Ayrıca Biotium'un web sitesinde "GelRed™ ve GelGreen™ boylarıyla ilgili olarak güvenliklerini artırmak için daha büyük boyalar olarak tasarlanmış yüksek afiniteli boyalar olduğundan DNA'nın göçünü etkileyebilirler" denilmektedir [90].

Literatürde yer alan bir çalışmada GelGreen™, GelRed™, EZ-Vision®In-Gel Solution, SafeView ve SYBR® safe isimli ticari boyalar elektroforezden önce ve sonrasında boyama yapılarak hassasiyet ve göç etme özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. GelGreen™ ve GelRed™'in tüm yöntemler için en yüksek hassasiyeti gösterdiklerini ve en etkin boyamanın elektroforezden sonra olduğu, EZ-Vision®In-Gel Solution isimli boyanın GelGreen™ ve GelRed™ boyalarına kıyasla biraz daha az hassas olmasına rağmen DNA göçünü etkilemiyor olduğu ve elektroforez öncesi yüklemenin daha uygun olduğunu, SYBR™safe isimli boya kullanıldığında elektroforez öncesi boyamada yalnızca birkaç bandın görülebildiği, elektroforez sonrası boyamada ise jelde beneklenme şeklinde lekelerin olduğu, SafeView ile elektroforez öncesi boyamada hiç görünür bant oluşmadığını, elektroforez sonrası boyamada ise diğer boyalara oranla bantların daha az parlak ve berrak olduğu sonuçları paylaşılmıştır [90].

Piyasada etidyum bromüre alternatif olarak farklı bağlanma türlerine, toksisiteye, hassasiteye, kararlılığa, optikle ilgili özelliklerine sahip birçok ticari boya bulunmakta olup bunların en yaygın kullanılanları; Methylene blue (metilen mavisi), Crystal violet (kristal viyole), SYBR safe, Gel Red isimli boylardır. Diğer bir alternatif boya olan akrinin turuncusu yüksek membran geçirgenliğine sahip olup bu mutajen boya tarafından DNA hasarının güçlendirildiği gösterilmiş ve sitotoksitesinden dolayı anti-tümör ajanı olarak bile kullanımı önerilmiştir [26].

DNA, dizilimini değiştirebilen birçok farklı mutajen tarafından hasara uğrayabilir. Bu mutajenlerin çoğu interkalasyon yaparak DNA üzerindeki ardışık iki baz çifti arasına girerek baz çiftlerinin arasının açılmasına ve DNA çift sarmalının çözülmesiyle DNA ipliklerinin bozulmasına yol açar. Bu bozulma ile birlikte DNA'nın transkripsiyonu ve

replikasyon basamakları engellenir, toksisiteye ve mutasyonlara neden olur. İnterkalasyon yapan moleküllerin çoğu aromatik ve düzlemsel olup örnek olarak etidyum bromür, akridin, daunomisin, talidomid, doksorubisin verilebilir. DNA interkalatörlerinin çoğu kanserojen olup etidyum bromür, benzopiren diol epoksit, aflatoksin [92], akridin türevleri [93] ve talidomid [94] en bilinen örnekler olarak sayılabilir.

Her ne kadar toksik özelliklere sahip olsalar da DNA'nın transkripsiyonunu ve replikasyon basamaklarını engellemeleri sebebiyle interkalatörler anti-kanser ajanları olarak kemoterapide kullanılmaktadırlar.

EtBr kullanımı yüksek toksisitesi ve kanserojen etkilerinden dolayı yerini metaller [95], grafenler [96], boyalar [27],[33] nanopartiküller [97] gibi yeni nesil moleküllere bırakmıştır. Bu yapılarla DNA'nın oluşturduğu komplekslerin kazandıkları yüksek floresans özellik sayesinde DNA etkileşimleri incelenmekte DNA görüntülemesi yapılmaktadır.

DNA ile etkileşime girdiğinde floresan özelliğinde değişiklik kazanan birçok maddenin DNA görüntüleme, teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanımı literatürde geniş bir yer almaktadır [20],[22],[24],[27]–[36].

2.5.3. Nükleik Asitlerin Küçük Moleküllerle Etkileşimlerinin Tayin Yöntemleri

DNA, tüm protein ve enzimlerin sentezi için gerekli olan kalıtsal bilgi kodlarını taşıdığı için biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. DNA, hücrenin yapısını ve işlevini doğrudan veya dolaylı olarak kontrol eder. DNA'nın yapısının keşfinden bu yana, antikanser ilaçlarından antibiyotiklere kadar farklı ilaç sınıflarına ait terapötik açıdan önemli çeşitli küçük moleküller için birincil hedef olmuştur. DNA ile ilişkili proteinlerle etkileşime girmenin veya DNA-RNA hibritleri yoluyla etkileşime girmenin yanı sıra, küçük moleküller doğrudan DNA sarmalına bağlanabilir. Bu tür etkileşimler, hücrenin yapısını ve işlevlerini sürdürmede yer alan çeşitli önemli enzimlerin ve proteinlerin aktivitesine müdahale etmek gibi çeşitli süreçlerle sonuçlanır [28].

Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimi literatürde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, gen ekspresyonunu kontrol edebilen etkili terapötik ilaçların geliştirilmesine ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Çeşitli hastalıklara karşı daha yeni ve daha etkili DNA hedefli ilaçlar kolaylıkla geliştirilebilmektedir. Çeşitli kanser önleyici

ilaçların etki mekanizmasını anlamak, ilaç-DNA etkileşimlerini inceleyerek mümkün olmuştur [28].

Oligonükleotitler; genetik test, araştırma, adli tıp uygulamaları, hastalık teşhisi ve son yıllarda terapötiklere kadar birçok kullanım alanına sahip olan kısa çift sarmal veya tek iplik DNA veya RNA molekülleri, oligomerleridir. DNA, milyonlarca nükleotit içeren çok büyük bir molekül olup DNA'nın aksine, oligonükleotitler genellikle 13-25 nükleotit içerir ancak daha büyük de olabilirler. Nadiren 200 nükleotidi aşarlar. Aptamerler ise, kısa yapay DNA veya RNA dizileri olup küçük moleküllere bağlanmanın yanı sıra nükleik asitler, proteinler, hücreler, dokular ve organlara bağlanabilen yapılardır. Belirli bir hedef molekülü bağlayabilme özelliklerinden yola çıkarak hastalıkların moleküler belirteçlerini tanımlama, ilaçlar, ilaç dağıtım sistemleri, kontrollü ilaç salınım sistemleri, moleküler mühendislik gibi alanlarda kullanılırlar.

Literatürde DNA ile çok iyi bağlanma gösteren benzimidazol temelli yeni nesil metal kompleksleri ve perilen diimide türevleri kullanılarak yapılan DNA görüntülenmesi hakkında birçok çalışma yer almaktadır. DNA sarmalının içinde bulunan hidrofobik yapı, moleküllerin floresans özelliklerinde büyük değişikliklere yol açmaktadır. DNA ile etkileşime girdiğinde floresan özelliğinde değişiklik kazanan birçok maddenin DNA görüntüleme, teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanımı literatürde geniş bir yer tutmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, bu maddelerin florometrik yöntemlerle çok düşük derişimlerde analizleri yapılabilmektedir. Floresans katsayısı yüksek olan bileşikler çok küçük miktarlardaki tayine olanak verebilmektedir.

Molekül-DNA etkileşimlerini araştırmak için onların DNA-bağlanma modunu bulmak önemlidir [58]. Daha önce Bölüm 2.4'te detaylıca bahsedildiği üzere DNA birçok potansiyel bağlanma bölgesine sahip olan karmaşık yapıda büyük bir moleküldür. DNA ile küçük moleküller; kovalent veya koordine kovalent bağlanmayı içeren tersinmez bağlanma şeklinde, elektrostatik etkileşimler, interkalasyon ve yarı bağlanma gibi molekülerarası etkileşimler ile tersinir şekilde bağlanabilirler [28],[58]. İnterkalasyon ve minör yarı bağlanması en yaygın olanlarıdır [58].

Küçük moleküllerin DNA ile bağlanma modları hakkında bilgi sağlamak için yaygın olarak çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler, optik olmayan yani doğrudan yöntemler; Çok Boyutlu NMR Spektroskopisi (Multidimensional NMR

Spectroscopy), X-ışını Kristalografisi (X-ray crystallography), Kütle Spektrometrisi ve viskozite ölçümü, optik yani dolaylı yöntemler; Absorbans Spektroskopisi, Floresans Spektroskopisi, Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism), Doğrusal Dikroizm (Linear Dichroism) ve elektroforez tabanlı yöntemleri içermektedir [27],[56],[65].

Bu moleküler yöntemleri uygulamak, küçük molekül tasarımı için önemli olan yapı-aktivite faktörlerini belirlememizi sağlar. Birçok durumda, küçük moleküller ile DNA etkileşimlerini kapsamlı bir şekilde aydınlatmak için moleküler yöntemlerin kombinasyonları gereklidir. Elde edilen verileri hücrel yanıtla birleştirmek, tedavi amacıyla kullanılan küçük molekül-DNA bağlama etkileşimlerinin sitotoksik etkiyi nasıl ortaya koyduğunun anlaşılmasına yardımcı olur [65].

Tez çalışmasında benzimidazol temelli metal kompleksleri ve perilen diimit türevi yapıların DNA ile bağlama etkileşimleri hakkında kalitatif ve/veya kantitatif bilgi sağlayan çeşitli spektroskopik, spektrometrik ve elektroforetik yöntemler kullanılmıştır. Etkileşim stokiometrilere, kararlılıkları ve etkileşim oluşumunda etkili olan kovalent olmayan etkileşimin türünün tayini ile ilgili çalışmalar ESI-MS ve MALDI-MS ile incelenmiştir. Bağlanmanın uygun olduğu kompleks yapıların absorbans değişiklikleri Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ile ve floresans verimleri Floresans Spektroskopisi ile izlenmiş ve küçük molekül-DNA etkileşim mekanizmaları araştırılmıştır. Ayrıca tez çalışmasında kullanılmak üzere sentezlenen yapıların Agaroz Jel Elektroforezi yönteminde sensör-boyar madde olarak kullanımı ve DNA teşhisinde kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiştir.

Kütle spektrometrisi, nükleotitler, oligonükleotitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere biyomoleküllerin karakterizasyonu için güçlü bir araçtır. Kütle spektrometrisinin avantajları yüksek hassasiyet, yüksek kütle doğruluğu ve daha da önemlisi yapısal bilgidir. Tarihsel olarak, oligonükleotitler ve nükleik asitlerin kütle spektrometrisi kullanılarak karakterize edilmesinin zor olduğu birçok kez kanıtlanmıştır. Nükleik asitler ve oligonükleotitlerin kütle spektrometresi ile analizlerinde genellikle analiz numunelerinin saf olmaması, verimsiz iyonlaşma süreçleri nedeniyle analiz için düşük iyon bolluğu ve daha yüksek moleküler kütleli bileşikler için düşük kütle doğruluğu gibi problemler sıklıkla ortaya çıkmaktadır [98].

Kütle spektrometrisi teknolojilerdeki ve iyonlaşma tekniklerindeki gelişmeler ile birlikte elektrosprey iyonlaştırma ve matriks destekli lazer desorpsiyon /iyonlaştırmanın geliştirilmesindeki ilerlemeler artık oligonükleotitlerin ve nükleik asitlerin yüksek hassasiyet ve iyi kütle doğruluğu ile analizine izin vermektedir. Bu gelişmeler, bilinmeyen oligonükleotit yapılarının tanımlanması için kütle spektrometrisinin kullanılmasına izin vermekte ve ilgili numuneler üzerinde dizi bilgisi elde etmeye odaklanan uygulamalar için kullanılmaktadır [98].

Elektrosprey İyonlaştırmalı Kütle Spektrometrisi (ESI-MS), düşük örnek tüketimi, hızlı analiz süresi, analiz kolaylığı nedeniyle yüksek verimli tarama teknikleri için çok uygun olduğundan küçük molekül-DNA komplekslerinin kovalent olmayan etkileşimlerini incelemek için yararlı bir araç olarak ortaya çıkmıştır [29],[65]. ESI-MS'nin en çarpıcı avantajı, belirli koşullar altında, kovalent olmayan komplekslerin, kompleksin kendisini bozmadan gaz fazına transferine ve dolayısıyla stokiyometrinin, uygun olması durumunda etkileşim modları ve etkileşim enerjilerinin belirlenmesine olanak sağlamasıdır [65],[99]. 100-mer seviyesine kadar olan oligonükleotitlerin ve nükleik asitlerin kütle analizi, ESI-MS kullanılarak gözlenmiş olup önemli ölçüde daha büyük oligonükleotitlerin (400-mer seviyesine kadar) moleküler iyonları, MALDI-MS kullanılarak üretilebilir, ancak gerçekçi kütle analizi, 125-mer seviyesindeki oligonükleotitler ve nükleik asitlerle sınırlıdır [98].

Tam taramalı kütle spektrumları, bağlanma stokiyometrilerini ve seçiciliği değerlendirmek için kullanılabilirken, bağlanma modu ve yapısal bilgiler, Çarpışmayla Aktive Olan Ayrışma (Collisional Activated Dissociation-CAD) gibi tandem kütle spektrometrisi teknikleri ile incelenebilir. Bu alanda yapılan geçmiş çalışmaların çoğu, ilaç/çift sarmal DNA komplekslerini analiz etmeye odaklanmıştır ve gaz fazındaki davranışın çözelti ile ilişkilendirilebileceğini gösteren umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, Gabelica ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kütle spektrumlarında gözlemlenen bağlanma stokiyometrilere ve bağlı iyon bolluğunun, bilinen çözelti bağlama davranışını yansıttığı gösterilmiştir [100]. Çift sarmal ile etkileşimli ilaçların minör yarık ile ve interkalasyon şeklindeki bağlanma modları, Wan ve çalışma arkadaşları tarafından CAD deneyleri kullanılarak ayırt edilmiştir [29]. ESI-MS'nin küçük moleküllerin G-dörtlü DNA ile kovalent olmayan etkileşimlerini

değerlendirme üzerine yoğunlaşmış olan çalışmalarda bir nükleik asit yapısı antikanser ilaç hedefi olarak incelenmiştir [101],[102].

Elektrosprey iyonlaştırma için sıvı formdaki numune girişi gerekmekte ve bu durum oligonükleotitlerin analizi için uygun bir yöntem sağlamaktadır. Bu iyonlaşma türünde sıvı haldeki numuneler, dar bir kapiler yoluyla güçlü bir elektrostatik alana verilmektedir. Oligonükleotitlerin ESI-MS'inde organik bir çözücü ve su karışımları kullanılmaktadır. Tipik organik çözücüler olarak izopropanol, metanol veya asetonitril sayılabilir. ESI deneyleri için oligonükleotit numune derişimleri, kullanılan elektrosprey aparatının tipine bağlı olarak mikromolar ve nanomolar seviyelerde hazırlanmaktadır [98].

ESI kullanılarak üretilen oligonükleotit spektrumu, tipik olarak, tek bir protonun ayrılmasıyla birbirinden farklı olan bir dizi çok yüklü negatif iyon ile karakterize edilir. ESI tarafından üretilen iyonlardan gelen çoklu yük etkisi sayesinde kovalent olmayan yüksek moleköl kütleli yapılara ait sinyaller tayin edilebilir kütle/yük oranı aralığında gözlemlenebilmekte kütle spektral analizi için avantaj oluşturmaktadır [98],[103].

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma için, oligonükleotit numuneleri ultraviyole (UV) ışığı absorbe eden bir matriks ile karıştırılarak bir numune plakası üzerine yüklenmekte ve havada kurumaya bırakılmaktadır. Oligonükleotitlerin analizlerinde en çok kullanılan MALDI matriksleri, 3-hidroksipikolinik asit, 2,4,6-tri-hidroksiasetofenon ve 6-aza-2-tiotimidir. MALDI için numune çözeltileri mikromolar veya nanomolar seviyede hazırlanmaktadır. Bir oligonükleotitin MALDI tarafından elde edilen kütle spektrumu, tipik olarak, tek bir protonun ayrılmasıyla oluşmuş iyonun kütlelerinde negatif tek yüklü bir sinyal içerir. MALDI ile elde edilen iyonların tek yüke sahip olma olasılıklarının yüksek olması büyük kompleks yapıların tayinini zorlaştırmaktadır [98],[103].

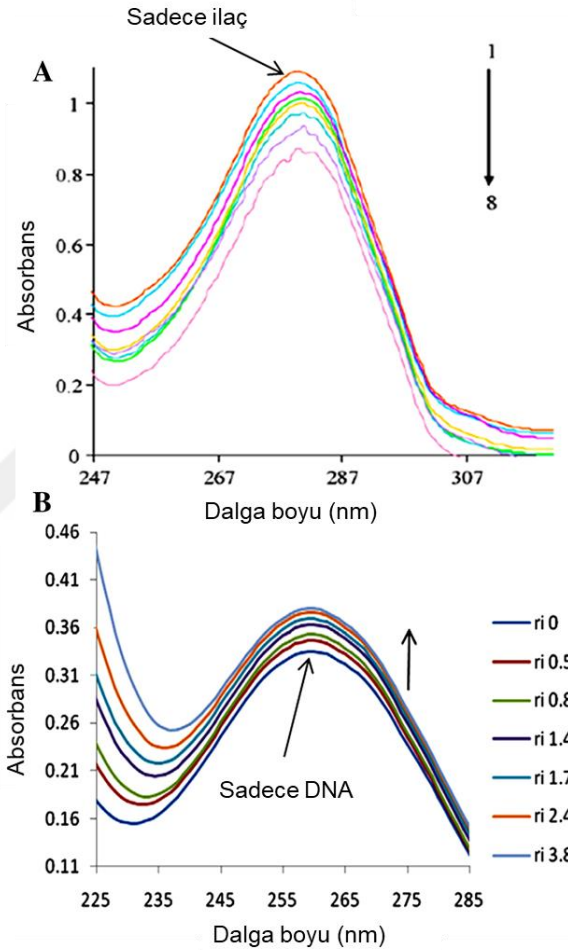
UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi basit, yaygın olarak kullanılan ve küçük moleküllerin DNA ile etkileşimini tespit etmede en etkili yöntemlerden biridir [28],[56]. DNA'nın küçük moleküller ile etkileşim üzerindeki kararlılığı, UV-görünür bölge absorpsiyon ölçümü kullanılarak kolayca incelenebilir. Genel olarak, küçük moleküllerin DNA ile etkileşimi ve yeni bir kompleksin oluşumu, UV-görünür bölge spektrumlarda değişikliklere yol açar [104],[105]. Yorumlamaları detaylandırmak için, serbest küçük molekölün spektrumunun yanı sıra DNA ile olan kompleksinin bant yoğunluğu ve

konumu da kaydedilir [28]. Şekil 2.12.A'da Khorasani-Motlagh ve arkadaşlarının bir çalışmasından elde edilen artan DNA derişiminde ilacın absorpsiyon spektrumları yer almaktadır [106]. Banttaki herhangi bir değişikliğin bir kompleks [28],[106]–[109] oluşumundan kaynaklandığı kabul edilir. Küçük moleküllerin ve DNA'nın etkileşimi, DNA'nın absorpsiyon spektrumundaki değişiklik incelenerek de tanımlanabilir. Bu durumda, sabit bir DNA derişimine (λ_{max} 260 nm'dir) artan bir derişimde küçük moleküller eklenir. Şekil 2.12.B'de Shahabadi and Hadidi'nin bir çalışmasından elde edilen artan ilaç derişiminde DNA spektrumları yer almaktadır [107]. Küçük moleküllerin derişiminin arttırılması üzerine, absorbanstaki herhangi bir değişiklik ve ayrıca pikin pozisyonundaki herhangi bir kayma kaydedilir ve etkileşim yorumlanabilir.

DNA spektrumunun iki ana özelliği, çift sarmal yapısındaki bir değişiklik nedeniyle ortaya çıkan “hiperkromik” etki ve “hipokromik etki”dir [65]. Küçük molekülün bağlanması sırasında DNA'nın konformasyonunda ve yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik, spektral davranışında bir değişikliğe dönüşmektedir. Küçük moleküllerle etkileşimde, DNA'nın ikincil yapısında oluşan bir kararsızlık hiperkromizme yol açarken, hipokromizm, DNA'nın ikincil yapısının elektrostatik etkiler veya küçük moleküllerin interkalasyonu ile kararlılığından kaynaklanır [28].

Genel olarak, küçük moleküllerin DNA çift sarmalına interkalasyonlarıyla hipokromik etkinin yanı sıra absorpsiyon spektrumlarında batokromik kayma (kırmızıya kayma) gözlemlenir [27],[28]. Nükleobazlar düşük simetriye ve birkaç heteroatom eşleşmemiş çiftine sahip olduklarından, nükleik asitlerin UV/Vis Spektroskopisine baz absorpsiyonları hakimdir. Bireysel bazlar için geçişler örtüşür ve tüm nükleik asit biyomolekülü için 250-280 nm arasında bir maksimum absorbans ile tek bir geniş güçlü absorpsiyon bandı üretir [56],[65],[110]. Bu durum nükleobazların pirimidin ve pürin halka sistemlerinin π - π geçişlerinden kaynaklanır [110]. Nükleik asitlerin maksimum absorbans dalga boyu (λ_{max}), AT ve GC baz içeriğine bağlıdır. Benzer şekilde, nükleik asidin molar absorpsiyon katsayısı (ϵ_{max}), baz bileşimine ve benimsenen tercih edilen ikincil yapıya bağlıdır [65]. Nükleobazlarla π -istiflenmesi, interkalatörün elektron dağılımını bozar ve sonuç olarak π - π^* geçişlerini etkiler. π - π^* geçişlerinin enerjisi azalır ve bu durum batokromik etkiye sebep olur. İnterkalatörün π^* orbitali, baz çiftlerinin π orbitalleri ile eşleştiğinde ve eşleşen π^* orbitali kısmen elektronlarla dolduğunda, geçiş olasılığı azalır ve bu durum interkalatörün UV/Vis bandının hipokromizmiyle sonuçlanır.

Hipokromizm ve kırmızıya kaymanın boyutu, bağlanma gücünün bir ölçüsüdür [56]. Klasik DNA interkalatörleri, tipik olarak, DNA bağlanmasında absorbansta %30 ila %40'lık bir azalma (hipokromizm) yaşar [56]. Batokromizm genellikle 10 nm'den küçüktür.



Şekil 2. 12. A) Artan DNA derişiminde ilacın absorpsiyon spektrumları [106], B) artan ilaç derişiminde DNA spektrumları [107]

DNA'nın dış yüzeyine bağlanan yarık bağlayıcı moleküller söz konusu olduğunda, genellikle küçük batokromizm (6-8 nm) gözlenir veya hiç batokromizm gözlenmez. DNA'nın absorpsiyon spektrumunun küçük molekülden etkilenebileceğini veya bunun tersini belirtmek önemlidir. Belirsizliği ortadan kaldırmak için, UV-görünür spektroskopi kullanılarak etkileşimi incelemekten önce uygun küçük molekül veya DNA derişimi ile temel çizgisi düzeltilmesi (base line correction) yapılmalıdır [28].

Çift sarmallı DNA'da nükleobazlar çift sarmal içinde istiflendiğinden, tek sarmallı DNA'ya kıyasla absorbands azalır. Bu nedenle, DNA çift sarmalının ısıtma üzerine (genellikle "erime" olarak anılır) iki tek sarmal halinde ayrışması, sıcaklıkla 260 nm'de absorbanstaki artış ölçülerek uygun bir şekilde izlenebilir [56].

DNA'ya bağlanma, genellikle maksimum absorpsiyon ve/veya pik sönüm katsayısında (peak extinction coefficient) bir değişikliğe neden olur. Bu durum bağlanma modunu belirlemek için yetersiz olmakla birlikte, denge bağlama sabitleri (equilibrium binding constants), gözlemlenen herhangi bir kaymanın derişim bağımlılığına dayalı olarak belirlenebilir [27],[56].

Bir kompleks-DNA etkileşimi için bağlanma sabiti K_b , kompleksin DNA ile veya DNA'nın kompleksle ile titre edilmesi ve Eşitlik 2.2'de yer alan denklemin kullanılmasıyla hesaplanabilir [56].

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad \text{Eşitlik 2.2}$$

Eşitlik 2.2'de ϵ_a görünen sönüm katsayısıdır ve ϵ_f ve ϵ_b sırasıyla serbest ve tam bağlı kompleksin sönüm katsayılarıdır. ϵ_f , Beer yasasına göre izole edilmiş kompleksin bir kalibrasyon eğrisinden elde edilirken, ϵ_a , gözlemlenen absorbands (A_{obs}) ve kompleks derişiminin oranından hesaplanır. $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ ile $[DNA]$ karşılaştırması düz bir çizgi verir. K_b , eğim ve y eksenini kesme noktasının birbirine oranıdır [56].

Bağlanma stokiyometrisi, sürekli varyasyon analizi ile belirlenebilir. Metal kompleksinin ve DNA'nın toplam molar derişimi sabit tutulurken mol fraksiyonları değişir. Bağlanma stokiyometrisi, metal kompleksinin mol fraksiyonuna karşı absorbanstaki değişimin grafiğindeki maksimuma karşılık gelir [56].

UV/Vis spektroskopisi genellikle bir metal kompleksinin spesifik DNA sekansları ile etkileşimi için bağlanma sabitlerini veya bağlanma seçiciliğini incelemek amacıyla dörtlü ve çift sarmal DNA ile karşılaştırmak için uygulanır [56].

Kovalent olmayan etkileşimleri incelemek için kullanılan diğer bir spektroskopik teknik olan Floresans Emisyon Spektroskopisi, geniş bir doğrusal derişim aralığı ve yüksek seçicilik ile komplekslerin DNA bağlanma afinitesini nicel olarak incelemek için hassas bir yöntemdir [56]. Genel olarak, aromatik fonksiyonel gruplar içeren bileşikler, alifatik,

alisiklik karbonil yapısı içeren küçük moleküller veya yüksek oranda konjuge çift bağ yapısı içeren bileşikler ile kıyaslandığında yoğun floresan gösterir. DNA'nın floresan özelliği ihmal edilebilir olduğundan, ilacın içsel floresansındaki değişiklik genellikle değişen DNA derişiminin varlığında incelenir. Şekil 2.13.A'da Shahabadi ve Maghsudi'nin bir çalışmasından elde edilen DNA'nın yokluğunda ve varlığında ilacın floresan emisyon spektrumları yer almaktadır [111]. DNA eklendiğinde, ilacın DNA ile etkileşimi nedeniyle floresan yoğunluğunda azalma olmaktadır.

Floresan spektroskopisi genellikle ilacın floresan emisyon özelliğine dayanan çeşitli analitik araçlar kullanılarak DNA ile ilaçların bağlanma modunu belirlemek için kullanılır. Küçük molekülün tek iplik DNA (single stranded DNA-ssDNA) ve çift sarmal DNA (double stranded DNA-dsDNA) varlığında floresan titrasyonu, küçük moleküllerin DNA ile bağlanma modunu aydınlatmak için yapılmaktadır. Şekil 2.13.B'de Ling ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmadan elde edilen dsDNA ve ssDNA tarafından yarık bağlayıcı ilacın floresan emisyon yoğunluğunun söndürülmesi (Quenching of fluorescence emission intensity) yer almaktadır [112]. dsDNA ve ssDNA, ilacın DNA ile bağlanma modunu ayırt etmek için kullanılmaktadır. Minör yarık bağlayıcıların tercihen ssDNA'ya bağlandığı ve interkalasyon yapan moleküllerin dsDNA için yüksek afiniteye sahip olduğu bilinmektedir. dsDNA'nın varlığında floresans söndürme, ssDNA'nın varlığından daha verimliyse, küçük molekül DNA'ya büyük ölçüde interkalatif modda bağlanmaktadır. Bununla birlikte, ssDNA mevcudiyetinde daha yüksek bir söndürme varsa bir yarık bağlama etkileşimi olduğu yorumu yapılabilir. Bir dsDNA, iplik ayrılması meydana geldiğinde interkalasyon yapan küçük molekülleri serbest bırakır, bu da DNA'nın söndürme özelliğinde bir azalmaya yol açmaktadır. Yarık bağlayıcılar söz konusu olduğunda, küçük moleküller, hidrojen bağlama ve van der Waals kuvvetleri yoluyla DNA'nın baz çiftleriyle etkileşime girmektedir [112].

Floresan ilaçlarla DNA'nın bağlanma modunu belirlemek için iyodür söndürme çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Söndürme deneyleri doğrudan yapılmakta olup bağlı moleküllerin sarmalın dışında veya içinde olması durumunu gösterir. İyodür iyonları, sulu bir ortamda küçük moleküllerin floresansını etkili bir şekilde söndürebilen negatif yüklü söndürücülerdir. DNA ile etkileşimde, negatif yüklü olan iyodür iyonları, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası tarafından itilmektedir. Anyonik söndürücülerin floroforma yaklaşımı kısıtlandığından, DNA sarmalına eklenen herhangi bir küçük

molekül, söndürülmekten iyi korunur [112]. Şekil 2.13.C’de Cui ve arkadaşlarının bir çalışmalarından elde edilen interkalasyon yapan ilacın potasyum iyodür tarafından DNA’nın yokluğunda ve varlığında floresanla söndürülmesine ait spektrum yer almaktadır. İnterkalasyon yapan herhangi bir molekül için DNA ortamının yokluğunda ve varlığında potasyum iyodür söndürmede önemli bir fark vardır [113].

Elektrostatik etkileşim ve yarık bağlanması sırasında ise, moleküller çevreleyen çözücüye ve anyonik söndürücüye maruz kalır ve DNA ortamında bile anyonik söndürücülerden iyi korunmaz [112]. Bununla birlikte, yarık bağlanması durumunda bile DNA tarafından floroforun hafif bir şekilde korunduğunu öneren bazı yayınlar raporlanmıştır [114],[115] ancak, bu koruma interkalasyona kıyasla çok daha azdır. Şekil 2.13.D’de Ling ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmadan elde edilen yarık bağlayıcı molekül durumunda floresans söndürme çalışmalarına ait spektrum yer almaktadır [112]. Yarık bağlayıcılar için DNA’nın yokluğunda (A) ve varlığında (B) floresan söndürmede çok az fark vardır.

Guanidin HCl ve üre gibi kimyasal denatüranlar, çift sarmallı DNA sarmalını destabilize etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tür denaturantlar, küçük moleküllerin DNA ile bağlanma modunu analiz etmek için kullanılır [116]–[118]. Şekil 2.13.E’de Grueso ve arkadaşlarının denatüre edici maddeler üzerine yaptıkları bir çalışmadan elde edilen spektrum yer almaktadır. DNA çift sarmalının artan üre derişimi ile denatürasyonu üzerine, DNA ipliklerinin ayrılmasıyla birlikte interkalasyona uğramış moleküller çözelti içinde salınarak floresan davranışında değişikliğe yol açmaktadır [116].

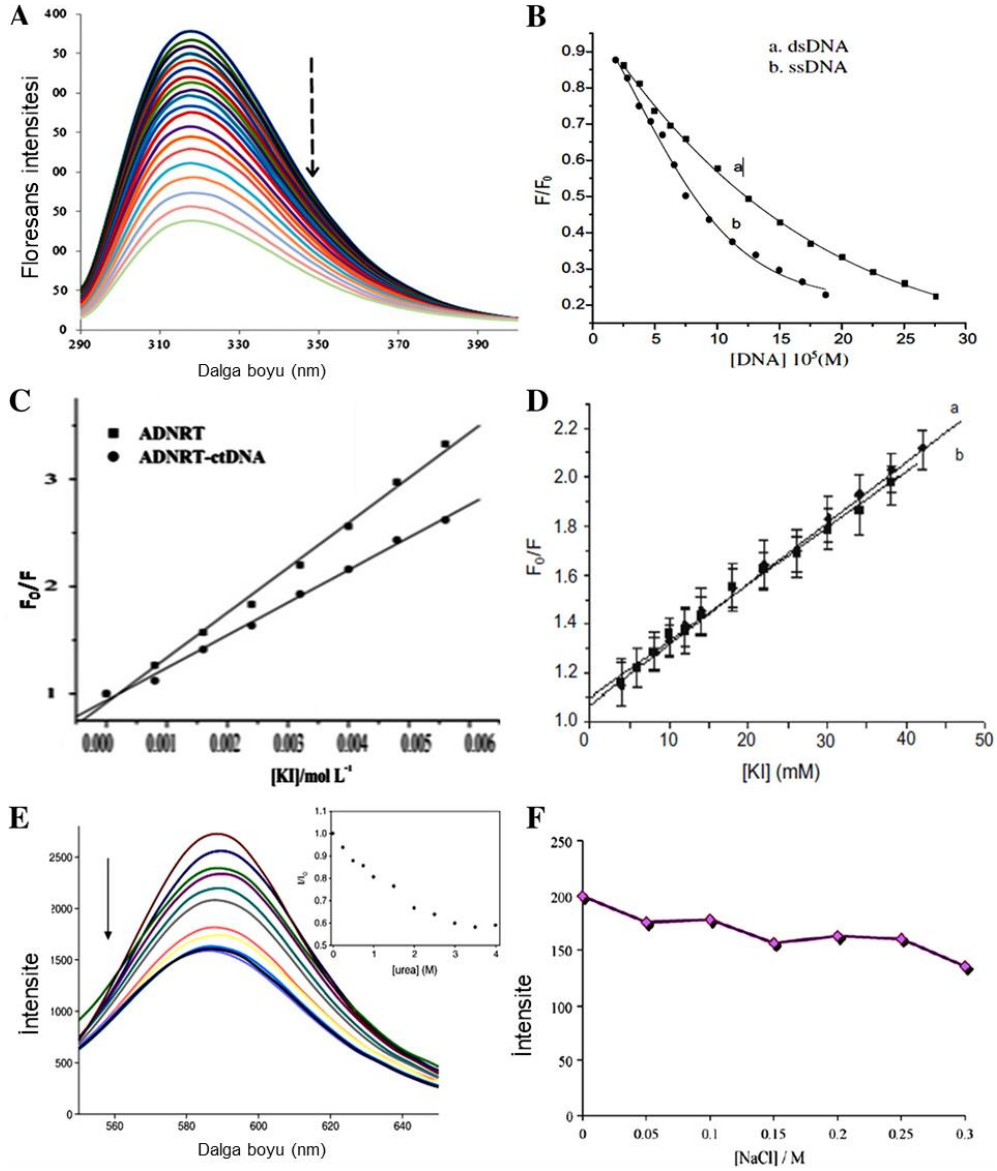
İyonik gücün ilaç-DNA etkileşimi üzerindeki etkisini incelemek aynı zamanda küçük moleküller ve DNA arasındaki bağlanma modunu analiz etmek için de yararlı bir yöntemdir. Şekil 2.13.F’de Khorasani-Motlagh ve arkadaşlarının ilaç-DNA etkileşiminde iyonik gücün rolünü incelemek için yaptıkları bir çalışmalarından elde edilen spektrum yer almaktadır [106]. Bu amaçla NaCl gibi güçlü elektrolitler kullanılmaktadır. DNA’nın yokluğunda serbest liganda NaCl ilavesinin ligandın floresan verimi üzerinde çok az etkisi olmalı veya hiç etkisi olmamalıdır. Bununla birlikte, DNA’nın varlığında Na⁺, DNA fosfat omurgasının negatif yüklerini kısmen nötralize ederek aralarındaki elektrostatik itmenin azalmasına neden olur. Küçük molekül ve DNA yüzeyi arasındaki elektrostatik çekim, Na⁺ ilavesiyle zayıflar. Yüzeye bağlanan moleküller için, elektrostatik bağlanma yarığın dışında (DNA ile bağlanarak floresan yoğunluğunun

söndürüldüğü yerde) gerçekleşir. DNA sarmalının yarığında oturan küçük bir molekül, çevreleyen çözücüdeki iyonik güce, interkalasyonlu bir molekülden çok daha fazla maruz kalır [115]. NaCl ilavesi etkileşimi zayıflatır ve ilacın DNA yüzeyinden salınmasıyla sonuçlanarak floresan yoğunluğunun artmasıyla sonuçlanır [119].

İlaç-DNA etkileşimlerinin modunu belirlemek için iyi bilinen çeşitli DNA bağlayıcı boyalar kullanılır. Bu boyaların DNA'ya bağlanması daha önce çalışılmış ve bağlanma modları belirlenmiştir. Bu floresan boyalar kullanılarak gerçekleştirilen rekabetçi yer değiştirme deneylerinde, DNA'ya bağlı olan boyayı yerinden eden herhangi bir küçük molekül, yeri değiştirilmiş boya ile aynı modda DNA ile etkileşime girmektedir. Küçük moleküllerin DNA-boya sistemine bağlanmasında floresan davranışındaki değişiklik kolayca yorumlanabilir. Bu deneyler, bağlanma modları arasında ayırım yapmak için çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çift sarmal DNA bağlanma afinitesinin ölçümü için iki florofor örneği olan düzlemsel heterosiklik interkalatör etidyum bromür ve hilal şeklindeki minör yarık bağlama maddesi Hoechst 33258 moleküllerinin çözeltide düşük floresansa sahip oldukları bilinmekte ve DNA'ya bağlandıklarında yüksek oranda floresan hale geldikleri için, fotofiziksel özellikleri, metallodrogların floresan yoğunluğunun azalması yoluyla DNA'yı bağlama yeteneğini belirlemek için kullanılabilmektedirler [65].

Etidyum bromür, DNA'ya interkalatif bir şekilde bağlanan bir floresan probu olarak yaygın olarak kullanılır [28]. Etidyum bromürün floresansı, DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yaptığına artmaktadır. Etidyum bromür kullanılan yarışmalı bağlanma deneylerinde, Etidyum bromür ile aynı mod aracılığıyla DNA'ya bağlanan herhangi bir molekül, Etidyum bromürü DNA sarmalından uzaklaştıracak ve DNA-Etidyum bromür sisteminin floresan yoğunluğunda bir azalma ile sonuçlanacaktır [28],[56],[65]. Şekil 2.14.A'da Özlüer ve Kara tarafından yürütülen Etidyum bromürün yer değiştirme deneyi sonuçlarından elde edilen spektrum yer almaktadır [120]. DNA-Etidyum bromür sisteminin floresan söndürme derecesi, molekül ve DNA arasındaki interkalasyonun derecesini belirlemek için kullanılabilir. Yarık bağlama ve yüzey bağlama molekülleri, DNA-Etidyum bromür floresan yoğunluğu üzerinde hiçbir etki göstermez [28].



Şekil 2. 13.A) DNA'nın yokluğunda ve varlığında ilacın floresan emisyon spektrumları [111], B) dsDNA ve ssDNA tarafından yarı bağlayıcı ilacın floresan emisyon yoğunluğunun söndürülmesi [112], C) DNA'nın yokluğunda ve varlığında KI tarafından interkalasyon yapan ilacın floresans söndürülmesi [113], D) Yarı bağlayıcı molekül durumunda KI söndürme çalışmaları, E) Denatüre edici maddelerin etkisi [116], F) İlaç-DNA etkileşiminde iyonik gücün rolü [106]

Son yıllarda, küçük moleküllerin DNA ile etkileşim modunu incelemek için başka bir düzlemsel fenazin boyası, nötr kırmızı (Neutral Red) kullanılmıştır. Nötr kırmızı, interkalatif modda DNA'ya bağlanır ve DNA ile bağlanma üzerine Nötr kırmızının floresan yoğunluğunun artmasıyla sonuçlanır. Küçük moleküller, Nötr kırmızılı DNA sarmalından çıkarabilir ve DNA-Nötr kırmızı sistemlerinin emisyon yoğunluğunu ancak

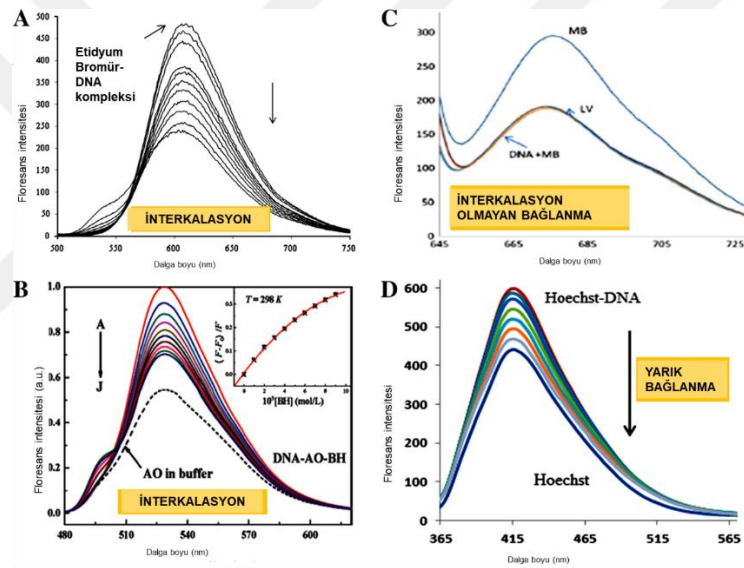
DNA'nın bazlarına interkalasyon yaparlarsa azaltabilir. Klasik bir interkalasyon boyası olan Akridin turuncusu (Acridine Orange), benzer rekabetçi yer değiştirme deneylerinde de kullanılmaktadır [28]. DNA sarmalına interkalasyon yapan herhangi bir molekül, Akridin turuncusunu DNA'daki interkalasyon bölgelerinden uzaklaştırır ve DNA-Akridin turuncusu sisteminin floresan yoğunluğunda önemli bir azalmaya neden olur. Şekil 2.14.B'de Li ve arkadaşları tarafından yürütülen Akridin turuncu yer değiştirme deneyi sonuçlarından elde edilen spektrum yer almaktadır [121].

Bir çalışmada ayrıca interkalasyon modu aracılığıyla DNA ile etkileşime giren bir fenotiyazinyum boyası olan Metilen mavisi (Methylene Blue) kullanılmıştır [122]. Metilen mavisi tek başına floresandır, ancak Metilen mavisinin floresan yoğunluğunda DNA sarmalına interkalasyonu nedeniyle azalma olmaktadır. Metilen mavisinin başka herhangi bir interkalatör tarafından DNA sarmalından rekabetçi bir şekilde yer değiştirmesi, daha önce DNA tarafından söndürülmüş olan floresan yoğunluğunun artmasına yol açacaktır. Bununla birlikte, interkalatif olmayan modda DNA'ya bağlanan küçük moleküller, Metilen mavisini DNA sarmalından salamaz ve bu nedenle floresan yoğunluğunda hiç veya çok az değişiklik gözlenir. Şekil 2.14.C'de Shahabadi ve Hadidi tarafından yürütülen Metilen mavisi yer değiştirme deneyi sonuçlarından elde edilen spektrum yer almaktadır [107].

Yarık bağlayıcılar söz konusu olduğunda, çift sarmallı B-DNA'nın minör yarığa bağlanan ve AT açısından zengin diziler için yüksek özgüllüğe sahip olan Hoechst 33258 kullanılarak rekabetçi yer değiştirme çalışmaları yapılmaktadır. Hoechst 33258 boyasının DNA ile bağlanmasıyla birlikte floresan yoğunluğunda artış olmaktadır. Yarık bağlama molekülleri, Hoechst 33258 boyasını DNA sarmalının minör yarığında çıkarabilir ve bu da DNA-Hoechst sisteminin floresan veriminin azalmasına neden olmaktadır [28]. Şekil 2.14.D'de Shahabadi ve Maghsudi tarafından yürütülen yarık bağlayıcı Hoechst 33258 boyasının yarık bağlayıcı molekül tarafından yer değiştirme deneyi sonuçlarından elde edilen spektrum yer almaktadır [111].

Birçok metal interkalatör ve yarık bağlayıcı floresandır ve floresan emisyonları ortama çok duyarlıdır. Yüksek polariteli (sulu çözelti) bir ortamdan düşük polariteli (DNA) ortama geçiş, uyarma ve emisyon bandının değişmesine neden olur. Ayrıca, DNA ile etkileşimde, metal kompleksi, genellikle floresan söndürücüler olarak hareket eden çözücü moleküllerinden korunduğu için, genellikle bir floresan artışı gözlemlenir [56].

Örneğin $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ kullanıldığında floresan yoğunluğundaki artış o kadar belirgindir ki, bu tür sistemler için 'moleküler ışık anahtarı' terimi türetilmiştir. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ gibi dışarıdan eklenen bir söndürücü ile floresan söndürme, DNA bağlanma modunu netleştirmek için kullanılmıştır [28]. Yarık bağlayıcıların, interkalatörlere göre floresans söndürücüye daha duyarlı olduğu varsayılmaktadır. İnterkalasyon yapan metal kompleksi daha az erişilebilirdir ve ayrıca DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları ile anyonik ferrosiyanür arasındaki itici kuvvetler tarafından korunmaktadır. Bununla birlikte, Turro ve arkadaşları, güçlü fakat elektrostatik olarak bağlı Ru komplekslerinin floresansının, interkalasyon yapan Ru komplekslerinin kadar verimli bir şekilde ferrosiyanür tarafından söndürülebileceğini göstermiştir [28].



Şekil 2. 14. A) Etidyum bromür yer değiştirme deneyi [123], B) Akridin turuncu yer değiştirme deneyi [121], C) Metilen mavisi (MB) kullanılarak yer değiştirme deneyi [107], D)Yarık bağlayıcı boyanın yarık bağlayıcı molekül tarafından yer değiştirmesi [111]

Floresan küçük moleküller, bağlanma üzerine sadece dalga boyunda veya kuantum veriminde değişiklikler sergilemekle kalmaz, aynı zamanda DNA bazlarından enerji alıcıları olarak hareket edebilirler. Deneysel çalışmalarda, DNA UV ışığı ile uyarılır ve liganddan floresan beklenir. Bazların emisyon spektrumu ile ligandın absorpsiyon spektrumu arasında makul derecede iyi bir örtüşme varsa, rezonans enerji transferi meydana gelebilir. Yönlendirme faktörü (orientation factor) nedeniyle, bu işlemin verimliliği, interkalatörler için yarık bağlayıcılara göre çok daha yüksektir [27].

Yüksek afiniteye ve nükleik asitlere bağlanma seçiciliğine sahip florojenik organik moleküller, moleküler ve kimyasal biyolojide paha biçilmez araçlardır. Doğrudan spektroskopik ölçümlerin mümkün olmadığı düşük molar sönüm katsayılarına (örneğin Cu (II), Pt (II) ve Mn (II)) sahip metaloilaçların dolaylı DNA bağlanma afinitesini araştırmak için özellikle yararlıdırlar. Floresan mikroskopisinde (Fluorescence microscopy) ve akış sitometrisinde (flow cytometry) rutin olarak kullanılan bu tür boyaların örnekleri arasında; yaygın olarak bir nükleer zıt boyaması olarak kullanılan mavi floresan AT'ye özgü minör yarı bağlayıcı DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), tek iplik ve çift sarmallı DNA'nın saptanması için ve ayrıca bir kromozomal leke olarak kullanılan Sybr Green I interkalatörü ve kırmızı floresan nükleer ve kromozom zıt boyaması propidium iyodür (3,8-diamino-5-[3-(diethyl-metilamonyo)-propil]-6-fenilfenantridinyum diiyodid) sayılabilir. Bununla birlikte, floresan boyalar sadece mikroskop görüntüleme ile sınırlı değildir. Küçük bir ilaç molekülünün DNA'ya bağlanma afinitesini dolaylı olarak değerlendirmek için tasarlanmış yüksek verimli analizlerde ve floresan rezonans enerji transferi (Fluorescence Resonance Energy Transfer-FRET) analizlerini içeren daha karmaşık deneysel çalışmalarda uygulanmaktadırlar [65].

Floresan emisyon spektroskopisi, metal komplekslerinin G4-dörtlü DNA ile etkileşimini incelemek için de yararlı bir yöntemdir. İnterkalasyon durumunda olduğu gibi, dış uç istifleme (external end-stacking) yoluyla bağlanma, metal kompleksini sulu tampondan koruyabilir. Örneğin, dörtlü DNA varlığında $[Pt(dppz\ COOH\ (phpy))]^+$ için 293 kata kadar emisyon artışı gözlemlenmiştir. Emisyon titrasyonu, bağlanma sabitlerini belirlemek için kullanılabilir ve bağlanma seçiciliği ile ilgili sonuçlar, dörtlü, çiftli ve yapılandırılmamış DNA varlığında emisyon artışı karşılaştırılarak çizilmektedir [56].

Floresan olmayan küçük moleküllerin DNA'ya interkalasyonu etidyum bromür yer değiştirme deneyi ile incelenebileceği daha önce bahsedilmiştir. İnterkalatör olarak etidyum bromürün kullanıldığı ve metaloilaç-DNA bağlanma sabitlerini araştırmak için de dolaylı bir titrasyon olan bu yöntem kullanılmaktadır [61]. DNA'ya interkale olduğunda etidyum bromür, 590 nm'de güçlü bir emisyon bandı vermektedir. Etidyum bromür ile satüre olan DNA bir metalointerkalatör ile titre edildiğinde, etidyum bromür kompleks (interkalatör) ile yer değiştirdiğinde etidyum bromür emisyon bandı azalmaktadır. Doğrusal Stern Volmer denklemi, emisyon bandının bağıl yoğunluğu I/I_0

ile kompleksin ve DNA'nın derişim oranı Q arasındaki ilişkiyi (Eşitlik 2.3) tanımlamaktadır [20].

$$I_0/I = 1 + K_q [Q] \quad \text{Eşitlik 2.3}$$

Eşitlik 2.3'te I_0 ve I metal kompleksinin yokluğunda ve varlığında floresan yoğunluklarıdır ve K_q söndürme sabitidir.

Görünür bağlanma sabiti K_{app} , etidyum bromür (EtBr) floresansını %50 azaltan metal kompleksinin derişiminden ve EtBr (K_{EtBr}) için bağlanma sabitinden yola çıkılarak aşağıdaki Eşitlik 2.4 kullanılarak hesaplanabilir:

$$K_{EtBr} [EtBr] = K_{app}[\text{metal complex}50\%] \quad \text{Eşitlik 2.4}$$

Floresan yöntemleri, oligonükleotitlerin dörtlü yapılara katlanması veya bir DNA çift sarmalının baz çifti yığını boyunca bir dambıl şeklindeki (dumbbell-shaped) iki çekirdekli metalinterkalatörün baz çiftlerinin arası açması gibi dinamik süreçleri izlemek için de kullanılabilir [56].

DNA ile küçük moleküllerin arasındaki etkileşimleri incelemek için elektroforetik tabanlı teknikler de kullanılmaktadır. Elektroforetik jel mobilite kaydırma deneyleri (electrophoretic gel mobility shift assays), nükleik asit numunelerini analiz etmek, ayırmak ve saflaştırmak için kullanılan köklü bir analitik tekniktir. Ayrıca literatürde elektroforetik jellerdeki nükleik asitleri görselleştirmek için floresan boyalar yaygın olarak kullanıldığı birçok çalışma da yer almaktadır. Jel elektroforezi, bir elektrik potansiyel farkının etkisi altında, agaroz veya poliakrilamid gibi katı fazlı elek benzeri bir ortamda DNA'nın hareketini içermektedir. Doğal negatif yükü nedeniyle, DNA elektrik alanında katottan anota doğru bir anyon olarak hareket eder. Jel boyunca DNA göçünün hızı, DNA dizisinin uzunluğu ve konformasyonunu içeren çeşitli faktörlere bağlıdır [65].

Floresan nükleik asit jel boyaları, çözelti içinde serbest olduklarında düşük floresansa sahip olan, ancak jellerdeki nükleik asitlere kovalent olmayan bir şekilde bağlanma ile birlikte floresansta (floresan güçlendirme) önemli artışlar sergileyen boyalardır. Bu tür boyalar esas olarak iki farklı kimyasal sınıfa aittir: fenantridinler ve siyanin boyaları. İndoller, imidazoller ve akridinler, hücreler için iyi bilinen nükleik asit boyaları olmasına

rağmen, genellikle jel elektroforezi ile kombinasyon halinde kullanılmazlar. Bunun başlıca nedeni, mavi floresan boyalarla boyanmış jellerin fotoğraflanmasının zorluğu, uyarma dalga boylarının yaygın olarak bulunan ışık kaynaklarıyla zayıf eşleşmesi ve bunların nispeten zayıf floresan güçlendirmesidir [84].

Özellikle agaroz veya poliakrilamid jellerdeki DNA'nın elektroforezi ile küçük miktarlarda DNA'nın saptanması, çeşitli moleküler biyolojik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır bu nedenle DNA'nın yokluğunda düşük floresansa, ancak DNA'nın varlığında güçlü floresansa ulaşmak önemli bir ilerlemedir. Jel ile ayrılmış DNA'nın saptanması için floresan, görünür organik boya, gümüş ve radyo-etiketleme gibi çeşitli DNA görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır ve bunların her biri duyarlılık, güvenlik ve basitlik açısından farklı avantajlara sahiptir. Bu yöntemler arasında en yaygın olanı floresan boyamadır. Etidyum Bromür, SYBR Yeşili ve SYBR Altın DNA görüntülemede kullanılan boyalara örnek verilebilir. Özellikle DNA'yı saptamak için jellerin boyanmasında, kovalent olmayan etkileşim yapan floresan boyaların kullanılmasına ilgi vardır. Boyaların sadece DNA'ya bağlandığında yoğun floresans sergilemesi, düşük arka plan floresansı nedeniyle küçük miktarlarda DNA'nın saptanmasına izin verdiği için bu boyaların kullanımı avantajlıdır. Bununla birlikte, bu boyaların nispeten düşük afiniteleri saptama hassasiyetini önemli ölçüde azaltmaktadır [27].

Cong ve arkadaşlarının Etil mor kullanarak poliakrilamid jellerde DNA için görünür (visible dye) boya bazlı boyama yöntemi geliştirmek için yaptıkları bir çalışmada geliştirilen bu DNA boyama yönteminin basit prosedürü ve düşük maliyeti nedeniyle geleneksel boyama yöntemlerine makul bir alternatif olacağı yorumu yapılmıştır. Metilen mavisi, parlak kresil mavisi, kristal mor ve Nil mavisi gibi çeşitli görünür boya bazlı boyama yöntemleri daha önce bildirilmiş olsa da bu yöntemler uzun boyama süreleri gerektirmekte ve düşük hassasiyet sağlamaktadırlar [124]. Bu nedenle, yeni boyalar ve basit prosedürleri kullanan yöntemler geliştirilmesi, görünür ve/veya DNA ile etkileşime girdiğinde yüksek floresans özelliği kazanan floresan boyaların jel elektroforez yönteminde sensör-boyar madde olarak kullanımıyla birlikte DNA görüntülemede alternatif görüntüleme ajanlarının tasarlanması için önemli bir katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında benzimidazol temelli metal kompleksleri ve perilen diimit türevi yapıların tek iplik DNA oligonükleotitlerinin, bu tek iplik oligonükleotitlerin tamamlayıcı ipliklerinin eşleşmesiyle oluşturulan çift sarmal kısa DNA'ların, uzun zincirli DNA

sarmalının ve tek iplik aptamerler ile kovalent olmayan etkileşimleri hem DNA ile etkileşime girme mekanizmaları üzerinden hem de bu yapıların DNA ile oluşturdıkları komplekslerin floresans özelliklerinden dolayı DNA etkileşimleri ve DNA görüntüleme amacıyla kullanılabilme üzerinden tartışılmıştır.

Tez çalışmaları kapsamında, DNA ile kompleks yapan perilen dimit türevi bileşikler ve benzimidazol temelli metal içeren bileşikler sentezlenip bunların DNA ile bağlanma stokiyo metriklerinin, bağlanma bölgelerinin ve etkileşim mekanizmalarının kütle spektrometrik yöntemlerle incelenmesi, bağlanmanın uygun olduğu DNA etkileşimlerinin floresans verimlerinin de florometrik yöntemlerle incelenmesi ve görüntüleme amacı ile kullanıp kullanılamayacağının araştırılması hedeflenmiştir.

Belirli bir DNA dizilimi ile etkileşebilen bu yapılarının DNA üzerine spre y edilmesi ve reaksiyona girmesi sonucunda DNA görüntülenmesinin yapılması planlanmıştır. Sentezlenen bu yeni bileşiklerin sensör olarak DNA teşhisinde kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiştir. Böylece DNA, RNA ve bunların fraksiyonlarının gözlemlenmesine dayanan ve literatürde ve uygulamalarda sıklıkla kullanılan, oldukça kanserojen olan Etidyum Bromür yerine alternatif görüntüleme ajanları tespit edilmeye çalışılmıştır.

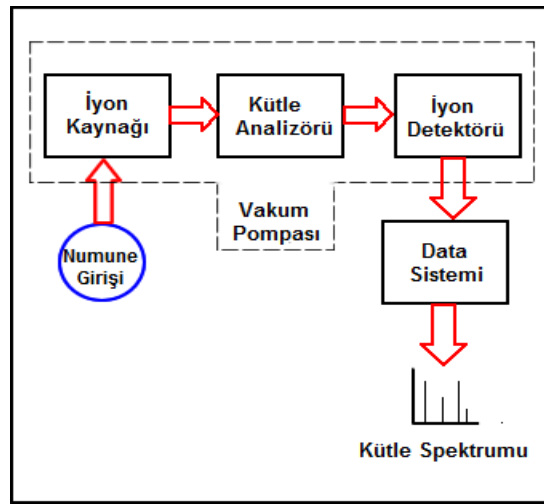
2.6. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrik teknikler ile atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulmakta ve oluşan bu iyonların kütlelerine göre birbirinden ayrılması sağlanarak bağıl miktarlarının kütle/yük oranlarına göre kütle spektrumları elde edilmektedir. Kütle spektrometreleri, yüklü taneciklerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken ve ayrıca momentum farklarından yararlanılarak diğ er yüklü taneciklerden kütle/yük oranına göre ayrılmaları prensibi ile çalışmaktadır [48].

Kütle spektrometrik teknikler; yüksek hassasiyet ($<10^{-15}$ mol), seçicilik, analiz hızı, düşük miktarda örnekle çalışabilme, tam kütle analizinin yapılabilmesi, izotopik dağılımın belirlenebilmesi veya parçalanma ürünlerinin tayini gibi özgün olması ve polimerlerden yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllere kadar birçok molekülün analizlerinin yapılabilmesi özelliklerinden dolayı diğ er analitik tekniklere göre daha çok tercih edilmektedir [103],[125].

Protein ve DNA gibi yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllere ilave olarak, yapısal kaynaklı sınırlamalardan etkilenmeksizin, peptidlerdeki aminoasit dizilimleri, oligosakkaritlerin şeker dizilimleri gibi dizi analizleri bu tekniklerle kısa zamanda ve yüksek doğrulukta yapılabilmektedir [68]. Analiz edilecek örnek türüne, analiz özelliklerine göre hassasiyeti çok yüksek kütle spektrometreleri geliştirilmiş olup kütle spektrometrisi kimya, fizik, tıp, adli tıp, ilaç, spor, gıda gibi birçok alanda kullanımı olan son derece önemli bir analitik teknik haline gelmiştir [126]–[128].

Kütle spektrometresinde temel bileşenler olarak; numune girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, iyon detektörü ve data sistemi yer almaktadır (Şekil 2.15) [48]. Bir kütle spektrometresindeki en önemli parametrelerden biri iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörü ve iyon detektörünün, analiz edilen iyonların gaz fazındaki diğer analiz iyonları ve hava molekülleri ile olası çarpışmalarını engelleyip etkileşime girmeden serbest şekilde hareket edebilmeleri için analiz sırasında sürekli olarak yüksek vakum (düşük basınç, 10^{-5} - 10^{-10} Torr) altında tutulmaları gerekmektedir [48],[129]. Düşük basınç, iyonlar ile moleküllerin reaksiyonunu en aza indirir ve aynı zamanda oluşturulan iyonların tespitini, geçişini ve kararlılığını sağlamaktadır [48].



Şekil 2. 15. Kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi [48]

Kütle spektrometrisi yöntemlerinde numuneler cihaza katı, sıvı veya gaz halinde direkt olarak (plaka, oto örnekleyici, prop, şırınga) veya sıvı ya da gaz kromatografisi yöntemleriyle verilebilmektedir. İyon oluşumu, yüksüz haldeki numunelerin yüksek vakum altındaki iyonlaştırma kaynağı kısmında gaz fazına geçirilmesiyle

gerçekleşmektedir. Oluşan iyonlar kütle analizörü kısmında kütle/yük (m/z) oranlarına göre birbirlerinden ayrıştırılmaktadır. Daha sonra iyon detektörüne ulaşan kütle/yük oranına göre ayrılmış olan iyonlar burada sinyale dönüştürülmektedir. Detektörde oluşturulan sinyaller bilgisayar sistemi aracılığıyla kütle spektrumuna dönüştürülmekte ve kayıt edilmektedir.

İyon kaynağı, kütle analizörü, iyon detektörü bileşenlerinin farklı şekilde tasarlanmasıyla istenilen özellikte kütle spektrometre sistemleri oluşturulmaktadır. (Çizelge 2.1)

Çizelge 2. 1. Kütle spektrometresi bileşenlerinin çeşitlerinin bazıları.

İyon kaynağı	Kütle analizörü	İyon detektörü
Sert İyonlaştırma Yöntemleri Elektron Bombardımanı (EI) Kimyasal İyonlaştırma (CI) Hızlı Atom Bombardımanı (FAB)	Uçuş Zamanlı (Time of Flight-TOF) İyon Tuzaklamalı (Ion Trap-IT) Dört Kutuplu (Quadrupole-Q)	Faraday kafesi Elektron çoğaltıcılar Sintilasyon sayıcı Çok kanallı plakalar Daly detektörü
Yumuşak İyonlaştırma Yöntemleri Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)	Orbitrap Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-FTICR) Manyetik Alan (Magnetic Field)	

2.6.1. Yumuşak İyonlaştırma Yöntemleri

Yüksek molekül ağırlığına sahip biyomolekül veya sentetik polimerlerin ve onların zayıf komplekslerinin analizlerinin yapılabilmesi için son yıllarda yumuşak iyonlaştırmalı teknikler geliştirilmiş ve böylece yüksek molekül ağırlığına sahip özellikle

biyomoleküller ve onların zayıf etkileşim içinde bulundukları komplekslerini gaz fazında parçalamadan aktif formlarında (intact) analiz edilmelerine imkân sağlamıştır.

İyon kaynağı örneğe enerji aktarmakta olup sisteme sadece iyonlaşmaya ve gaz fazına geçişe yetecek kadar enerji aktarıp parçalanma ürünlerinin oluşumunu engelleyen iyon kaynaklarına yumuşak iyon kaynakları denilmektedir [130].

Kütle spektrometrelerinde birçok iyon kaynağı kullanılmakta olup analiz edilecek örneğin türüne ve analiz özelliklerine göre tercih edilebilmektedirler. MALDI ve ESI teknikleri ile yüksek mol kütesine sahip örneklerin analizlerinde başarılı çalışmalar yapılmıştır. Büyük mol kütleli moleküllerin kütle spektrometrik şartlarda kararlılıkları çok düşük, uçuculukları ise yok denecek kadar azdır. Yumuşak iyonlaştırma (soft ionization) teknikleri olan, Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) kütle spektrometresi ve Elektrosprey İyonlaştırmalı (ESI, Electrospray Ionization) kütle spektrometresiyle yapılan çalışmalarda büyük molekül kütlelerinin, bir bütün halinde (intact), yapıyı bozmadan tayini yapılabilmektedir [48].

Metallo-ilaçların veya yeni geçiş metal komplekslerinin biyolojik etkilerini incelemek için kütle spektrometrik yöntemler kullanılmaktadır. Biyomoleküllerin analizi, FAB, ESI ve MALDI gibi "yumuşak iyonlaştırma" tekniklerinin keşfinden sonra mümkün olmuştur [131]. Yumuşak iyonlaştırma teknikleri ile moleküllere zarar vermeden, onları parçalamadan iyonlaştırma mümkün olmuştur. Belirli koşullar altında, yumuşak iyonlaştırma yöntemleri kovalent olmayan etkileşimlerle oluşmuş olan kompleksleri gaz fazına geçirmeye izin vererek komplekslerin stokiyometrilerini, kovalent olmayan etkileşimlerin türünü, enerjisini ve bağlanmanın kuvvetini tayin edebilmeye olanak sağlamaktadır [48].

Literatürde oligonükleotid-DNA tayini ve dizilimi, protein-peptid tayini ve dizilimi, protein katlanması (folding), in-vitro ilaç analizleri gibi çalışmalarda MALDI-MS ve ESI-MS yöntemlerinin kullanıldığı birçok yayın yer almaktadır. Yumuşak iyonlaştırma teknikleri küçük moleküllerden büyük moleküllere kadar, analiz örneklerinin parçalanmadan bir bütün halde tayin edilmelerine olanak sağlamaktadır.

2.6.1.1. Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)

MALDI tekniğinde, lazerden gelen enerjiyi absorblayan uygun bir matriks yardımıyla analiz örneği desorpsiyona uğratarak iyonlaştırılmaktadır. Bu teknikle düşük uçuculuktaki yüksek mol kütleli moleküllerin parçalanmadan analiz edilmesi ve spektrumlardan dizilim ve yapısal bilgilerin yorumlanması mümkün kılınmıştır. MALDI’de miktarları 10^{-12} ve 10^{-15} mol düzeyine kadar olan örneklerin kolaylıkla analizi yapılabilmekte olup oldukça yüksek hassasiyete sahip bu iyonlaştırma tekniği ile 1.000.000 Da’ya kadar molekül kütleline sahip örneklerin analizlerine imkan sağlanmaktadır [132]. Zayıf kuvvetlerle oluşmuş olan komplekslerin ve moleküllerin yumuşak iyonlaştırılması neticesinde kararsız olan bu yapıların bozulmadan ve hatta biyopolimerlerin kapalı yapılarının dahi bozulmadan gaz fazına geçişinin ve kütle spektrometresi ile tayininin sağlanması bu yöntemin en önemli avantajlarından biridir.

MALDI tekniğinde tipik olarak tek yüklü iyonlar oluşmakta olup 50.000 Da molekül kütleline kadar tek yüklü iyonların oluşumunun baskın olduğu, daha yüksek molekül kütleline çıkıldığında çoklu yüke sahip iyonların oluşum olasılıklarının arttığı bilinmektedir [103].

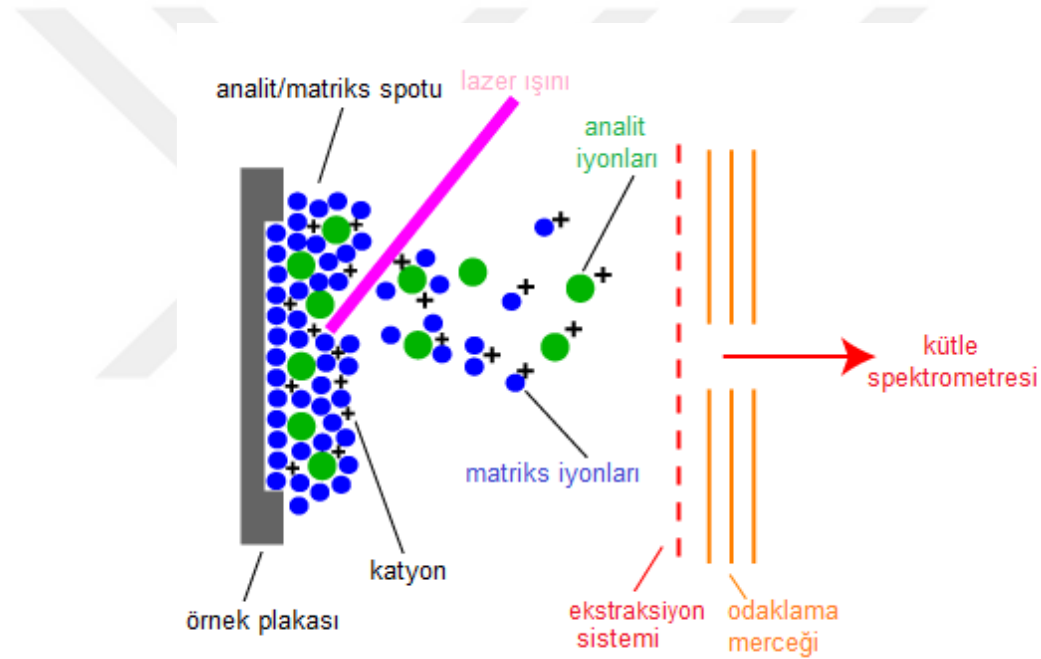
MALDI’de vakum kararlılığı olan uçuculuğu düşük, düşük mol kütleli, örnek molekülleri ile etkileşime girmeyecek inert yapıda, viskozitesi düşük, kullanılan lazerin dalga boyundaki ışını absorplayabilecek yapıdaki moleküller matriks olarak kullanılmakta olup analiz öncesinde örnek ve matriks molekülleri karıştırılır ve kütle spektrometresine örnek yükleme amacıyla kullanılan plaka üzerinde kristallendirilirler. MALDI-MS’te bir plaka üzerindeki farklı bölgelere, birden fazla örnek uygulaması yapılarak analizleri kısa sürede gerçekleştirmek mümkündür [48].

Morötesi (*ultraviolet*, UV) veya Kızılötesi (*infrared*, IR) bölgesinde dalga boyuna sahip atımlı veya sürekli lazer ışığıyla uyarılan örneğin bu enerji aktarımını takiben birbirine bağımlı olarak seyreden yüzeyden desorpsiyonu ve iyonlaşma süreçleri gerçekleşmektedir. Yüzeyde bulunan örnek, lazer vuruşu sonrası yoğun fazdan gaz fazına doğru geçiş yapmaktadır. Elde edilen iyonlar kütle analizörüne doğru bir potansiyel eşliğinde ivmelendirilmektedir [130].

MALDI iyonlaştırmasında; pozitif modda genellikle protone iyonlar, alkali metal (sodyum ve potasyum) katılım iyonları, radikalik katyonlar, matriks katılım iyonları

negatif modda; deprotone iyonlar, anyonik katılım iyonları, radikalik anyonlar oluşmaktadır.

Matrikslerin MALDI'ye üç ana katkısı bulunmaktadır. İlki, analit:matriks mol oranı 1:100-1:50000 aralığında olduğundan matrikslerin analitlerin etkileşimini en aza indirerek analitleri birbirinden ayrı tutmasıdır. İkincisi, matriksin iyonlaştırma işlemine katılması ve analit moleküllerine veya tersi proton transferinde yer almasıdır [48]. Diğer katkısı ise kullanılan matrikslerin lazer dalga boyunda kuvvetli absorbansının olması analit moleküllerine enerjinin kontrollü olarak aktarılmasını ve parçalanma ürünlerinin oluşumunun engellenmesini sağlamaktadır [130]. Analit moleküllerinin lazer dalga boyundaki enerjiyi absorplamaması gerekmektedir.



Şekil 2. 16. MALDI mekanizmasının şematik olarak gösterimi [48]

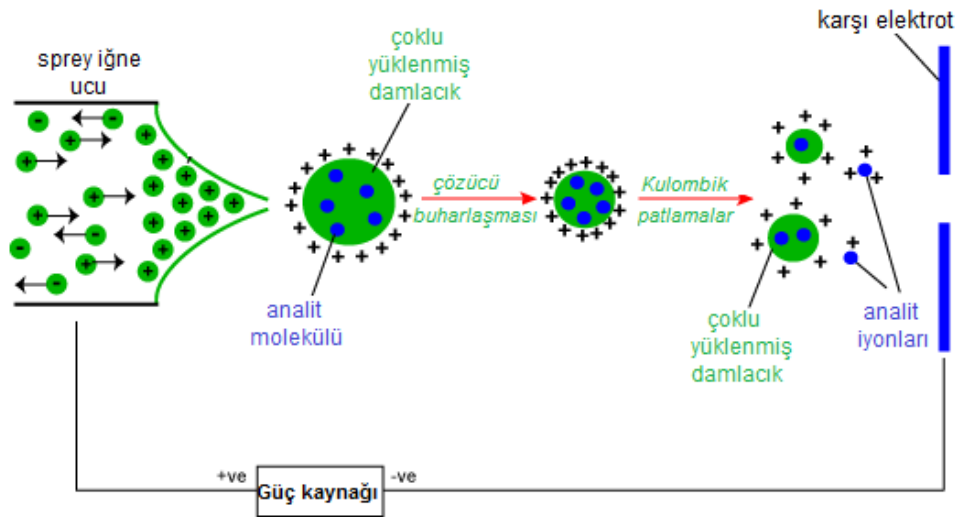
2.6.1.2. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)

Uçucu olmayan, ısısal olarak kararsız türlerin iyonlaştırılması, yüksek hassasiyet, özgünlük, hızlı analiz, moleküllerin parçalanmadan iyonlaştırılması, zayıf etkileşimlerle oluşmuş komplekslerin dahi bir bütün (intact) halinde tayinine imkan vermesi, özgün komplekslerin stokiyometrilерinin direkt ölçülebilmesi gibi özellikleri bulunan yumuşak bir iyonlaştırma yöntemi olan ESI iyonlaştırmayı diğer iyonlaştırma yöntemlerine kıyasla

daha tercih edilebilir kılmaktadır. ESI yöntemi MALDI iyonlaştırmaya göre daha yumuşak bir iyonlaştırma tekniğidir.

ESI yöntemi ile elde edilen iyonlar hem pozitif hem de negatif olarak çok yüklü şekilde oluşabilmektedir. Çok yüklü iyonlaşma özelliği desorpsiyon/iyonlaştırmalı yöntemlere kıyasla ESI yöntemine avantaj sağlayabilmektedir. Çok yüklü iyon oluşumu ile birlikte yüksek molekül kütleli yapıların, kütle/yük oranı düşük olan kütle analizörleri ile tayin edilebilir sınırdan gözlenebilmesine imkan sağlamaktadır.

ESI yönteminde; çözücü içerisindeki örnek, atmosferik basınç altında kuvvetli bir elektriksel alanın uygulandığı iğne şeklindeki kapilerden püskürtücü gaz ile birlikte spreylenir. Örnek çözeltisinde bulunan analit moleküllerinin yüklenebilmesi için kapilere uygulanan elektriksel potansiyele bağlı olarak çok yüklü damlacıklar oluşmaktadır. Püskürtücü gaz yönüne ters yönde gönderilen kurutucu gaz yardımıyla veya ısıtma ile çözücü molekülleri buharlaştırılarak damlacıklardan uzaklaştırılır. Çözücünün buharlaşması ile damlacıkların büzülmesi neticesinde oluşan çözelti damlacıklarındaki analit molekülleri yükleri nedeniyle birbirlerini itme eğilimindedir. İtmelerle birlikte kulombik patlamalar oluşarak aynı türlerin farklı iyonlarının oluşması sağlanır. Elektrosprey iyonlaştırma neticesinde yüksek molekül kütleli (>1000 Da) moleküllerin çoklu yüklenmiş iyonları oluşmaktadır.



Şekil 2. 17. ESI'nın şematik olarak gösterimi [48]

1000 Da'dan daha küçük yapılar için ESI iyonlaşmasında bazik türler için protonlanmış moleküler iyonlar ($[M + nH]^{n+}$), asidik türler için deprotone olmuş moleküler iyonlar ($[M - nH]^{n-}$), birden fazla iyonlaşabilecek grup içeren türler içinse ortama eklenen alkali metal tuzları (sodyum, potasyum, lityum vb.) ile birleşerek de iyon oluşabilmektedir.

MALDI yönteminde tek yüklü iyonların oluşma olasılığı daha yüksek iken ESI yönteminde çoklu yüklenmiş iyonların oluşması bu teknikte elde edilen kütle spektrumlarının daha karmaşık olmasına sebebiyet vererek veri analizini zorlaştırmaktadır. Diğer taraftan ESI yöntemi daha yumuşak bir iyonlaştırma tekniği olduğundan, MALDI'yle kıyaslandığında yapılan analizlerde yapılar parçalanmadan daha fazla korunabilmekte, zor iyonlaşan türlerin iyonlaşmasını sağlamaktadır.

MALDI yönteminin dezavantajlı yönlerinden biri de matrikse ait piklerin düşük kütle/yük bölgelerinde spektrumu baskılaması sonucunda bu bölgede bulunan büyük moleküllerin parçalanma ürünlerinin ve küçük moleküllerin analizlerinin zorlaştırmasıdır. Bu konuda yapılan ilave çalışmalarla düşük kütleli bölgede matriks kullanılmadan lazer ışını absorblayan yüzeyler (silisyum metalik yapraklar gibi) kullanılarak matriks etkileri elimine edilerek yapılan çok sayıda çalışmada literatürde mevcuttur.

2.6.2. Kütle Analizörleri

Kütle analizörleri, gaz fazındaki iyonları m/z oranlarına göre ayırmakta olup kütle spektrometrelerinin kütle analizörü kısımları, iyonların ortamda bulunabilecek diğer gaz molekülleri ile çarpışmalarının engellenerek detektöre iletilebilmeleri için sürekli olarak vakum altında tutulur. Kütle sınırı, iyon iletim verimi, ayırıcılık gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralığı ve çalışma basıncı değeri, bir kütle ayırıcının özelliklerini belirleyen en önemli parametrelerdir. Her kütle analizörünün diğerlerine göre üstün olduğu ve eksiklerinin bulunduğu özellikleri mevcuttur [103].

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kütle analizörleri olan uçuş zamanlı, dört kutuplu ve her iki analizörün bir arada kullanıldığı dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle analizörleri ile ilgili detaylı bilgiler verilmektedir.

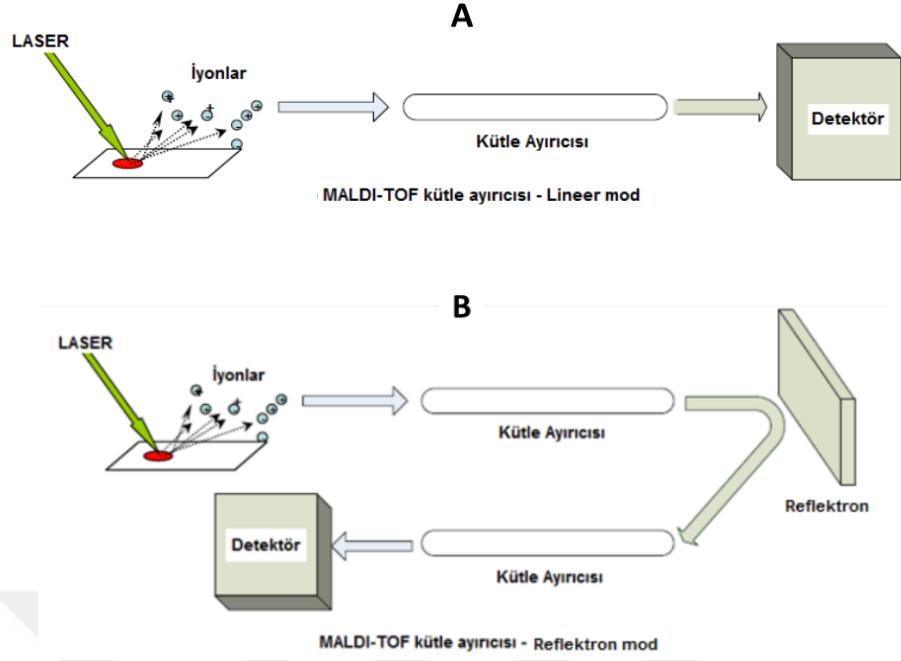
2.6.2.1. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (Time of Flight, TOF)

MALDI kütle spektrometrelerinde genellikle, hızlıca iyon tarayan lineer ve reflektrom modları olmak üzere iki farklı moda sahip uçuş zamanlı kütle analizörleri bulunmaktadır. TOF kütle analizörünün kullanım ve tasarım kolaylığı, maliyet açısından uygun olması, teorik olarak sınırsız kütle aralığı, hızlı tarama, yüklü taneciklerin tamamını aynı anda belirlemesi, MALDI iyonlaştırması için uygun olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır [133]. Ancak TOF'un kütle ayırıcılık gücü sınırlı olup bu durum analizör için dezavantaj oluşturmaktadır.

Lineer TOF'ta iyon kaynağında lazer ile desorpsiyona uğratılan iyonlar elektriksel bir alanda sabit kinetik enerjiyle ivmelendirilirler. İyonun hızı $(m/z)^{-1/2}$ orantılı olup bu iyonlar elektriksel alan uygulanmayan bir tüp içerisinde geçirilerek tüpün sonunda bulunan detektöre ulaşmaları sağlanır ve sinyal üretilir. Lineer TOF analizöründe aynı kütledeki iyonlar eşit kinetik enerjide olsalar bile aynı zaman ve aynı bölgede desorbe olamayabilirler ve bu nedenle farklı hızlarda olabilirler. Bu iyonlar detektöre farklı zamanlarda ulaşabilirler bu durum da piklerin genişleyip kütle ayırıcılığının düşmesine neden olabilir.

Reflektrom TOF'ta ise iyonların yönünün değiştirilmesinin sağlanması amacıyla uçuş tüpünün sonunda karşı bir elektriksel alan uygulanır. Aynı kütledeki iyonlardan yüksek hıza sahip olan iyon reflektroma daha erken ulaşır. Bu iyonlar, karşı elektriksel alan içinde daha derinlere kadar girerler ve yönlerini değiştirebilmek için bu alanda daha fazla zaman geçirirler. Düşük hıza sahip ancak aynı kütledeki iyonlar ise reflektroma daha geç girerler, derinlere kadar gidemezler ve reflektromda daha az zaman geçirirler. İyon reflektromun voltajının uygun bir değere ayarlanması durumunda aynı kütledeki fakat farklı hızlardaki iyonlar detektöre aynı zamanda ulaşır. Böylece lineer moda göre daha keskin olarak ayrılmış sinyaller elde edilir [48]

Mol kütlelerinin (100-900 kDa) artmasıyla birlikte lineer-TOF'ta kütle ayırıcılığı (<300) azalmaktadır. Reflektrom-TOF'ta ise düşük mol kütleli örnekler için kütle ayırıcılığı 10^4 civarında olmakla birlikte bu modda düşük mol kütleli örnekler hassas bir şekilde tayin edilebilmektedir.

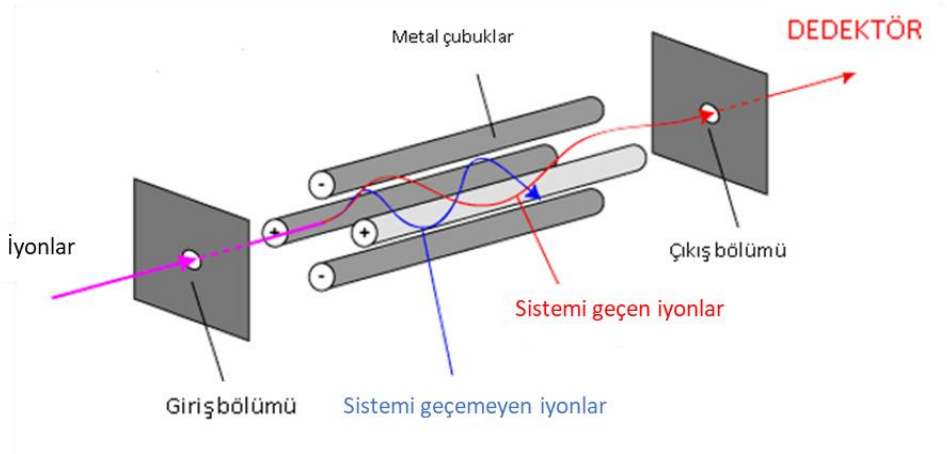


Şekil 2. 18. MALDI-TOF kütle analizörlerinin şematik olarak gösterimi. A) lineer mod ve B) reflekttron mod [48]

2.6.2.2. Dört Kutuplu Kütle Analizörü (Quadrupole, Q)

Dört kutuplu kütle analizöründe; birbirine paralel konumlandırılan dört silindirik metal çubuk bulunmakta olup çubuklara uygulanan elektriksel alan içinde, iyonlar yörüngelerindeki kararlılıklarına göre ayrılırlar [129]. Karşılıklı konumda bulunan metal çubuklar arasında radyo frekansı uygulanarak çubuk setleri arasında potansiyel farkı oluşturulmaktadır. Oluşan fark sayesinde bir titreşim alanı meydana gelerek iyonların detektöre iletilmesi sağlanmaktadır. Uygulanan voltaj seviyelerinde, belirli kütle/yük oranındaki iyonlar detektöre ulaşabilmektedir. Kararlı olmayan yörüngelere sahip olan diğer iyonlar ise çubuklar ile çarpışarak yüklerini kaybederler [129],[134].

Dört kutuplu kütle analizörleri kullanım kolaylığı, hassasiyet gibi özelliklerinin yanı sıra hızlı ve ekonomik ölçüme imkan vermektedirler.



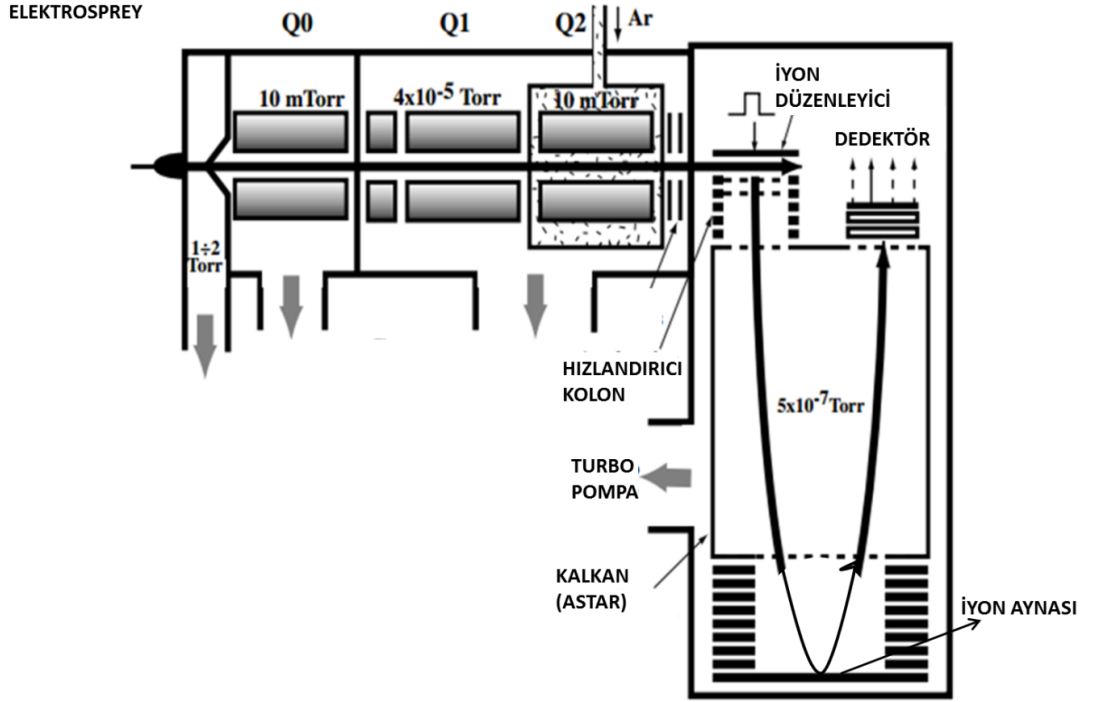
Şekil 2. 19. Dört kutuplu kütle analizörünün şematik gösterimi [135]

2.6.2.3. Dört Kutuplu/Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (Q/TOF)

Kütle spektrometrik yöntemlerin etkinliğinin artırılması, uygulamaların çeşitlendirilmesi amaçlarına yönelik olarak farklı türdeki kütle analizörlerinin üstün oldukları özellikler göz önünde bulundurularak hibrit bir biçimde tek bir kütle spektrometresinde kullanılabilmektedir. Dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle analizörü de literatürde yaygın olarak kullanılan hibrit sistemler arasında yer almaktadır.

Bu sistemde, dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle analizörleri birbirlerine dikey pozisyonda yerleştirilmiş olup iyon kaynağında oluşturulan iyonlar üç adet dört kutuplu ve bir adet uçuş zamanlı kütle analizöründen geçerek detektöre ulaşırlar. MS analizlerinde; dört kutuplu analizör bölümüne radyo frekans potansiyeli uygulanarak iyon kaynağından gelen iyonlar yönlendirilerek uçuş zamanlı analizör tüpüne iletilirler.

Dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle analizörlerinin hibrit şekilde kullanımıyla birlikte çok yüksek ayırıcılık (50.000) ve kütle doğruluğu (1-5 ppm) elde edilebilmektedir [103].



Şekil 2. 20. Dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle analizörünün şematik gösterimi [136]

2.6.3. Kütle Spektrometresi İyon Detektörleri

Kütle analizöründe kütle/yük oranlarına göre birbirlerinden ayrılmış olan iyonlar iyon detektörüne yönlendirilerek burada foton veya elektronlara dönüştürülürler. Elektron veya fotonlardan oluşan sinyaller bilgisayar yazılımlarıyla kütle spektrumuna dönüştürülürler. Yaygın kullanılan iyon detektörleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

2.6.4. İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (IM-MS)

İyon hareketliliği kütle spektrometrisinin, temel ve uygulamalı çalışmalardaki yeri ve kullanımı, son yıllarda çok hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Bu analitik yöntem olan ilgi, gelişen teknoloji ile birlikte biyomoleküllerin ayrılması ve tayini [137] polimer karakterizasyonu [138], kimyasal savaş ajanları, yasa dışı uyuşturucu ve patlayıcıların tespiti, gıda, çevre analizi [139],[140] gibi farklı türdeki örneklerin analizlerinde yüksek hassasiyet, ayırıcılık gücü ve düşük miktarda örneğin analiz edilebilmesi gibi parametrelerdeki iyileştirmelere paralel olarak artmaktadır. Son yirmi yıllık dönemde, iyon hareketliliği ile kütle spektrometrisinin birleştirildiği sistemlerin geliştirilmesinde çok hızlı ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [103].

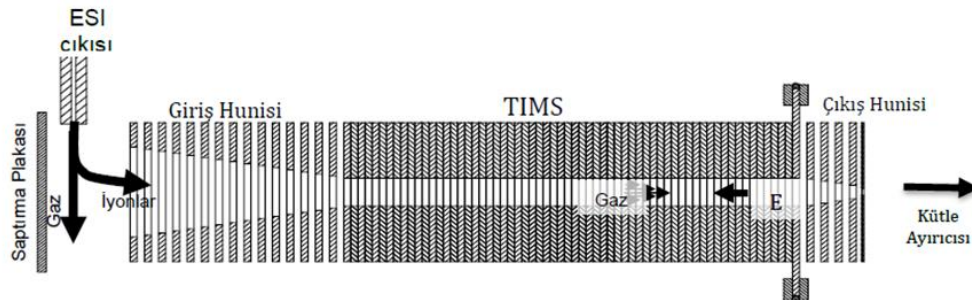
Kütle spektrometrisi yönteminde aynı kütle/yük oranına sahip olan fakat farklı uzaysal geometrik yapılara sahip olan türlerin ayırt edilmesi mümkün olmamakta olup iyon hareketliliği ile kütle spektrometrisinin birleştiği sistemde bu türlerin ayırt edilebilmesi, yapı aydınlatma ve kimyasal izomerlerin belirlenmesi çalışmaları da gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemde eş zamanlı olarak hem iyonların kütleleri belirlenebilmekte hem de yapısal olarak farklı ancak aynı kütle/yük oranında olan iyonlar kesin olarak analiz edilebilmektedir.

İyon hareketliliği spektrometresinde; iyonların elektriksel bir alanda helyum, azot ve argon gibi inert bir gaz ile doldurulmuş sürüklenme tüpündeki hareketliliklerine göre ayrımı gerçekleştirilmektedir. Bu teknik iyonun yüküne, büyüklüğüne ve şekline büyük oranda bağlı olup bu teknikle yapılan analizler neticesinde iyonların yapısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir [139].

İyonların kütle spektrometresi analizinden önce hareketlilikleri baz alınarak ayrılması ile karmaşık ve izomerik tür analizleri esnasında örnek kaybının azaltılması, iyon hareketliliği sayesinde de analize ilave bir boyut katarak sadece kütle spektrometrik teknikler kullanılarak aydınlatılması mümkün olmayan analizlerde büyük fayda sağlamaktadır [103],[139].

2.6.4.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi

Bu teknikte; hareket eden bir gaza karşı iyonları sabit tutmak için elektriksel bir alan kullanılmaktadır. Bu sayede sürüklenme kuvveti elektrik alan yardımıyla karşılanarak iyonların kendi hareketliliklerine göre ayrımlarının gerçekleştirilmesi sağlanmaktadır. Bu şekilde iyonların boyut/yük oranına göre ayrımları gerçekleştirilmektedir [139].



Şekil 2. 21. Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometresi şematik gösterimi [141]

Tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi yönteminde; iyonlar hareketliliklerine göre ayrıldıktan sonra ilk olarak dört kutuplu analizörden ve çarpışma hücresinden geçer ve uçuş zamanlı analizöre ulaşırlar. TOF analizöründe iyonların hızlanarak uçuş tüpünden geçip detektöre ulaşmaları için enerji uygulanır. Hareketliliklerine göre ayrılan iyonlar kütle/yük oranlarına göre de ayrılır ve detektörde oluşturulan sinyaller vasıtasıyla kütle spektrumu oluşturulur [140],[142].

2.6.4.2. Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS)

İyon hareketliliği spektrometrelerinde, iyonun elektriksel alanda inert bir gaz yardımıyla sürüklenme tüpünde geçirdiği zaman ölçülmekte ve iyonların tüp içerisinde kaldıkları süre boyunca oluşturdukları yapının şekilsel ve boyutsal olarak bilgisi sağlanmaktadır. Molekülün üç boyutlu yapısı hakkında bilgi edinilebilmesi amacıyla etkin çarpışma kesiti değerlerine bakılmalıdır. İyonların detektöre varış zamanları ölçülerek Mason Schamp denklemi ile etkin çarpışma kesiti değerine dönüştürülebilir [138].

Tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi yönteminde; şeklen büyük olan iyonlar elektriksel alanda daha az tutulurlar ve daha hızlı hareket ederler bu sebeple çıkış hunisine daha yakındırlar ve kütle analizörüne en erken ulaşırlar. Şeklen küçük olan iyonlar ise elektriksel alanda daha çok tutuldukları için kütle analizörüne en geç ulaşırlar. Sürüklenme tüpünü terk ederek kütle analizörüne en erken ulaşan şeklen büyük iyonlar daha önce analiz edilen iyonlardır ve daha büyük etkin çarpışma kesiti değerine sahiptirler.

2.7. Spektroskopi

Spektroskopi; örnek maddedeki atom, molekül veya iyonların bir enerji seviyesinden diğerine geçerken absorplanan, saçılan, yayılan elektromanyetik ışımının ölçülerek yorumlanması olarak tanımlanabilmektedir. Elektromanyetik ışım ile madde arasında aşağıdaki etkileşimler gerçekleşebilmektedir.

-Işımanın kırılması (ışığın bir ortamdan farklı bir ortama geçerken yön değiştirmesi) ve yansıması,

-Işımanın saçılması (fotonun örnekteki parçacıklara çarparak yön değiştirmesi)

-Işımanın polarizasyonu,

-Işımanın absorpsiyonu, elektromanyetik ışımayı absorbe ederek temel halden uyarılmış hale geçişi ve emisyonu, uyarılmış halden temel hale geçiş sırasında ışıma enerjisi yayması.

Üzerine ışık tutarak moleküller ve malzemeler hakkında ne kadar çok şey öğrenebileceğimizi görmek oldukça şaşırtıcıdır. Spektroskopide; elektronik, titreşimsel, rotasyonel ve elektron ve nükleer dönüş halleri ve enerjileri de dahil olmak üzere çok geniş bir yelpazedeki moleküler özellikleri tanımlayabilmek için ışık kullanılmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak çoğu zaman moleküller kimlik, moleküler konformasyonlar, geometriler ve boyutlar, kimyasal denge, sıvı veya katı hal ortamının moleküller üzerine etkisi, kimyasal reaksiyon hızı, farklı moleküler konformasyonlar arasındaki yer değiştirme, moleküler uyarılmış halden temel hale geçiş, fotosentetik enerji transferi, protein katlanması, maddelerin saflık kontrolü vb. gibi pek çok ek sonuca varabiliriz. Işığı aynı zamanda; bazı moleküler özellikleri ve halleri kontrol etmek ve incelemek için de kullanabiliriz [143].

Spektroskopinin gerçekleştirilebileceği birçok yol bulunmaktadır. Bazı durumlarda; farklı dalga boylarında ışıklar örnek üzerine gönderilir ve en kuvvetli absorbe edilen dalga boyu ölçülür. Bir diğerinde; ilk önce örneğin ışığı absorbe etmesine izin verilir daha sonra yayılan ışığın dalga boyu ölçülür. Bir başka şekilde; örnek üzerine bir ışık atımı (pulse) veya bir dizi şeklinde ışık gönderilir ve zamanla gelişen tepkiler ölçülür [143]. En yaygın spektroskopi tekniklerinden birkaçı aşağıda verilmektedir.

- Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (Ultraviolet-visible (UV-vis) Spectroscopy)
- Floresans Spektroskopisi (Fluorescence Spectroscopy)
- Kızılötesi Spektroskopisi (Infrared Spectroscopy)
- Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

Bundan sonraki bölümde, tez çalışmaları kapsamında kullanılan Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ve Floresans Spektroskopisi ile ilgili bilgiler detaylandırılacaktır.

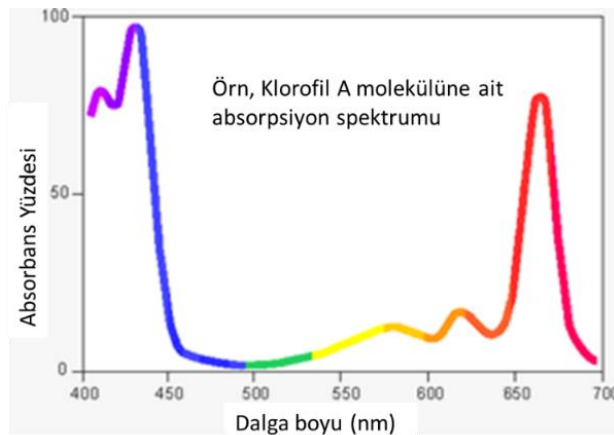
2.7.1. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi

Dalga boyu olarak ultraviyole ve görünür ışık bölge aralıklarını kapsayan moleküllerin, iyon veya komplekslerin tanımlanmasında sıkça kullanılan bir yöntem olup bir ışın demetinin bir örnekten geçirildikten veya bir örneğin yüzeyinden yansıtıldıktan sonra ışın şiddetindeki azalmaya bağlı olarak soğurmanın (absorpsiyonun) artmasına dayanır [144]. Örnekten geçen ve yansıyan ışınlar her bir molekül tarafından kendine özgü bir dalga boyu ile soğurulduğu için referans spektrumlar ile molekül tayini gerçekleştirilebilmek mümkün olmaktadır.

Absorbans, spektrofotometre kullanılarak ölçülmekte olup bilinen bir yoğunluktaki numuneden geçen ışığın şiddeti, numune tarafından absorplanan ışığın "referans" şiddeti ile karşılaştırılır. Uygun bir derişim aralığında ışığın absorpsiyonu aşağıda verilen Lambert-Beer yasası ile tanımlanabilir.

$$A(\nu) = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon(\nu) * c * l \quad \text{Eşitlik 2.5}$$

Eşitlik 2.5'te; $A(\nu)$ absorbansa, $\epsilon(\nu)$ sönüm katsayısına, c numunenin derişimini, l numune kabının genişliğine karşılık gelmektedir. Absorbansın dalga boyu ile ilişkisini tanımlamak için numuneye ilgili tüm dalga boylarından oluşan ışık gönderilir ve daha sonra iletilen ışık bir monokromatör kullanılarak dalga boylarına ayrılır. Ayrılan frekans bileşenleri bir detektörün farklı bölümlerinde ölçülür [143]. Şekil 2.22.'de örnek bir absorpsiyon spektrumu yer almaktadır [145].



Şekil 2. 22. Örnek bir absorpsiyon spektrumu [145]

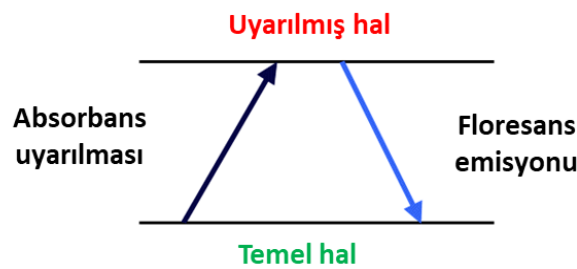
Analitik uygulamalarda absorbans ve derişim arasındaki doğrusal ilişkidenden yararlanılır. Standart çözeltinin derişimine karşı absorbans grafiğı alınarak kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bazı durumlarda dorusallıktan sapmalar meydana gelebilmektedir.

2.7.2. Floresans Spektroskopisi

Lüminesans; elektronik olarak uyarılmış haldeki atom, molekül veya iyonların kendine özgü dalga boyunda foton emisyonu yapması olayıdır.

Lüminesans spektroskopisi; fotolüminesans (floresans ve fosforesans), kemilüminesans, termolüminesans olarak üçe ayrılmaktadır. Fotolüminesans, uyarmanın ışık ile yapıldığı lüminesanstır. Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun dönüşünde (spininde) bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılmaktadır. Floresans: 10^{-10} - 10^{-7} saniyeden daha az süre, fosforesans: 10^{-5} - $>10^3$ saniye sürmektedir. Kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyonda reaksiyon enerjisinin ortamdaki türleri uyarmasıyla oluşan uyarılmış türlerin emisyonudur. Termolüminesans ise uyarmanın ısısal olarak ısıtma ile veya soğutma ile yapıldığında ortaya çıkan lüminesans türüdür.

Floresans spektroskopisi bir örnekteki floresans ışımaya analiz eden bir tür elektromanyetik spektroskopidir. Bir ışık kaynağından (genellikle UV) gelen ışının numunenin moleküllerinde bulunan elektronları uyarması sonrasında ışık yaymasıyla (tipik olarak görünür ışık) floresans ışımaya yapılır ve fotonlar daha düşük enerji seviyelerine geçerler. Şekil 2.23.'te elektromanyetik ışımaya uyarılması ve emisyonunun şematik gösterimi, Şekil 2.24'te ise örnek bir floresans spektrumu yer almaktadır. Floresans (emisyon) spektrumları ile analit moleküllerinin kalitatif veya kantitatif analizi yapılabilir.

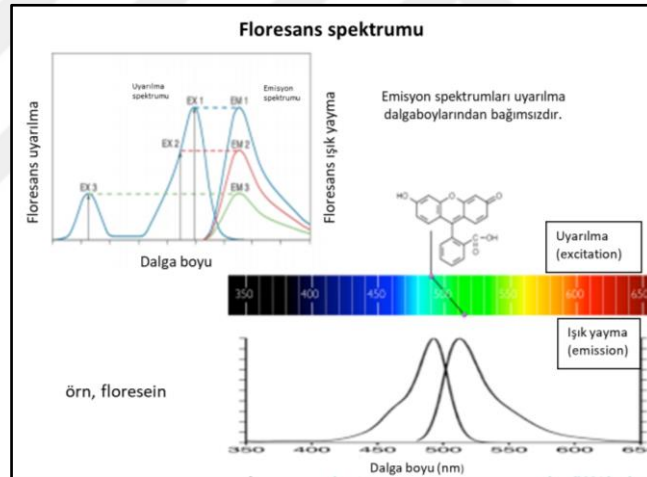


Şekil 2. 23. Elektromanyetik ışımaya uyarılması ve emisyonunun şematik gösterimi

Üst enerji seviyesine bulunan uyarılmış atom veya molekül kararsız olup soğurmuş olduğu fazla enerjiyi atarak temel enerji seviyesine dönmek ister. Bu adımda, fazla enerjinin bir kısmı ya da tamamı, atom veya molekülden ışık emisyonu olarak ayrılabilir.

Floresans, spektrofotometre kullanılarak ölçülmekte olup genellikle floresans ölçen cihazlarda güç kaynağındaki dalgalanmaları dengeleyebilmek amacıyla çift ışınlı optik sistem kullanılır.

Floresansta, ölçülen ışık numune içinden direkt iletilmek yerine numune tarafından yayılması sonucunda saçılır. Floresans, gelen ışığa kıyasla çok daha zayıf olduğu için floresans sinyali başıboş gelen ışık tarafından kolayca örtülür. Bunu engellemek için; floresan her yöne yayılmasına rağmen, saçılan veya yansıyan ışığın detektöre ulaşan miktarını en aza indirmek için emisyon genellikle, gelen radyasyon yoluna göre 90 derecelik açıyla ölçülür [144].



Şekil 2. 24. Örnek bir floresans spektrumu

Enerji bir molekül tarafından emildiğinde ne olur? Şüphesiz, molekül ilave enerjiyi sonsuza kadar koruyamaz. Molekül sonunda temel hale geri dönecektir. Bunun olmasının bir yolu, molekülün ya kendiliğinden ya da stimülasyon yoluyla rezonans frekansında ışık yaymasıdır [144].

Floresans Spektroskopinin; çok yüksek hassasiyete sahip olması, çok az sayıda molekülün doğal olarak lüminesans özelliğine sahip olmasından dolayı çok özgün olması, ppb düzeyinde gözlenebilme sınırı ile birlikte çok düşük derişimlerin tayinine olanak

sağlaması, geniş doğrusal derişim aralığı ve gözle görünür olmasından kaynaklı literatürde geniş çalışma yelpazesine sahiptir.

2.8. Elektroforez

Elektroforez, iletken bir sıvı ya da hidrofilik jel ortamındaki yüklü parçacıkların elektrik alanının etkisi altındaki hareketlerini tanımlayan genel bir ifadedir. Zıt yüklü iki elektrotun (anot ve katot), elektrolit denilen iletken bir ortamla birbirine bağlanmasıyla oluşan sisteme elektroforetik sistem adı verilmektedir. Ayırma etkisi, yüklü parçacıkların hızlarındaki (V) farklılıklardan ve alan kuvvetinden (E) kaynaklanmaktadır. Hız, parçacığın hareketliliğinin (m) bir ürünü olarak karşımıza çıkar.

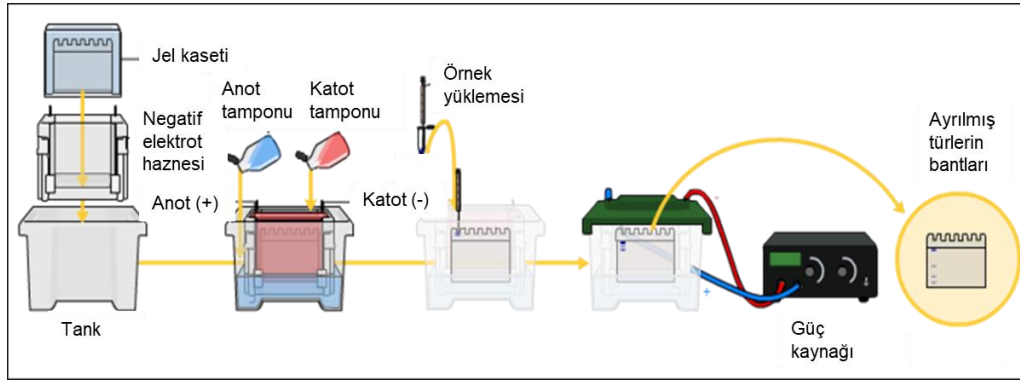
$$V = mE$$

Eşitlik 2.6

Yüklü bir parçacığın hareketliliği (m); parçacık büyüklüğü, şekli, yükü ve ayırma süresince olan sıcaklık ile belirlenmekte olup tanımlanmış elektroforetik koşullar altında sabittir. Elektroforetik koşullar, parçacıkların içinde hareket ettiği ortamı tanımlayan akım, voltaj, güç gibi elektriksel parametreler ve iyonik kuvvet, pH değeri, viskozite, gözenek boyutu vb. gibi faktörler ile belirlenir [146]. Elektroforetik yöntemlerde; zıt yüklü elektrolara doğru değişik hızda hareket eden farklı yükteki iyonlar elektriksel alan içerisinde birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Tercih edilen ayırma ortamına göre çeşitli elektroforetik teknikler bulunmakta olup bunlar; Agaroz Jel Elektroforezi, Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektroforezi, Poliakrilamid Jel Elektroforezi, İki Boyutlu Elektroforez, İzoelektrik Odaklanma, Kılcal (Kapiller) Elektroforez, İzlenebilir Jel Elektroforezi, İmmünoelektroforez olarak sayılabilir.

2.8.1. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi; DNA, RNA, proteinler vb. gibi biyomakromoleküller ve onların parçalanma ürünlerini büyüklük ve yüklerine göre ayırma tekniğidir. Klinik kimyada proteinleri yük veya boyutlarına göre ayırmada, biyokimya ve moleküler biyolojide DNA ve RNA parçacıklarını uzunluklarına göre ayırmada, DNA ve RNA parçacıklarının boyutunu belirlemede veya proteinleri yüklerine göre ayırmada jel elektroforez tekniği sıklıkla kullanılmaktadır [147]. Şekil 2.25'te jel elektroforez yönteminin basit bir şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 25. Jel elektroforez yönteminin şematik gösterimi

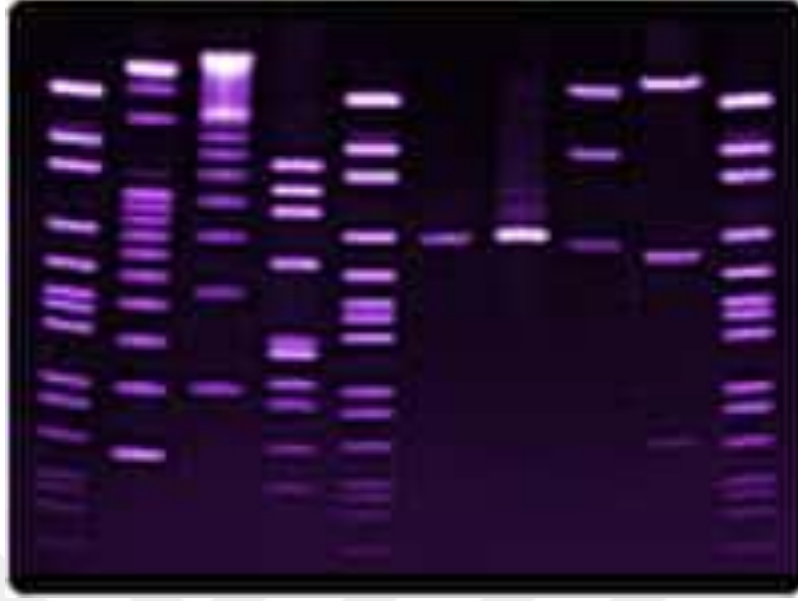
Elektroforezin yüklü türleri ayırma yeteneği, küçük inorganik veya organik iyonlardan yüklü biyopolimerlere (DNA veya proteinler gibi), hatta kromozomlara, mikroorganizmalara veya tüm hücrelere kadar uzanır. Elektroforez 100 yılı aşkın bir süre önce bulunmuş olsa da günümüzde bile önemli bir tekniktir. Jel elektroforezi, binlerce türün ayrılması gereken genomik ve proteomikteki karmaşık ayırma proseslerini çözmek için kullanılan önemli bir tekniktir. Ayrıca, son yirmi yılda kılcal (kapiler) veya mikroçiplerdeki elektroforetik teknikler hızlı bir gelişme göstermiştir [10].

Elektroforez en yaygın olarak, dikey veya yatay konfigürasyonda kullanılabilen bir jel formatında gerçekleştirilir. DNA jel elektroforezi için en yaygın olarak kullanılan iki malzeme poliakrilamid ve agarozdur.

2.8.1.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jeller, kullanılan akrilamid yüzdesine ve çapraz bağlayıcı oranına bağlı olarak istenilen gözenek boyutları ile oluşturulur. Bu sayede ayrılması istenilen yapılar aynı anda hem yüklerine hem de molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar. Poliakrilamid jeller kullanılarak nükleik asitlerin tek baza kadar ayrılması sağlanabilmekte olup DNA dizilemesi için bu yöntem oldukça avantajlıdır [148].

Poliakrilamid jel elektroforezi, 10-3000 baz çifti (base pair) uzunluğundaki DNA moleküllerinin çok hassas olarak ayrılmasını sağlar. Uygun koşullar altında, bu yöntemle boyutları yalnızca tek bir baz çifti kadar farklı olan DNA molekülleri ayrılabilir [149]. Şekil 2.26'da poliakrilamid jel elektroforez ile ayrılmış bir örneğin temsili olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 26. Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış bir örneğin temsili gösterimi [149]

Değişken gözenek boyutuna sahip, iyi tanımlanmış, mekanik olarak kararlı ve kimyasal olarak inert matrisler üretmek için tercih edilen poliakrilamid jel, günümüzde elektroforetik analizlerde muhtemelen en yaygın kullanılan jel ortamıdır. Jeller mekanik olarak güçlü, kullanımı kolay ve tamamen şeffaftır. Nispeten küçük gözenek boyutu nedeniyle difüzyon sınırlı olup bu nedenle poliakrilamid jel genellikle molekül ağırlığı 500.000 Da'dan küçük olan çoğu protein için diğer jel ortamlarından daha iyi bir ayırma sağlar [146].

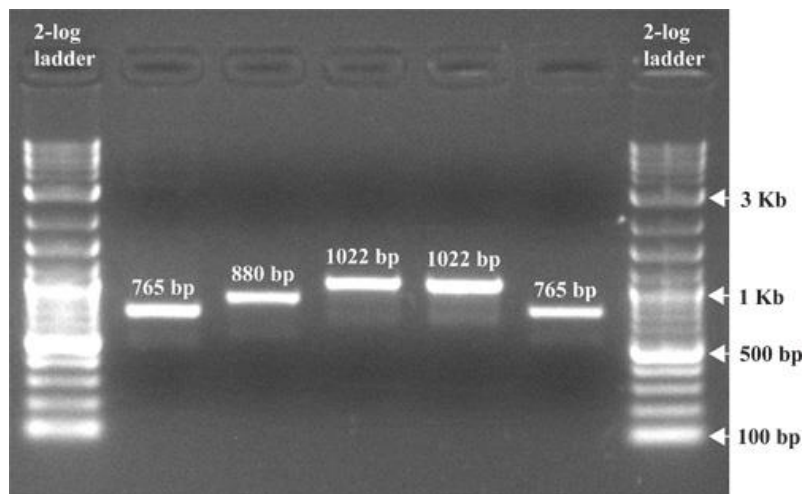
Elektroforez için kullanılan tamponlar, denatüre edici olmayan ve denatüre edici olarak kategorize edilebilirler. Çift sarmallı DNA'ya birçok koşulda ikincil yapı hakim olduğundan, denatüre olmayan elektroforez yöntemini seçmek uygun olacaktır. Oligonükleotidlerin poliakrilamid jel elektroforezi ile dizleme analizinde bazen üre gibi denetüran ajan kullanılır.

2.8.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, deniz yosunu cinsi *Gelidium* ve *Gracilaria*'dan izole edilmekte ve tekrarlanan agarobiyoz (L- ve D-galaktoz) alt birimlerinden oluşmaktadır. Jelleşme sırasında, agaroz polimerleri kovalent olmayan bir şekilde birleşmekte ve gözenek boyutları, bir jelin moleküler eleme özelliklerini belirleyen bir ağ oluşturmaktadır. Agaroz jel elektroforezinin kullanımı DNA'nın ayrılmasında devrim yaratmıştır. Agaroz jellerin benimsenmesinden önce DNA birincil olarak, yalnızca yaklaşık bir boyut sağlayan, sükröz kullanılarak yapılan Yoğunluk Gradienti Santrifüjleme (Density Gradient Centrifuge) kullanılarak ayrılmıştır [150].

Agaroz jel elektroforezi kullanarak DNA'yı ayırmak için, DNA jeldeki kuyucuklara yüklenmekte ve sonrasında bir akım uygulanmaktadır. DNA (ve RNA) molekülünün fosfat omurgası negatif yüklüdür, bu nedenle bir elektriksel alanda, DNA parçacıkları pozitif yüklü anota doğru göç edecektir. DNA değişmeyen bir kütle/yük oranına sahip olduğu için, DNA molekülleri bir agaroz jel içinde boyutlarına göre, kat edilen mesafe moleküler ağırlığının logaritmasıyla ters orantılı olacak şekilde ayrılmaktadır. Bir DNA molekülünün bir jelden geçiş hızı DNA molekülünün boyutu, agaroz konsantrasyonu, DNA konformasyonu, uygulanan voltaj, etidyum bromürün varlığı, agaroz tipi ve elektroforez tamponu ile belirlenir [150].

Ayrıldıktan sonra, DNA molekülleri uygun bir boya ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görselleştirilebilir. Şekil 2.27'de agaroz jel elektroforez ile ayrılmış bir DNA örneğinin gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 27. Agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış bir DNA örneğinin gösterimi [150]

Agaroz jel poliakrilamid jele kıyasla daha büyük gözenek boyutları ve düşük ağırlık yüzdelerinde mekanik kararlılığı koruma yeteneği nedeniyle daha yüksek moleküler ağırlıklı ayrımlar için kullanılır [148]. Agaroz jel elektroforezi, 50-50000 baz çifti (base pair) uzunluğundaki DNA moleküllerinin ayrılmasını sağlar [149]. Genel olarak, agaroz derişimi ne kadar yüksek olursa gözenek boyutu o kadar küçük olmaktadır.

Agaroz jellerinde göç eden DNA moleküllerinin, jelde elenmesinin yanı sıra moleküler kütleye bağılı bir mekanizma tarafından da geciktirildiğı görölmektedir. Bu moleküler kütleye bağılı etki, büyük olasılıkla DNA moleküllerinin elektroforez sırasında agaroz jel lifleri ile geçici etkileşimidir. Böyle bir etkileşim şaşırtıcı değildir, çünkü DNA oldukça negatif yüklü bir polielektrolittir ve agaroz moleküllerinin anyonları bağıladığı bilinmektedir. Literatürdeki bazı çalışmalarda DNA moleküllerinin elektroforez sırasında agaroz jel matrisi ile etkileşime girdiğı gösterilmiştir [151].

Agaroz jel geniş bir ayrıma oranı olmasına rağmen göreceli olarak düşük ayırma gücüne (5-10 nükleotid) sahiptir. Agaroz jel elektroforez yöntemi, çoğu protein ve glikoproteinin analizinde poliakrilamid kullanımıyla gölgede bırakılsa da çok büyük gözenek boyutunun ve dolayısıyla kısıtlayıcı olmayan jelin gerekli olduğu uygulamalarda halen paha biçilmez bir tekniktir [146].

EtBr, agaroz jellerde DNA'yı boyamak için kullanılan en yaygın reaktiftir. UV ışığına maruz kaldığında, etidyum molekülünün aromatik halkasındaki elektronlar aktive olmakta bu da elektronlar temel duruma dönerken enerjinin salınmasına yol açmaktadır. Pozitif yükü nedeniyle EtBr kullanımı DNA göç oranını %15 azaltmaktadır [150]. EtBr şüpheli bir mutajen ve kanserojendir, bu nedenle onu içeren agaroz jelleri kullanırken dikkatli olunmalıdır.

Agaroz jellerde DNA için alternatif boyalar arasında SYBR Altın, SYBR Yeşil, Kristal Mor ve Metil Mavisi bulunmaktadır Bunlardan Metil Mavisi ve Kristal Mor, DNA bantlarının görüntülenmesi için jelin UV ışığına maruz bırakılmasını gerektirmez, dolayısıyla DNA parçacıklarının jelden geri kazanılması isteniyorsa mutasyon olasılığını azaltır. Ancak duyarlılıkları EtBr'den daha düşüktür. SYBR Altın ve SYBR Yeşil, EtBr'den daha düşük toksisiteye sahip olup oldukça hassas, UV bağımlı boyalardır, ancak bu boyalar EtBr'ye kıyasla çok daha pahalıdır. Ayrıca, alternatif boyaların tümü doğrudan jele eklendiğinde iyi çalışmamaktadırlar bu nedenle jelin elektroforezden sonra

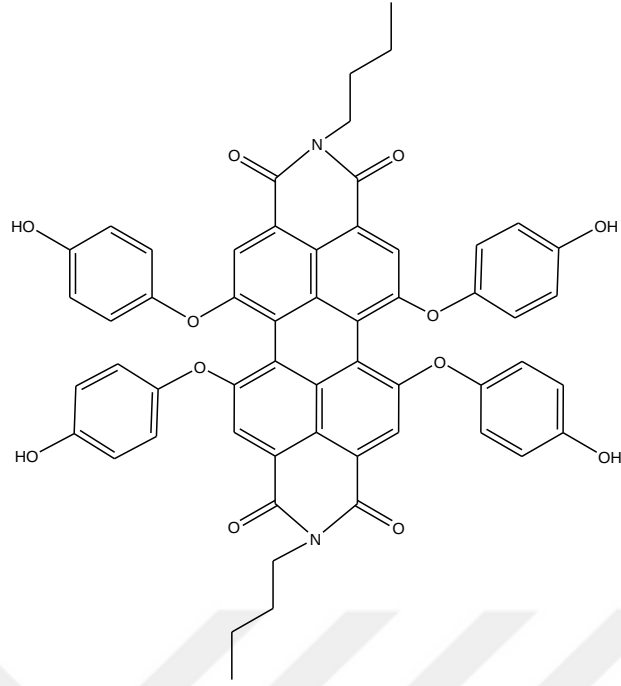
boyanması (staining) gerekmektedir. Maliyet, kullanım kolaylığı ve hassasiyet nedeniyle, EtBr hala birçok araştırmacı için tercih edilen boya olmaya devam etmektedir.

Farklı DNA formlarının jel boyunca farklı oranlarda hareket ettiği bilinmektedir. Süpersarmal plazmid DNA (supercoiled plazmid DNA) formu, kompakt konformasyonundan dolayı jel içinde en hızlı hareket eder, ardından aynı boyuttaki düz zincir DNA parçacığı gelir ve açık dairesel form en yavaş hareket etmektedir [150].

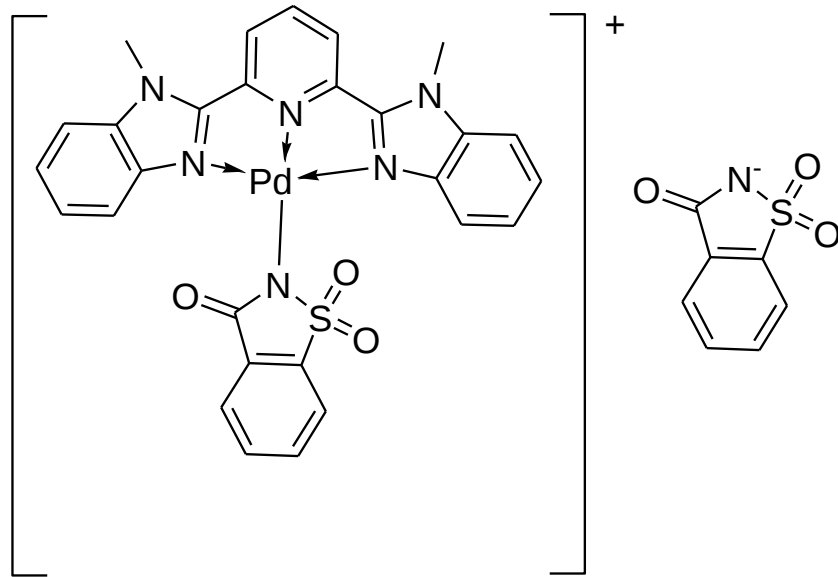
Agaroz jel elektroforezi yöntemi, 1970'lerde DNA'nın ayrılması için agaroz jellerinin benimsenmesinden bu yana, biyolojik bilimler araştırmalarında en kullanışlı ve çok yönlü tekniklerden biri olduğunu kanıtlanmış olup literatürde bu yöntemin uygulandığı birçok çalışma rapor edilmiştir [152]–[154].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

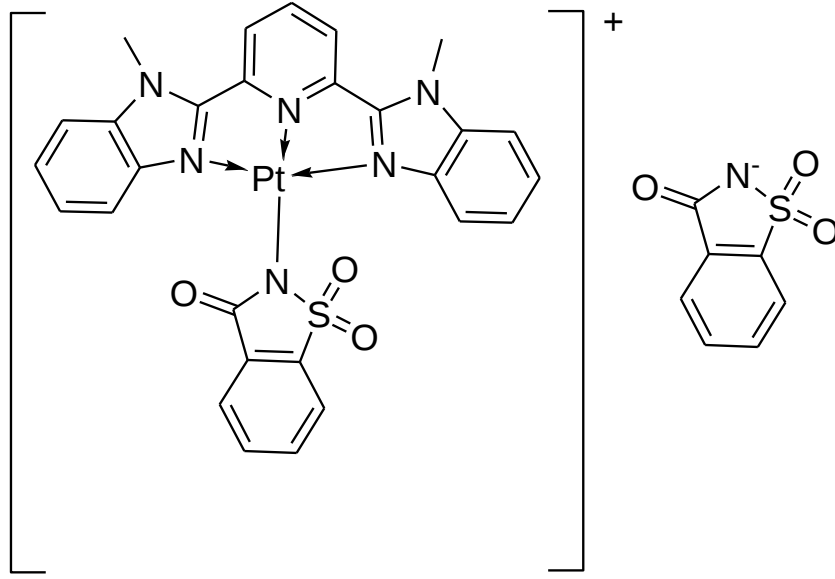
Literatürde çok geniş bir şekilde gerçekleştirilen çalışmalara rağmen günümüzde hem DNA görüntüleme hem de DNA ile etkileşime girip değişik özellikler yaratacak değişik molekül ve geçiş metal kompleksleri ile ilgili hala yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada DNA ile etkileşime giren türlerin etkileşimlerinin detaylı bir şekilde tespit edilebilmesi için değişik kütle spektrometrik yöntemlerin kullanılması ile hem etkileşimlerin detaylı bir şekilde belirlenmesi hem de etkileşim yer ve stokiyometrilerinin belirlenmesi yeni moleküller kullanılarak hedeflenmiştir. DNA ile kompleks yapan perilen dimit türevi yapılar ve benzimidazol temelli metal içeren bileşiklerin etkileşimlerine ait stokiyometrilere, kararlılıkları ve etkileşim oluşumunda etkili olan kovalent olmayan etkileşimin türünün tayini ile ilgili çalışmalar Elektrosprey İyonlaşmalı Kütle Spektrometresi (ESI-MS) ve Matriks Yardımlı Laser Desorpsiyon/İyonlaşmalı Kütle Spektrometresi ile incelenmiştir. Bağlanmanın uygun olduğu kompleks yapıların absorbans değişiklikleri UV-Vis Spektroskopisi ile ve floresans verimleri Floresans Spektroskopisi ile izlenmiştir. Ayrıca sentezlenen bu yapıların Agaroze Jel Elektroforezi yönteminde sensör-boyar madde olarak kullanımı ve DNA görüntülemesinde, teşhisinde kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiş olup bu boyar maddelerin Etidyum Bromür yerine alternatif görüntüleme ajanları olarak kullanılıp kullanılamayacağı tartışılmıştır. Tez çalışmalarında kullanılan yapılara aşağıda Şekil 3.1., 3.2. ve 3.3'te yer verilmiştir.



Şekil 3. 1. Perilen diiimit türevi FP-3 molekülü, $C_{56}O_{12}N_2H_{42}$ (M_w : 934,27 Da)



Şekil 3. 2. Benzimidazol türevi PT-5 molekülü, $C_{35}O_6N_7H_{25}PdS_2^-$ (M_w : 810,17 Da)



Şekil 3. 3. Benzimidazol türevi PT-6 molekülü, $C_{35}O_6N_7H_{25}PtS_2^-$ (M_w : 898,82 Da)

Tez çalışmasında kullanılan tek iplik DNA oligonükleotit dizileri, çift sarmal DNA dizileri ve tek iplik aptamerlerin dizileri aşağıda Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan nükleik asit dizileri ve özellikleri.

Oligonükleotid kodu	Dizilim	Uzunluk	Molekül kütlesi (Monoizotopik kütle)
ON-1	5' GATGCATGAG 3'	10 mer	3090.56 g/mol
ON-2 (ON1'in tamamlayıcı ipliği)	5' CTCATGCATC 3'	10 mer	2961.53 g/mol
DS-1 (ON-1+ON-2)	5' GATGCATGAG 3' 5' CTCATGCATC 3'	10 mer	6052,09 g/mol
ON-3	5' GCATCGGGAC 3'	10 mer	3051.55 g/mol
ON-4 (ON-3'ün tamamlayıcı ipliği)	5' GTCCCGATGC 3'	10 mer	3002.53 g/mol
DS-2 (ON-3+ON-4)	5' GCATCGGGAC 3' 5' GTCCCGATGC 3'	10 mer	6054.08 g/mol
ON-5	5' CTAAAGAGCT 3'	10 mer	3034.56 g/mol
ON-6 (ON-5'in tamamlayıcı ipliği)	5' AGCTCTTTAG 3'	10 mer	3016.54 g/mol
DS-3 (ON-5+ON-6)	5' CTAAAGAGCT 3' 5' AGCTCTTTAG 3'	10 mer	6051.10 g/mol

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan nükleik asit dizileri ve özellikleri (devam ediyor).

Oligonükleotid kodu	Dizilim	Uzunluk	Molekül kütlesi (Monoizotopik kütle)
ON-7	5' CATCGG 3'	6 mer	1791.34 g/mol
ON-8 (ON-7'nin tamamlayıcı ipliği)	5'CCGATG 3'	6 mer	1791.34 g/mol
DS-4 (ON-7+ON-8)	5' CATCGG 3' 5'CCGATG 3'	6 mer	3582.68 g/mol
ON-9	5' GGTAGG 3'	6 mer	1871.36 g/mol
ON-10 (ON-9'un tamamlayıcı ipliği)	5'CCTACC 3'	6 mer	1711.33 g/mol
DS-5 (ON-9+ON-10)	5' GGTAGG 3' 5'CCTACC 3'	6 mer	3582.69 g/mol
ON-11	5' CTGTAC 3'	6 mer	1766.34 g/mol
ON-12 (ON-11'in tamamlayıcı ipliği)	5' GTACAG 3'	6 mer	1815.35 g/mol
DS-6 (ON-11+ON-12)	5' CTGTAC 3' 5' GTACAG 3'	6 mer	3581.69 g/mol

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan nükleik asit dizileri ve özellikleri (devam ediyor).

Oligonükleotid kodu	Dizilim	Uzunluk	Molekül kütlesi (Monoizotopik kütle)
ON-13	5' CCTCTGGTCTCC 3'	12mer	3546.61 g/mol
ON-14 (ON-13'ün tamamlayıcı ipliği)	5' GGAGACCAGAGG 3'	12 mer	3742.68 g/mol
DS-7 (ON-13+ON-14)	5' CCTCTGGTCTCC 3' 5' GGAGACCAGAGG 3'	12 mer	7289.29 g/mol
ON-15	5' CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC 3'	24 mer	7235.22 g/mol
ON-16	5' GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA 3'	24 mer	7512.30 g/mol
APT-2	5' [AmC6T] TTTGGTTGGTGTGGTTGG 3'	18 mer	5817.90 g/mol
APT-3	5' AAAGGTTGGTGTGGTTGG [AmC6T] 3'	18 mer	5729.70 g/mol
APT-4	5' [AmC6T] AAAGGTTGGTGTGGTTGG 3'	18 mer	5844.90 g/mol
APT-7	5' TTTTGGTTGGTGTGGTTGG [AmC6T] 3'	21 mer	6615.30 g/mol

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Perilen esaslı lüminesans boyar madde olan N,N-di(n-butil)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit (FP-3 kodlu) molekülü ve yine lüminesans boyar madde olan platin (II) ve paladyum (II) koordinasyon bileşikleri olan Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II), [Pd(L₂)(sac)] (sac) (PT-5 kodlu) ve Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II), [Pt(L₂)(sac)] (sac) (PT-6 kodlu) molekülleri Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi, Prof. Dr. Abdurrahman ŞENGÜL tarafından sentezlenmiştir.

FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyalar ile etkileşimlerini incelemek amacıyla baz dizilimleri tarafımızca belirlenen ve Çizelge 3.1’de dizilimleri ile molekül kütleleri belirtilen ON-1, ON-2, ON-3, ON-4, ON-5, ON-6, ON-7, ON-8, ON-9, ON-10, ON-11, ON-12, ON-13 ve ON-14 kodlu tuzdan arındırılmış şekilde saflaştırılmış (desalted) oligonükleotitler Sentebiolab (Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. Yine Çizelge 3.1’de dizilimleri ve molekül kütleleri belirtilen ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler MWG-Biotech GmbH (Almanya) firmasından, APT-2, APT-3, APT-4 ve APT-7 kodlu aptamerler ise Sigma (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından temin edilmiştir. Spektroskopik ve elektroforetik analizlerde ThermoFisher Scientific Inc. (Amerika Birleşik Devletleri) firmasının yüksek molekül kütleli buzağı timüs DNA’sı “İnvitrogen™ UltraPure™ Calf Thymus DNA Solution” kullanılmıştır.

Tüm deneysel çalışmalarda örnek hazırlama süreçlerinde yüksek saflıkta çözücüler kullanılmıştır. Örnek hazırlamada çözücü olarak; metanol, asetonitril, dimetil sülfoksit, trifloro asetik asit Sigma-Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri), formik asit (%98-100) ve diklorometan Merck (Amerika Birleşik Devletleri) firmalarından temin edilmiştir. Bütün deneylerde kullanılan 18.2 M.Ω.cm dirence sahip deiyonize su, Mirae St Co.Ltd. firmasının Puris Expe-Ultrapure Water System (Güney Kore) cihazı ile elde edilmiştir. İnkübasyon ortamı için tampon çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan amonyum asetat BDH Chemicals Ltd. (İngiltere) ve sodyum klorür (≥99,5 %) Carl Roth (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan MALDI matriksleri ve diğer kimyasallar; α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) Sigma (Amerika Birleşik Devletleri), 2,5-

dihidroksibenzoik asit (DHB), 6-aza-2-tiyotimin (ATT), 2,4,6-Trihidroksiasetofenon monohidrat (THAP), 2,6-dihidroksiasetofenon (DHAP), 1,8,9-Antrasen triol (DIT) ve amonyum sitrat dibazik Fluka (İsviçre), 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) Aldrich (Almanya), p-nitroanilin (PNA) Sigma-Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. Agaroz Jel Elektforezi deneylerinde kullanılan İnvitrogen™ markasının Ultrapure™ 10X TBE tamponu, Ultrapure™ Agaroz, Ultrapure™ Etidyum Brömür (10 mg/ml) ve BlueJuice™ 10X Gel Loading Dye (DNA jel yükleme boyası, bromofenol mavisi) ThermoFisher Scientific Inc. (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Terazi

Tartım işlemleri Mettler Toledo (İsveç) hassas terazi ile yapılmıştır.

pH Metre

pH ölçümleri Mettler Toledo-Seven Multi pH metre (İsveç) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Vorteks

Örnek çözeltilerinin karıştırma işlemleri Heidolph-Reax Control Vortex (Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Termomikser

Birbirleri ile tamamlayıcı olan oligonükleotit çiftlerinin 95 °C'deki tavlama işlemleri (annealing process) ve oligonükleotitler ile boyaların etkileşimleri için 37 °C inkübasyon sıcaklığı Eppendorf ThermoMixer F1.5 cihazı kullanılarak sağlanmıştır.

MALDI Kütle Spektrometresi

FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyar maddeler ile oligonükleotitlerin ve aptamerlerin karakterizasyonları ve boyar maddeler ile nükleik asitlerin etkileşimleri MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Bremen-Almanya) kütle spektrometresi ile elde edilmiştir. Desorpsiyon ve iyonlaştırma işlemlerinde 355 nm dalga boyundaki Nd-YAG lazeri kullanılmıştır. Analit ve matriks türüne uygun iyonlaşma için analizler sırasında lazer şiddetinin değiştirilerek optimum değerleri tespit edilmiştir.

Analizler esnasında iyonlar yaklaşık olarak 25 kV'luk bir hızlandırma potansiyeline maruz bırakılmışlardır. Analizler öncesinde, kütle hatalarını önlemek amacıyla kütle spektrometresi kalibre edilmiştir. Tüm yapılar hem pozitif hem negatif iyonlaşma modlarında analiz edilmiş, tüm spektrumlar 6000 lazer vuruşu toplanarak hem lineer ve hem de reflektör modlarda alınmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek iyonlaşma veriminin en uygun olduğu şartlarda deneysel çalışmalara devam edilmiştir. Tüm veriler Bruker Daltonics firması tarafından sağlanan flexAnalysis programıyla analiz edilmiştir.

MALDI-TOF-MS analizlerinde kullanılan örnek ve matriks hazırlama yöntemleri, sonuçların değerlendirilmesi kısımlarında detaylı şekilde verilmiştir.

ESI-QTOF Kütle Spektrometresi

ESI-QTOF kütle spektrometresi ile yapılan çalışmalar iki farklı cihazda gerçekleştirilmiştir.

1) LC-ESI-QTOF-MS kütle spektrometresi (Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF-MS, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyar maddelerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her analiz öncesi cihazın kalibrasyonu sağlanmıştır. Tüm veriler Agilent firması tarafından sağlanan Mass Hunter Software veri analiz programıyla analiz edilmiştir. Analizlerde kullanılan örnek hazırlama yöntemleri ve analizler esnasında uygulanan LC-ESI-QTOF-MS parametreleri sonuçların değerlendirilmesi kısımlarında detaylı şekilde verilmiştir.

2) Oligonükleotitleri, çift iplik DNA'ların ve aptamerlerin boyalar ile etkileşimlerinin, yüksek çözünürlüklü elektrosprey kütle spektrumları, Bruker Daltonics (Almanya) firmasının Trapped Ion Mobility Spectrometry-Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi (tims-QTOF-MS) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler esnasında sistem yaklaşık olarak $6,45 \times 10^{-8}$ Torr vakum altında tutulmuştur. Sürükleyici gaz olarak azot gazı (yüksek saflıkta) kullanılmıştır. Hazırlanan örnek çözeltileri ESI-QTOF-MS analizleri için 1,0 µl/dk. akış hızında direkt enjeksiyon yöntemiyle ESI kaynağına gönderilmiş ve 2 dakika boyunca veriler kayıt altına alınmıştır. Analizler öncesinde, TOF kütle analizörünün kalibrasyonu sağlanmıştır. Kütle spektrumları hem pozitif hem de negatif iyon modunda kayıt altına alınmıştır. Tüm veriler Bruker Daltonics firması tarafından sağlanan Data Analysis 5.0 programıyla analiz edilmiştir. ESI-QTOF-

MS analizlerinde kullanılan örnek hazırlama yöntemleri ve cihaz parametreleri sonuçların değerlendirilmesi kısımlarında detaylı şekilde verilmiştir.

İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi

Oligonükleotitlerin ve çift iplik DNA'ların boyalar ile etkileşimlerinin, iyon hareketliliği verilerini içeren yüksek çözünürlüklü elektrosprey kütle spektrumları, Bruker Daltonics (Almanya) firmasının Trapped Ion Mobility Spectrometry-Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi (TIMS-QTOF-MS) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler esnasında sistem yaklaşık olarak $6,45 \times 10^{-8}$ Torr vakum altında tutulmuştur. Sürükleyici gaz olarak azot gazı (yüksek saflıkta) kullanılmıştır. ESI-IM-TOF-MS analizleri için örnek çözeltileri 3,0 µl/dk. akış hızında direkt enjeksiyon yöntemiyle ESI kaynağına gönderilmiş ve 2 dakika boyunca veriler kayıt altına alınmıştır. Analizler öncesinde, iyon hareketliliği (TIMS) ve kütle analizör (TOF) ölçümlerinin her ikisinin de kalibrasyonu sağlanmıştır. Kütle spektrumları hem pozitif iyon modunda kayıt altına alınmıştır. Tüm veriler Bruker Daltonics firması tarafından sağlanan Data Analysis 5.0 programıyla analiz edilmiştir. ESI-IM-QTOF-MS analizlerinde kullanılan örnek hazırlama yöntemleri ve cihaz parametreleri sonuçların değerlendirilmesi kısımlarında detaylı şekilde verilmiştir.

UV-Vis Spektroskopi

Absorpsiyon spektrumları Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Bilimleri Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'in araştırma laboratuvarında yer alan NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Amerika Birleşik Devletleri) ve BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

Floresans Spektroskopi

Floresans spektrumları Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Bilimleri Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'in araştırma laboratuvarında yer alan BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

Jel Elektroforezi

Nükleik asitlerin FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyalarla etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile analizleri Fisherbrand™ multiSUB™ Midi Horizontal Gel System (ThermoFisher Scientific Inc, Amerika Birleşik Devletleri) ile gerçekleştirilmiştir. Jeller Bio Rad Chemidoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak görüntülenmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon

4.1.1. N,N-di(n-butil)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diümit (FP-3 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu

İlk olarak, FP-3 molekülünün MALDI-TOF-MS kütle spektrometresi ile karakterizasyonu yapılmıştır. FP-3 molekülünün dimetil sülfoksit, dimetilformamid, tetrahidrofuran, etanol ve metanolde çözündüğü bilinmektedir. 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan FP-3 molekülünü çözmek için çözücü olarak metanol seçilmiştir. 10 mg/ml derişimde, hacimce % 50:50:0,1 oranında asetronitril:su:trifloro asetik asit içeren çözücüde α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) ve 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) matriksleri hazırlanmıştır. 50 mg/ml derişimde, hacimce eşit oranda (1:1) asetronitril:deiyonize su içeren çözücüde 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) matriksi çözülmüştür daha sonra çözücü olarak deiyonize su kullanılarak 50 mg/ml derişimdeki diamonyum sitrat (DAC) hazırlanmıştır. Son olarak 3-HPA:DAC oranı hacimce 8:1 olacak şekilde karıştırılarak final 3-HPA matriksi hazırlanmıştır.

Hazırlanan CHCA, DHB ve 3-HPA matriksleri ile hacimce 1:1 olacak şekilde analit:matriks karışımları hazırlanmış ve bu karışımlardan MALDI örnek plakasındaki her bir spota 1 μ L hacimde uygulanmış ve daha sonra açık havada kurutulmuştur. Plakada MALDI matriks kristalleri ile birlikte bulunan örnekler MALDI-TOF kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek refletron pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen analitin yapısının bozulmadan bütün halinde tayin edilebilmesi için kullanılan analit ve matriks türüne uygun iyonlaşma için analiz sırasında lazer şiddetinin optimum değerleri tespit edilmiştir. Refletron pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

Şekil 4.1’de yer alan pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen spektrumlar incelendiğinde A’da m/z 934,37’te, B’de m/z 934,39’da ve C’de m/z 934,35’te FP-3 molekülünün radikal katyonuna ($[FP-3]^+$) ait pik ve A’da m/z 935,38’de, B’de m/z 935,40’te ve C’de m/z 935,36’te görülen pikin ise FP-3 molekülünün protone olmuş iyonuna ($[FP-3+H]^+$) ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her üç spektrumda da 957’de

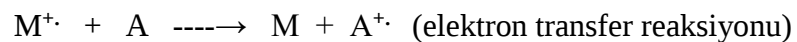
görülen pikin FP-3'e sodyum katılmasıyla oluşmuş katyona ait olduğu tespit edilmiştir. FP-3 molekülünün MALDI iyon kaynağındaki iyonlaşma mekanizması aşağıda açıklanmıştır.

FP-3 molekülünün iyonlarına ait olası izotopik dağılımları, kapalı formülü kullanılarak, cihazın yazılımında bulunan izotop hesaplayıcısına aktarılmış ve söz konusu iyonlara ait teorik kütle spektrumları oluşturulmuştur ve Şekil 4.1.B ve C'de içerisinde Teorik-1 ve Teorik-2 şeklinde ekli olarak verilmiştir. FP-3 molekülünün MALDI-MS analizleri sonrası elde edilen spektrumları incelendiğinde olası iyonlaşma mekanizmaları hakkında yorumlar yapılmıştır. Aşağıda yapılan yorumlamalarda M:matriks'i ve A:analit yani FP-3 molekülünü temsil etmektedir.

MALDI'de iyonlaşma iki kısma ayrılmaktadır. Birincil iyonlaşmada lazer vuruşu sırasında ilk iyonlar oluşur ve bunlar genellikle matriks molekülleridir. İkincil iyonlaşmada birbirini takip eden reaksiyonlarla birlikte iyonlar oluşur (matriks-matriks reaksiyonları veya matriks-analit reaksiyonları). Bu reaksiyonlar sonucunda MALDI'de pozitif modda temel olarak radikal katyon, protone olmuş psödo-moleküler iyon veya metal iyonu katılmasıyla oluşan psödo-moleküler iyon pikleri görülmektedir. Lazer uyarması sonucunda oluşan iyonlar en basit yolla tek molekül çoklu foton iyonlaşma mekanizması (single molecule multiphoton ionization-MPI) ile açıklanabilir. Bu iyonlaşma mekanizması ile matriks radikal katyonları oluşmaktadır. Bu mekanizma UV MALDI birincil iyonlaşma mekanizması olarak da nitelendirilmektedir [155].



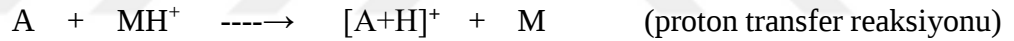
Matriks lazer enerjisini absorplayarak fotoiyonlaşma mekanizması ile radikal katyon oluşturur. Sonrasında matriks radikal katyonları ve nötral analit molekülleri (MALDI analizlerinde sıklıkla karşılaşılan protone olmuş veya metal katılmasıyla oluşan katyonlardan ziyade) elektron transfer reaksiyonu ile analit molekülünün radikal katyonlarını oluştururlar. Nötral analit moleküllerinden matriks radikal iyonlarına elektron transferi ile radikal analit katyonları oluşmaktadır [155].



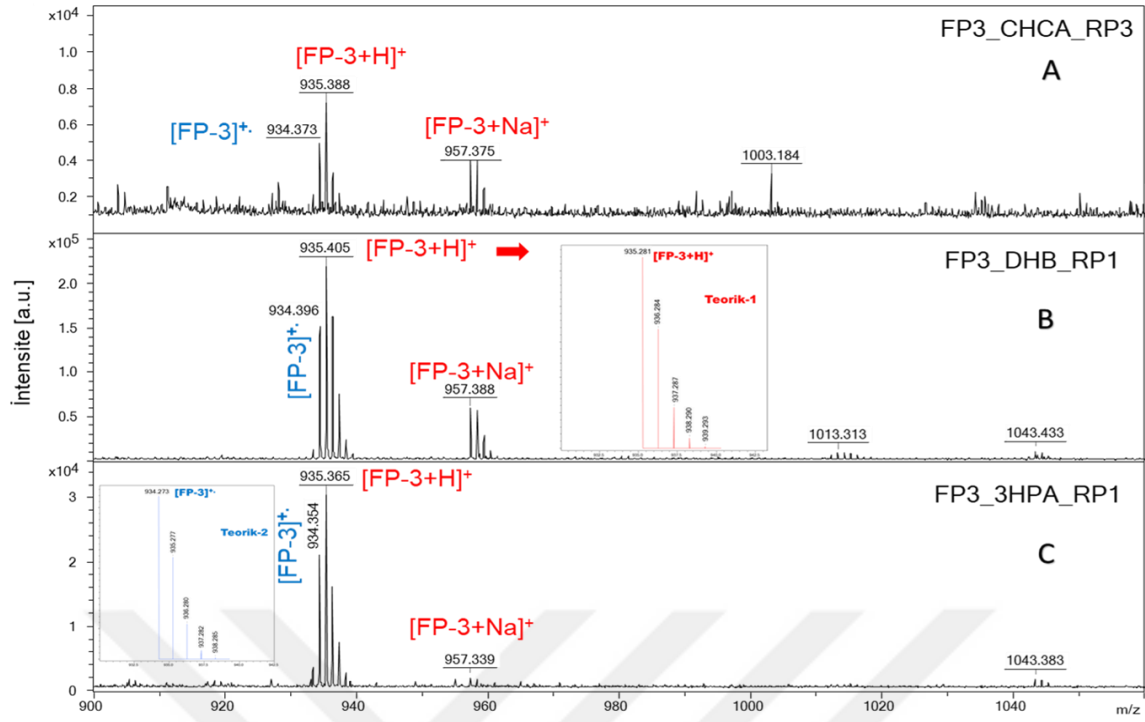
Matriks radikal iyonlarının sıklıkla gözlenmesine rağmen analit radikalleri sadece düşük polaritedeki ve fonksiyonel grup içermeyen moleküller için gözlenebilmektedir. Direkt fotoiyonlaşma mekanizmasına göre, matriks radikal katyonları ve analit molekülleri arasında analit radikal katyonları oluşturmak için gerçekleşen gaz fazında elektron transfer mekanizması daha kabul edilebilir bir mekanizmadır. Elektron transfer reaksiyonları sadece, matriks moleküllerinin iyonlaşma potansiyelinin analit moleküllerinin iyonlaşma potansiyelinden fazla olduğu durumlarda uygun olmaktadır.

Çoklu aromatik yapılar, iyi elektron transfer edebilme özelliklerinden dolayı, metal katyonları oluşturmak yerine radikal katyonları oluşturmayı tercih etmektedir. Bu aynı zamanda bu yapıların matriksten bağımsız olmalarına olanak sağlamaktadır.

İyonlaşma mekanizmalarına göre, FP-3 molekülün kütle spektrumlarında elektron transfer mekanizması ile oluşmuş analit radikal katyonları ($[A]^{+\cdot}$) ve proton transferiyle oluşmuş iyonları ($[A+H]^+$) görülmektedir. Protone olmuş iyonun oluşum mekanizması aşağıda verilmektedir.



Sonuç olarak, FP-3 molekülünün MALDI-TOF-MS kütle spektrometresi ile karakterizasyonu çalışmalarında DHB matriksinin kullanıldığı durumlarda elde edilen kütle spektrumlarının kütle ayırımı ve S/N (sinyal/gürültü) oranı değerlerinin ve sinyal şiddetlerinin 3-HPA matriksi kullanılarak elde edilen spektrumlardan daha iyi olduğu görülmüştür.



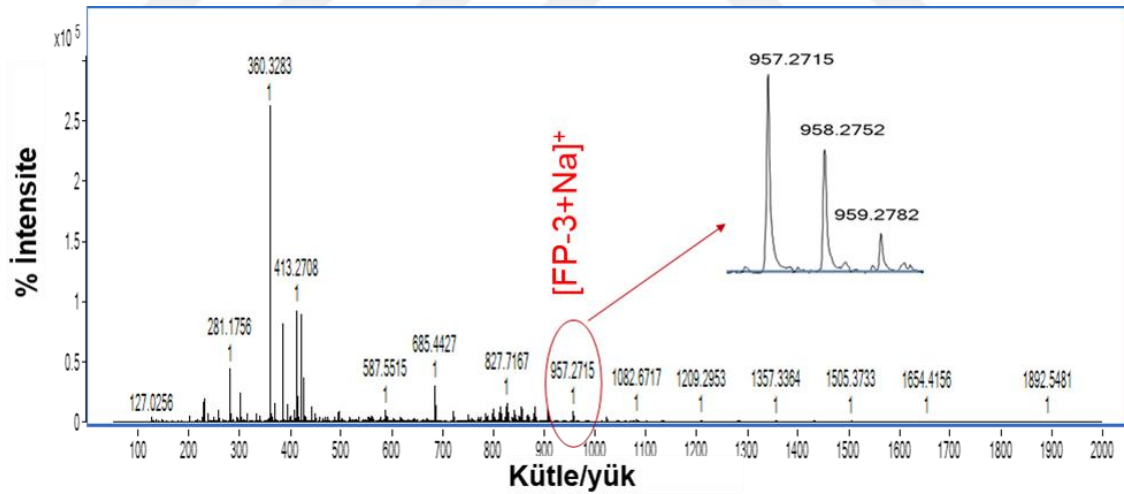
Şekil 4. 1. FP-3 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matrisleriyle analit:matris oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.

FP-3 molekülünün LC-ESI-Q-TOF-MS kütle spektrometresi (Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF-MS, Amerika Birleşik Devletleri) ile yapılan analizlerinde hareketli fazların ve oranlarının belirlenmesi, hangi akış hızında uygulanacağıyla ilgili deneyler yapılmıştır. Daha sonra kütle spektrometrik analizlerde kullanılacak parametreler belirlenmiştir. FP-3 molekülü (1,0 mg/ml) metanol ile çeşitli hacim oranlarında seyreltilerek analiz edilmiştir. Çözeltiye az miktarlarda asit veya baz eklenmesi ile zor iyonlaşan türlerin iyonlaştırılmaları da ESI ile kolaylıkla sağlanabileceği için çözücü olan metanole ilave formik asit, dimetil sülfoksit ve amonyum asetat eklenip elde edilen spektrumlardaki farklılıklar gözlenmiştir. Örnekler metanolden oluşan hareketli faz içerisinde Agilent 1200 serisi HPLC pompası yardımıyla 0,3 mL/dk akış hızında direkt ESI-Q-TOF kütle spektrometresine gönderilmiştir. Çalışmaların hepsi pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. FP-3 molekülünün analizi için optimize edilen ESI-MS parametreleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Cihaz, her analiz öncesi kalibre edilmiştir.

Çizelge 4. 1. FP-3 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.

İyonlaşma modu	Pozitif
Gaz sıcaklığı	300 °C
Kurutucu gaz	10 L/min.
Nebulizör gaz	40 psi
Kapiler voltaj	4000 V
Fragmentor voltaj	175 V
Nozzle voltaj	300 V
Skimmer voltaj	65 V

FP-3 molekülünün ESI-Q-TOF-MS pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Kütle spektrumu incelendiğinde, m/z 957,27’de gözlenen pikin FP-3 molekülüne sodyum katılmasıyla oluşmuş $[FP-3+Na]^+$ iyonuna ait olduğu görülmektedir. (Spektrumda piklerin üzerinde yazan “1” sayısı iyonların tek yüklü olduğunu göstermektedir.)



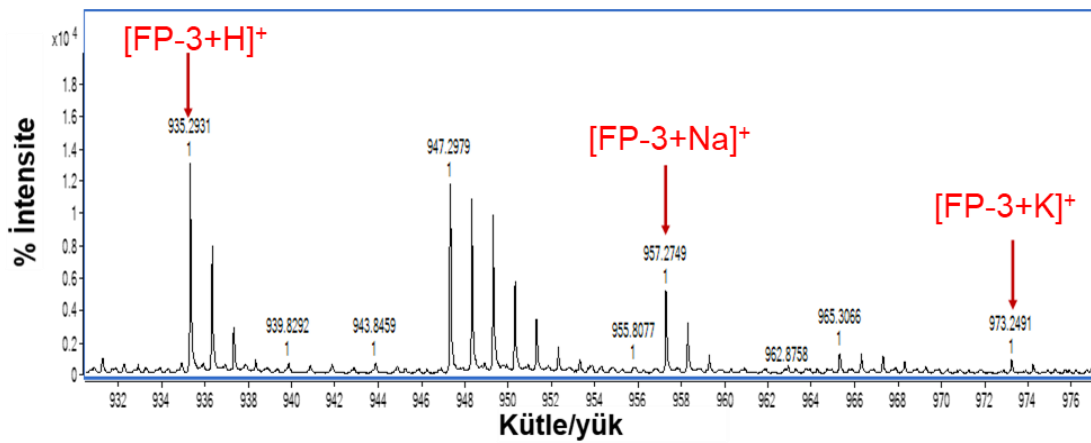
Şekil 4. 2. FP-3 molekülünün (hacimce 1:200, çözücü-metanol) ESI’da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.

ESI molekülleri parçalamadan iyonlaştıran, zayıf etkileşimlerle oluşmuş kompleksleri bile bir bütün olarak (intact) tayin edebilmemize olanak sağlayan bir yumuşak iyonlaştırma yöntemidir. Uygun enstrümantal koşullar sağlandığında genel olarak elektrosprey iyonlaşması ile çoklu yüklenmiş iyonlar oluşmaktadır. ESI’nın bu özelliği ona desorpsiyon/iyonlaştırmalı yöntemlere göre bazı durumlarda daha fazla avantaj

sağlamaktadır. Pozitif iyon modunda çalışıldığında yüklenme genellikle protonlanma yoluyla, bazen de metal katılması yoluyla gerçekleşmektedir. Negatif iyon modunda ise analitin deprotonlanması ile yüklenme oluşmaktadır. Analit molekülleri proton transferi mekanizması ile yüklendiği için tespit edilen iyonlar (elektron kazanımı veya kaybı ile oluşan) gerçek moleküler iyonlar değildir fakat bu iyonlar (protone veya deprotone) daha tercih edilir yapılardır.

Kasyon katılma mekanizması, nötral moleküle kovalent olmayan etkileşimlerle pozitif yüklenmiş bir iyon katılması ile gerçekleşir (örn; alkali, amonyum). Kasyon katılması protonlanma ile kararlı olmayan moleküller için daha uygundur. Moleküle kasyon katılması molekülün protonlanmasına göre daha az kovalenttir, bu nedenle yük kasyon üzerinde lokalize olmaktadır. Bu durum yükün delokalize olmasını ve molekülün fragmentasyonunu minimize eder.

Sodyum iyonu ESI'da kullanılan çözücülerde yaygın olarak karşılaşılan bir kirliliktir. Analit molekülleri sıklıkla sodyum iyonları tarafından kontamine olurlar. Çözeltiye milimolar derişimlerinde amonyum asetat eklenmesi ile istenmeyen sodyum iyonu katılması engellenebilmektedir. Çünkü ortama eklenen asetat iyonu çözeltideki serbest metal iyonlarına bağlanarak metal katılmasıyla oluşan iyonların baskılama etkisini engelleyecek ve protone olmuş iyonun sinyal şiddetinin artmasını sağlayacaktır. Bu nedenle ortama amonyum asetat eklenmesi sinyalin kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini artırır, istenmeyen katılmaları ve zemin (background) sinyallerini önemli ölçüde azaltır, dolayısıyla temiz ve kolay yorumlanabilir bir kütle spektrumu elde edilmesini sağlar.



Şekil 4. 3. FP-3 molekülünün (hacimce 1:200, çözücü-metanol, ek olarak amonyum asetat eklenmiştir.) ESI'da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.

Amonyum asetat eklenmesinden sonra elde edilen kütle spektrumunda protone olmuş, sodyum katılması ve potasyum katılması ile oluşmuş iyon pikleri görülmektedir (Şekil 4.3). Amonyum asetat eklenmesi ile birlikte daha önceki spektrumlarda görülmeyen protone olmuş pike ($[FP-3+H]^+$, m/z: 935,29) ait sinyal tespit edilmiştir. Protone olmuş iyon pikine ait sinyalin şiddetinin sodyum ve potasyum katılması ile oluşan iyonların piklerinin (sırasıyla $[FP-3+Na]^+$, m/z: 957,27 - $[FP-3+K]^+$, m/z: 973,24) sinyal şiddetlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Burada amonyum asetat katılmasının spektruma olan etkisi gözlenmiştir.

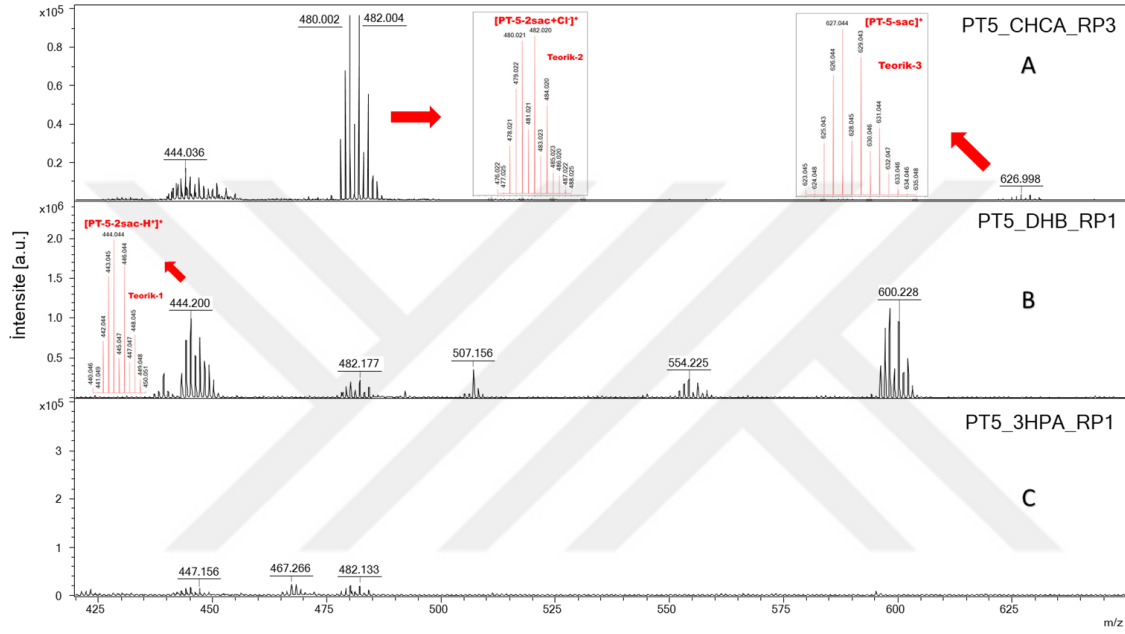
Sonuç olarak, yapılan çalışmalardan elde edilen MALDI ve ESI kütle spektrumları incelendiğinde sinyallerdeki kütle farklarının sebebinin MALDI ve ESI sistemlerindeki iyonlaşma mekanizmalarının farklılık göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.2.Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II), [Pd(L₂)(sac)] (sac) (PT-5 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu

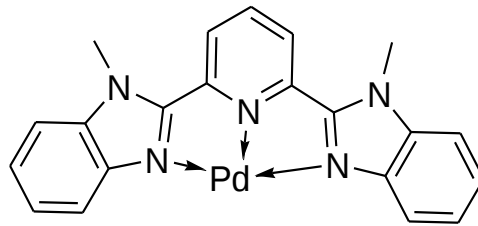
PT-5 molekülü, MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI Tissue typer™, Almanya) kütle spektrometresi ile karakterize edilmiştir. 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan PT-5 molekülünü çözmek için çözücü olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır. Matriks olarak 10 mg/ml derişimde DHB, CHCA, 50 mg/ml derişimde 3-HPA matriksleri kullanılmıştır. Hacimce 1:1 olacak şekilde analit:matriks karışımları hazırlanmış ve bu karışımlardan MALDI örnek plakasındaki her bir spota 1 µL hacimde uygulanmış ve daha sonra açık havada kurutulmuştur. Plakada MALDI matriks kristalleri ile birlikte bulunan örnekler MALDI-TOF kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek refletron pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir.

PT-5 molekülü için refletron pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.4.A'da CHCA matriksi ile alınan spektrumda m/z değeri 626,99 olan pikin PT-5 yapısından 1 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan $[PT-5-sac]^+$ iyonuna ait olduğu aydınlatılmış olup bu pikte paladyum dağılımı görülmüştür. A'da m/z değeri 444,03 ve B'de DHB matriksi ile elde edilen spektrumda 444,20 olan piklerin ise PT-5'ten 2 sakkarinat anyonu ve 1 proton ayrılmasıyla oluşan $[PT-5-2sac-H]^+$ iyonuna ait olduğu ve pikte paladyum dağılımı tespit edilmiştir.Şekil 4.5'te $[PT-5-2sac]^{2+}$ iyonu yani $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ 'ye ait yapı verilmiştir. m/z değerleri Şekil 4.4.A'da 482,00, B'de 482,17 ve C'de 3-HPA matriksi ile alınan spektrumda 482,13'te görülen piklerin ise paladyum

bağlı liganda klor katılması ile oluşan $[PT-5-2sac+Cl]^+$ iyonuna ait olduğu düşünülmüştür. PT-5 yapısının sentez aşamasında bulunan K_2PdCl_4 molekülünden kaynaklı olarak ortamda bulunan klorun paladyum bağlı liganda katılmasıyla oluştuğu düşünülmüştür. PT-5 molekülünün iyonlarına ait olası izotopik dağılımları, kapalı formülü kullanılarak, cihazın yazılımında bulunan izotop hesaplayıcısına aktarılmış ve söz konusu iyonlara ait teorik kütle spektrumları oluşturulmuştur ve Şekil 4.4.A ve B içerisinde Teorik-1, Teorik-2 ve Teorik-3 şeklinde ekli olarak verilmiştir.



Şekil 4. 4. PT-5 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matrisleriyle analit:matris oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4. 5. $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütle: 445,05 Da)

Sonuç olarak, PT-5 molekülünün MALDI-TOF-MS kütle spektrometresi ile karakterizasyonu çalışmalarında CHCA ve DHB matrislerinin kullanıldığı durumlarda elde edilen kütle spektrumlarının kütle ayırımı ve S/N (sinyal/gürültü) oranı değerlerinin

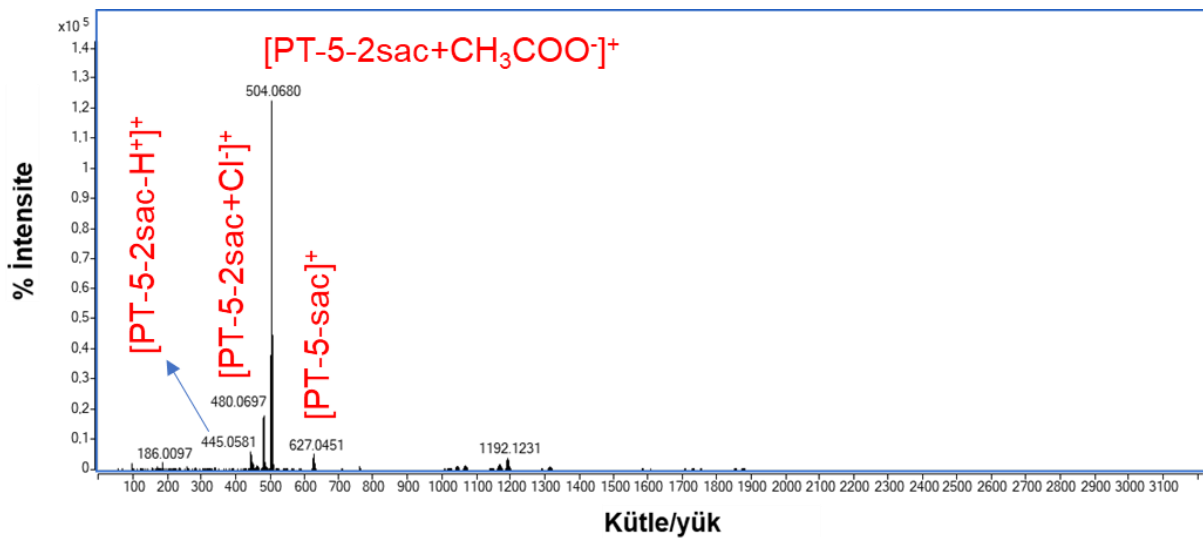
ve sinyal şiddetlerinin 3-HPA matriksi kullanılarak elde edilen spektrumlardan daha iyi olduğu görülmüştür.

PT-5 molekülü ayrıca LC-ESI-Q-TOF-MS (Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF LC/MS, Amerika Birleşik Devletleri) kütle spektrometresi ile de karakterize edilmiştir.

Zor iyonlaşan türlerin ESI’da iyonlaştırılmalarının kolaylıkla sağlanabilmesi amacıyla örnek çözeltilerine formik asit veya amonyum asetat eklenerek elde edilen spektrumlardaki farklılıklar gözlenmiştir. Örnekler Agilent 1200 serisi HPLC pompası yardımıyla 0,5 mL/dk akış hızında direkt ESI-Q-TOF kütle spektrometresine gönderilmiştir. Cihaz, her analiz öncesi kalibre edilmiştir.

Çizelge 4. 2. PT-5 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.

İyonlaşma modu	Pozitif
Gaz sıcaklığı	250 °C
Kurutucu gaz	11 L/min.
Nebulizör gaz	40 psi
Kapiler voltaj	3500 V
Fragmentor voltaj	175 V
Nozzle voltaj	1000 V
Skimmer voltaj	65 V



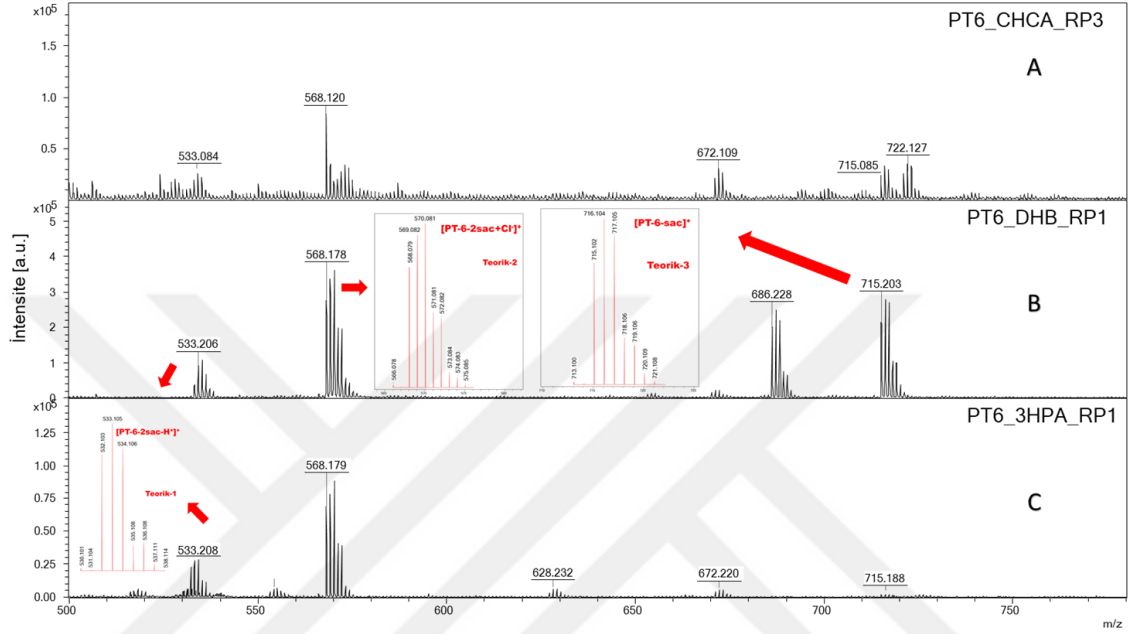
Şekil 4. 6. 1,0 mg/ml derişimde PT-5 molekülü (çözücü= Su:%1 Amonyum asetat), ESI’da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.

PT-5 molekülü için pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.6'daki spektrum incelendiğinde; m/z değeri 627,04 olan pik $[C_{28}H_{21}N_6O_3PdS]^-$ yani $[PT-5-sac]^+$ iyonuna, m/z değeri 445,05 olan pik $[C_{21}N_5H_{16}Pd]^+$ yani $[PT-5-2sac-H]^+$ iyonuna, m/z değeri 480,06 olan pik ise $[C_{21}N_5H_{17}PdCl]^+$ yani $[PT-5-2sac+Cl]^+$ iyonuna aittir. m/z değeri 504,06 olan pik incelendiğinde, 445,05 Da kütledeki paladyum bağlı liganda ($[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$) asetat anyonu ($[CH_3COO]^-$) katılması ile oluşan $[PT-5-2sac+CH_3COO]^-$ yapısına ait tek yüklü pik olduğu yorumuna varılmıştır. Sinyalde paladyum dağılımı gözlenmiştir. Burada asetatın, klor ve sakkarinattan daha girici etki yapmış olduğu görülmüştür.

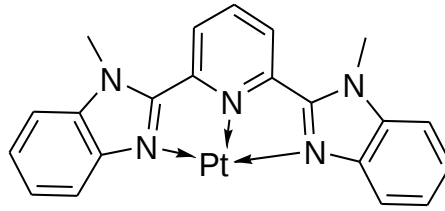
4.1.3. Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II), $[Pt(L_2)(sac)](sac)$ (PT-6 kodlu) molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu

PT-6 molekülü, MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile karakterize edilmiştir. 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan PT-6 molekülünü çözmek için çözücü olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır. Matriks olarak 10 mg/ml derişimde DHB, CHCA, 50 mg/ml derişimde 3-HPA matriksleri kullanılmıştır. Hacimce 1:1 olacak şekilde analit:matriks karışımları hazırlanmış ve bu karışımlardan MALDI örnek plakasındaki her bir spota 1 µL hacimde uygulanmış ve daha sonra açık havada kurutulmuştur. Plakada MALDI matriks kristalleri ile birlikte bulunan örnekler MALDI-TOF kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek refletron pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. PT-6 molekülü için refletron pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.7.A'da CHCA matriksi ile alınan spektrumda m/z değeri 715,08, B'de DHB matriksle alınan spektrumda m/z değeri 715,20 ve C'de 3-HPA matriksi ile alınan spketrumda m/z değeri 715,18 olan piklerin PT-6 yapısından 1 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan $[PT-6-sac]^+$ iyonuna ait olduğu aydınlatılmış olup bu pikte platin dağılımı görülmüştür. m/z değeri A'da 568,12, B'de 568,17 ve C'de 568,17 olan piklerin ise PT-6'dan 2 sakkarinat anyonu ve 1 proton ayrılmasıyla oluşan $[PT-6-2sac-H]^+$ iyonuna ait olduğu ve pikte platin dağılımı tespit edilmiştir. Şekil 4.8'de $[PT-6-2sac]^{2+}$ iyonu yani $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$,ye ait yapı verilmiştir. m/z değerleri Şekil 4.7.A'da 533,08, B'de 533,20 ve C'de 533,20'de görülen piklerin ise platin bağlı liganda klor katılması ile oluşan $[PT-6-2sac+Cl]^+$ iyonuna ait olduğu düşünülmüştür. PT-6 yapısının sentez aşamasında bulunan K_2PdCl_4 molekülünden kaynaklı olarak ortamda bulunan klorun

platin bağlı liganda katılmasıyla oluştuğu düşünülmüştür. PT-6 molekülünün iyonlarına ait olası izotopik dağılımları, kapalı formülü kullanılarak, cihazın yazılımında bulunan izotop hesaplayıcısına aktarılmış ve söz konusu iyonlara ait teorik kütle spektrumları oluşturulmuştur ve Şekil 4.7.B ve C içerisinde Teorik-1, Teorik-2 ve Teorik-3 şeklinde ekli olarak verilmiştir.



Şekil 4. 7. PT-6 ile A) CHCA, B) DHB ve C) 3-HPA matriksleriyle analit:matriks oranı hacimce 1:1 hazırlanan reflektör pozitif mod MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4. 8 $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütle: 534,11 Da)

Sonuç olarak, PT-6 molekülünün MALDI-TOF-MS kütle spektrometresi ile karakterizasyonu çalışmalarında tüm matrikslerin uygun olduğu görülmüştür. Ancak DHB ve 3-HPA matrikslerinin kullanıldığı durumlarda elde edilen kütle spektrumlarının kütle ayırımı ve S/N (sinyal/gürültü) oranı değerlerinin ve sinyal şiddetlerinin CHCA matriksi kullanılarak elde edilen spektrumlardan daha iyi olduğu görülmüştür. Ayrıca

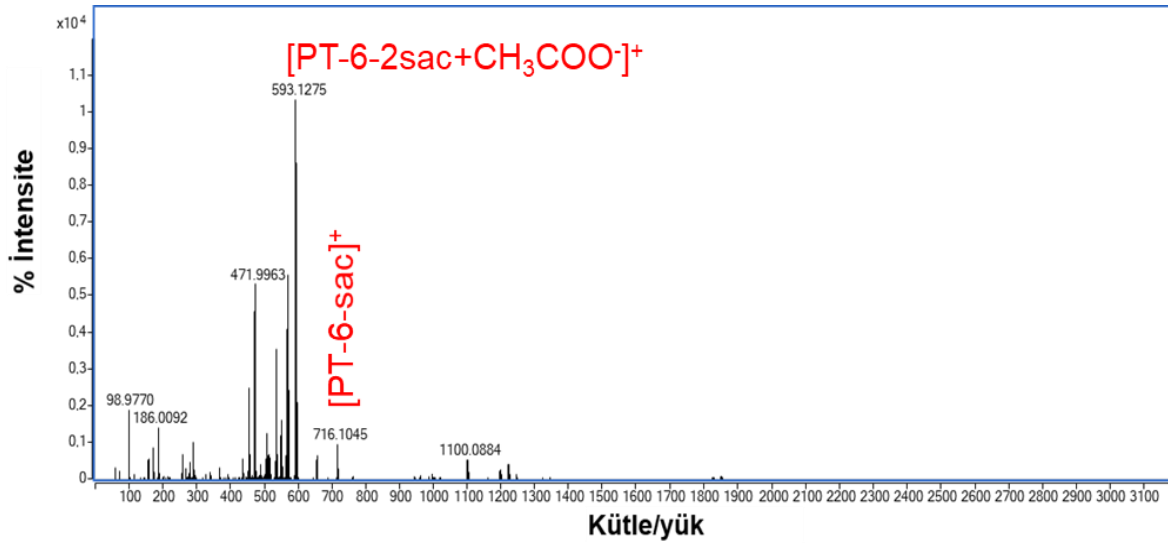
CHCA matrisi ile elde edilen spektrumlarda farklı katılma iyonlarının olması nedeniyle pikler arasında girişimler olduğu görülmüştür.

PT-6 molekülü ayrıca LC-ESI-Q-TOF-MS (Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF LC/MS, Amerika Birleşik Devletleri) kütle spektrometresi ile de karakterize edilmiştir.

Örnek çözeltilerine formik asit veya amonyum asetat eklenerek elde edilen spektrumlardaki farklılıklar gözlenmiştir. Örnekler Agilent 1200 serisi HPLC pompası yardımıyla 0,5 mL/dk akış hızında direkt ESI-Q-TOF kütle spektrometresine gönderilmiştir. Cihaz, her analiz öncesi kalibre edilmiştir.

Çizelge 4. 3. PT-6 molekülünün karakterizasyonu için optimize edilen ESI-MS parametreleri.

İyonlaşma modu	Pozitif
Gaz sıcaklığı	250 °C
Kurutucu gaz	11 L/min.
Nebulizör gaz	40 psi
Kapiler voltaj	3500 V
Fragmentor voltaj	175 V
Nozzle voltaj	1000 V
Skimmer voltaj	65 V



Şekil 4. 9. 1,0 mg/ml derişimde PT-6 molekülü (çözücü= Su:%1 Amonyum asetat), ESI’da pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumu.

PT-6 molekülü için pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.9'daki spektrum incelendiğinde; m/z değeri 716,10 olan pik $[C_{28}H_{21}N_6O_3PtS]^-$ yani $[PT-6-sac]^+$ iyonuna, m/z değeri 593,12 olan pik incelendiğinde, Şekil 4.8'de verilen 534,11 Da kütledeki platin bağlı liganda yani $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ iyonuna asetat anyonu ($[CH_3COO]^-$) katılması ile oluşan $[PT-6-2sac+CH_3COO]^-$ yapısına ait tek yüklü iyonun ait pik olduğu yorumuna varılmıştır. Sinyalde platin dağılımı gözlenmiştir. Burada asetatın girici etki yapmış olduğu görülmüştür.

MALDI-MS analizlerinde reflektör pozitif modda alınan spektrumlar birbirleri ile kıyaslandığında yapısında platin metali bulunan PT-6 molekülünün, yapısında paladyum metali bulunan PT-5 molekülünden daha kararlı olduğu değerlendirilmiştir. FP-3, PT-5 ve PT-6 yapılarıyla hem MALDI-MS hem de ESI-MS'te negatif iyon modunda da analizler gerçekleştirilmiş olup bu modlarda çalışılarak üretilen spektrumların sinyal/gürültü (S/N) oranları ile kütle ayrımlarının görece düşük olduğu tespit edilmiştir. Pozitif iyon modunda üretilen spektrumların negatif moda görece daha iyi olduğu tespiti yapılmıştır.

4.1.4. Oligonükleotit analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi

Oligonükleotitlerin analizlerinde matriksin etkisinin incelenmesi amacıyla farklı matriksler ile farklı oranlardaki analit:matriks karışımları denemesi yapılmıştır. Sentebiolab (Türkiye) firması tarafından sentezlenen ve daha önce Çizelge 3.1'de dizilimleri ve molekül kütleleri belirtilen oligonükleotitlerin farklı matrikslerle analizleri MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Rapiflex MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile yapılmıştır.

Oligonükleotitlerin kütle spektrometrik şartlarda gaz fazındaki kararlılıklarının incelenmesi amacıyla ilk olarak çözelti ortamındaki koşullara bağlı olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Matriks etkisinin incelenmesi amacıyla α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA), 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), 2,4,6-trihidroksiasetofenon (THAP), 2,4,6-trihidroksiasetofenon (THAP-diamonyum sitratsız), 2,6-dihidroksiasetofenon (DHAP), 6-aza-2-tiyotimin (ATT), ditranol (DIT), p-nitroanilin (PNA), 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) matriksleri kullanılarak farklı oranlardaki analit:matriks karışımları hazırlanmış, ON-9 kodlu oligonükleotitin MALDI-TOF analizleri gerçekleştirilmiştir. Liyofilize şekilde temin edilen oligonükleotitlerin, derişimleri 100

μM (100 pmol/ μl) olacak şekilde deiyonize suda pipetaj yöntemi ile çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -20°C 'de saklanmıştır. Daha sonra stok çözeltilerden 5 pmol/ μl olacak şekilde su ile seyreltme işlemi yapılarak bu çalışmada model olması açısından yalnızca ON-9 kodlu oligonükleotit örnek çözeltileri hazırlanmıştır.

MALDI matrikslerinin hazırlanma yöntemi; çözücü olarak hacimce eşit oranda (1:1) asetonitril:deiyonize su kullanılarak hazırlanan 50 mg/ml derişimde 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) matriksi ile çözücü olarak deiyonize su kullanılarak hazırlanan 50 mg/ml derişimdeki diamonyum sitrat, hacimce 8:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak vortekslenmiştir. Çözücü olarak hacimce eşit oranda (1:1) asetonitril:deiyonize su kullanılarak hazırlanan 10 mg/ml derişimde 2,4,6-trihidroksiasetofenon (THAP) matriksi ile çözücü olarak deiyonize su kullanılarak hazırlanan 50 mg/ml derişimdeki diamonyum sitrat, hacimce 8:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak vortekslenmiştir. Çözücü olarak asetonitril kullanılarak hazırlanan 10 mg/ml derişimde 6-aza-2-tiyotimin (ATT) matriksi ile çözücü olarak deiyonize su kullanılarak hazırlanan 20mM derişimdeki diamonyum sitrat, hacimce 1:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak vortekslenmiştir. (Oligonükleotit analizlerinde en iyi sonuç veren MALDI matrikslerinin 3-HPA, THAP ve ATT olduğu belirlenmiştir ve bu bölümde sadece bu matrikslerin hazırlanma yöntemi verilmiştir.)

Daha sonra analit:matriks oranı hacimce 1:1 karışım, 1:5 karışım, 1:10 karışım ve 1:1 on-spot olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyperTM, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer pozitif modunda, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. (On-spot yöntemi; ilk olarak oligonükleotit çözeltisinden her bir spota 1 μL hacimde uygulanmış ve açık havada kurutulmuştur. Daha sonra MALDI örnek plakasındaki oligonükleotit spotlanan her bir spotun üzerine 1 μL hacimde matriks molekülü spotlanmış ve açık havada kurumaya bırakılmıştır.)

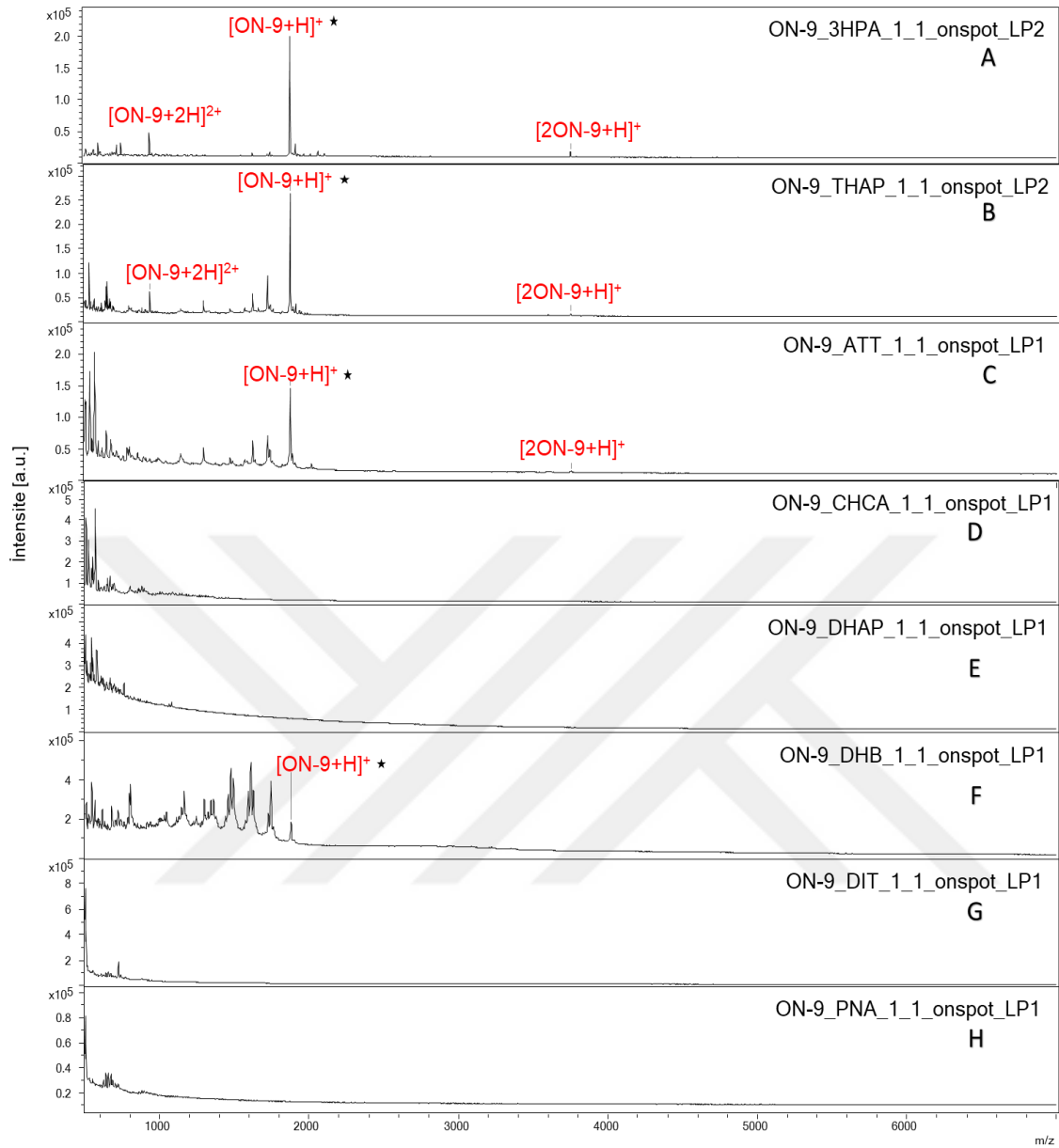
ON-9 kodlu oligonükleotit için lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.10'daki spektrumlar incelendiğinde (yıldız ile işaretli pikler ON-9'un $[\text{ON-9+H}]^+$ protone olmuş moleküler iyon pikine aittir, ayrıca oligonükleotitin $[\text{ON-9+2H}]^{2+}$ ve $[\text{2ON-9+H}]^+$ iyon piklerine ait sinyaller de görülmektedir); analit:matriks oranının 1:10 (karışım) olduğu analizlerde matriksin analit iyonlarını baskıladığı görülmüş, 1:5

(karışım) oranının kabul edilebilir düzeyde olduğu, 1:1 karışımında ise ayrıcılığın iyi olmasına rağmen sinyal şiddetlerinin daha düşük olduğu ancak, yüksek ayrıcılıkta ve şiddette gözlenen en iyi spektrumların 1:1 oranında on-spot yöntemiyle hazırlanan analizler sonucunda elde edildiği görülmüştür.

Matriks etkisinin incelenmesi için yapılan analizler neticesinde nükleik asitlerin analizlerinde en uygun matrikslerin sırasıyla 3-HPA, THAP, ATT şeklinde olduğu belirlenmiştir. Oligonükleotitlerin analizlerinde en çok kullanılan MALDI matriksleri, 3-hidroksipikolinik asit, 2,4,6-tri-hidroksiasetofenon ve 6-aza-2-tiotimin olduğu bilgisi literatürde yer almakta [98], [156] olup deneysel sonuçlar ile literatür sonuçları uyumlu bulunmuştur. Öte yandan DHB, CHCA, DHAP, DIT ve PNA matriksleri ile yapılan analizlerde oligonükleotitler için uygun spektrumlar elde edilememiştir. Bu bölümde yalnızca analit:matriks oranı 1:1 olan on-spot yöntemiyle hazırlanmış örneklerle ait spektrumlar verilmiştir. 1:1, 1:5 ve 1:10 karışımlar şeklinde hazırlanan analizlere ait kütle spektrumları EK 1.1’de yer almaktadır.

Literatürde nükleik asitlerin MALDI-TOF analizlerinde, matriks olarak 3-HPA’nın pozitif iyon modunda DNA analizi için iyi bir matriks olduğunu bildiren birçok çalışma yer almaktadır [155]–[157]. Ancak bu matriks kullanımında sodyum ve potasyum katılım piklerinin gözlenmesi daha olasıdır. Bununla birlikte matriks hazırlama işleminde ortama amonyum iyonlarının eklenmesiyle sodyum ve potasyum katılmalarının önemli ölçüde azaldığı da belirtilmiştir [157],[158].

Deneysel çalışmalar neticesinde, nükleik asitlerle en iyi çalışan matriksin 1:1 (analit:matriks) oranında on-spot olarak hazırlanan 3-HPA olduğu sonucuna ulaşılmış olup bu sonucun literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Oligonükleotitler her ne kadar 3-HPA matriksinde en iyi gözlenmiş olsa bile nükleik asit:boya etkileşimlerinin incelendiği kompleks analizleri için matriks seçimi halen önemlidir. Bölüm 4.1.1, 4.1.2 ve 4.1.3’te FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyarlarla yapılan MALDI karakterizasyon çalışmalarında ise en iyi spektrumlar DHB matriksi ile elde edilmiştir. Nükleik asitler ve boyaların en iyi gözlendiği MALDI matriksleri kullanılarak etkileşim analizleri için optimum matriksin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalara etkileşimlerin incelendiği Bölüm 4.1.8’de yer verilmiştir.



Şekil 4. 10. ON-9 kodlu oligonükleotit ile A)3-HPA, B)THAP, C)ATT, D)CHCA, E)DHAP, F)DHB, G)DIT ve H)PNA matrikslerinin hacimce 1:1 oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan lineer mod MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler ON-9'un protone olmuş moleküler iyon pikine aittir).

4.1.5. Oligonükleotidlerin MALDI-TOF MS ile Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılan Çizelge 3.1’de dizilimleri ile molekül kütleleri belirtilen ve kısaca ON kodlarıyla isimlendirilen oligonükleotitler, MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI Tissue typer™, Almanya) kütle spektrometresi ile karakterize edilmiştir.

Daha önce hazırlanmış olan 100 µM (100 pmol/µl) derişimdeki stok oligonükleotit çözeltilerinden 5 pmol/µl olacak şekilde su ile seyreltme işlemi yapılarak örnek çözeltileri hazırlanmıştır. Matriks olarak 3-HPA ve 1:1 oranında on-spot yöntemi uygulanmıştır. Örnekler MALDI-kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve refletron pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Pozitif iyon modunda ve lineer modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir. Oligonükleotitler için lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.11’deki spektrumlar incelendiğinde;

A’da ON-1 kodlu oligonükleotitin; $[M+H]^+$ protone olmuş iyon, $[M+2H]^{2+}$ çift yüklü iyon ve $[2M+H]^+$ dimer iyonuna ait sinyaller,

B’de ON-2 kodlu oligonükleotitin; $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

C’de ON-3 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

D’de ON-4 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

E’de ON-5 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

F’de ON-6 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

G’de ON-7 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

H’de ON-8 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

I’da ON-9 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

J’de ON-10 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

K’da ON-11 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

L’de ON-12 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

M’de ON-13 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller,

N’de ON-14 kodlu oligonükleotitin $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[2M+H]^+$ iyonlarına ait sinyaller

görülmüştür. Spektrumlarda yıldız ile işaretli pikler oligonükleotitlerin protone olmuş moleküler iyon pikine aittir. Oligonükleotitlerin; M monoizotopik kütlesi, $[M+H]^+$ protone olmuş iyonlarına, $[M+2H]^{2+}$ çift yüklü iyonlarına ve $[2M+H]^+$ dimer iyonlarına ait m/z değerleri Çizelge 4.4’te topluca verilmiştir.

Literatürde nükleik asitlerin MALDI-TOF analizlerinde, matriks olarak 3-HPA'nın pozitif iyon modunda iyi bir matriks olduğunu bildiren çalışmalar bulunmasıyla birlikte bu matriks kullanımında sodyum ve potasyum katılım piklerinin gözlenmesi sıklıkla gözlenmektedir. 3-HPA matriksinin kullanılarak yapılan analizlere ait spektrumlarda gaz fazında sodyum ve potasyum katılmalarıyla oluşmuş iyonlarda pik genişlemesinin olduğu görülmüştür. Bu katılmalarla birlikte iyonların birbirinden ayrılması güçleşmekte ve ayırıcılığı düşürerek elde edilen sinyal şiddetlerinin azalmasına sebebiyet vermektedir.

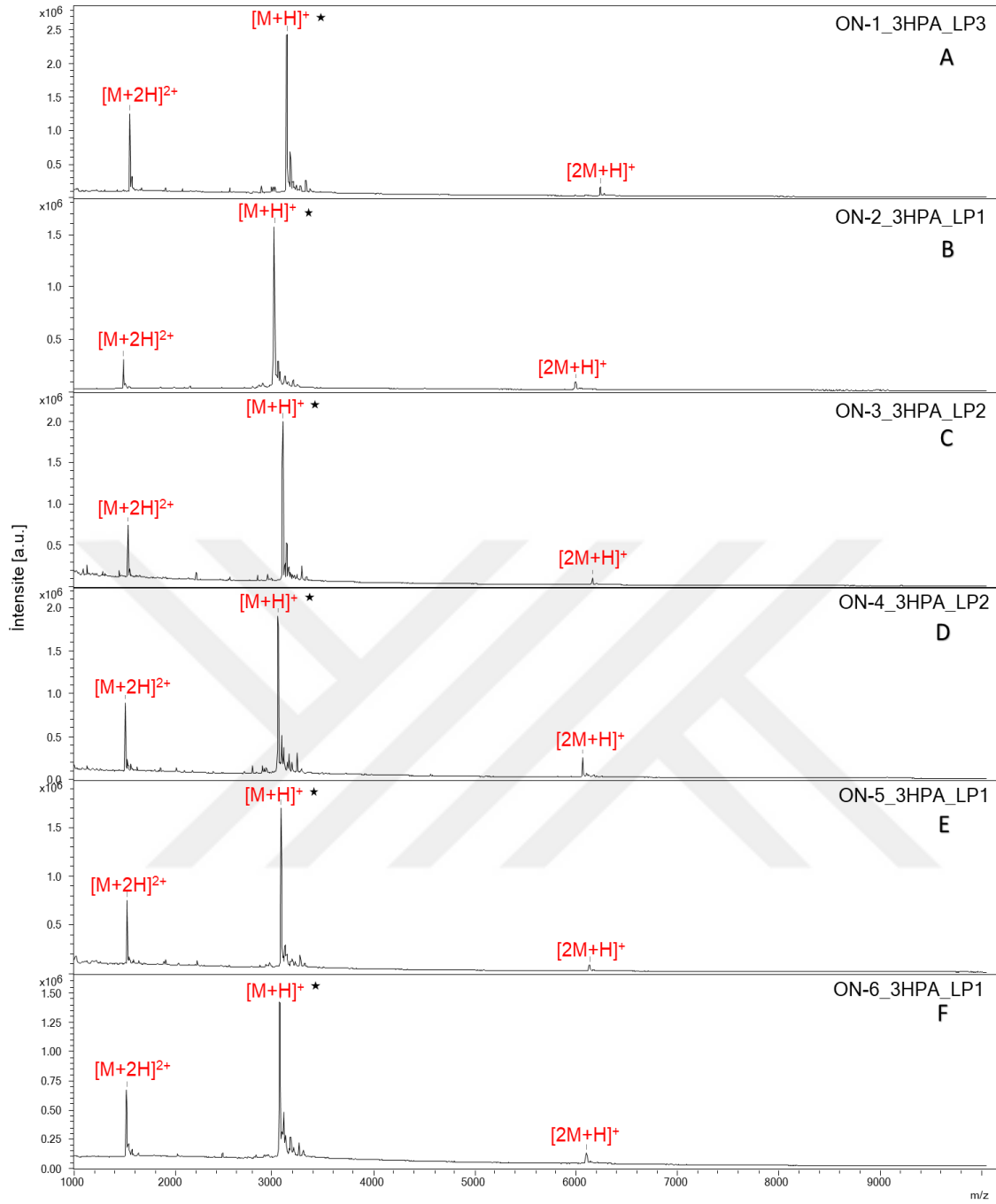
Çizelge 4. 4. Oligonükleotitlerin monoizotopik kütleleri ile protone olmuş, çift yüklü ve dimer iyonlarına ait m/z değerleri.

Oligonükleotit kodu	Monoizotopik kütle, M	Protone olmuş iyon a ait m/z değeri, [M+H] ⁺	Çift yüklü iyon a ait m/z değeri, [M+2H] ²⁺	Dimere ait m/z değeri, [2M+H] ⁺
ON-1	3090,56	3091,57	1546,29	6182,13
ON-2	2961,53	2962,54	1481,77	5924,07
ON-3	3051,55	3052,56	1526,78	6104,11
ON-4	3002,53	3003,54	1502,27	6006,07
ON-5	3034,56	3035,57	1518,29	6070,13
ON-6	3016,54	3017,55	1509,28	6034,09
ON-7	1791,34	1792,35	896,68	3583,69
ON-8	1791,34	1792,35	896,68	3583,69
ON-9	1871,36	1872,37	936,69	3743,73
ON-10	1711,33	1712,34	856,67	3423,67
ON-11	1766,34	1767,35	884,18	3533,69
ON-12	1815,35	1816,36	908,68	3631,71
ON-13	3546,61	3547,62	1774,31	7094,23
ON-14	3742,68	3743,69	1872,35	7486,37

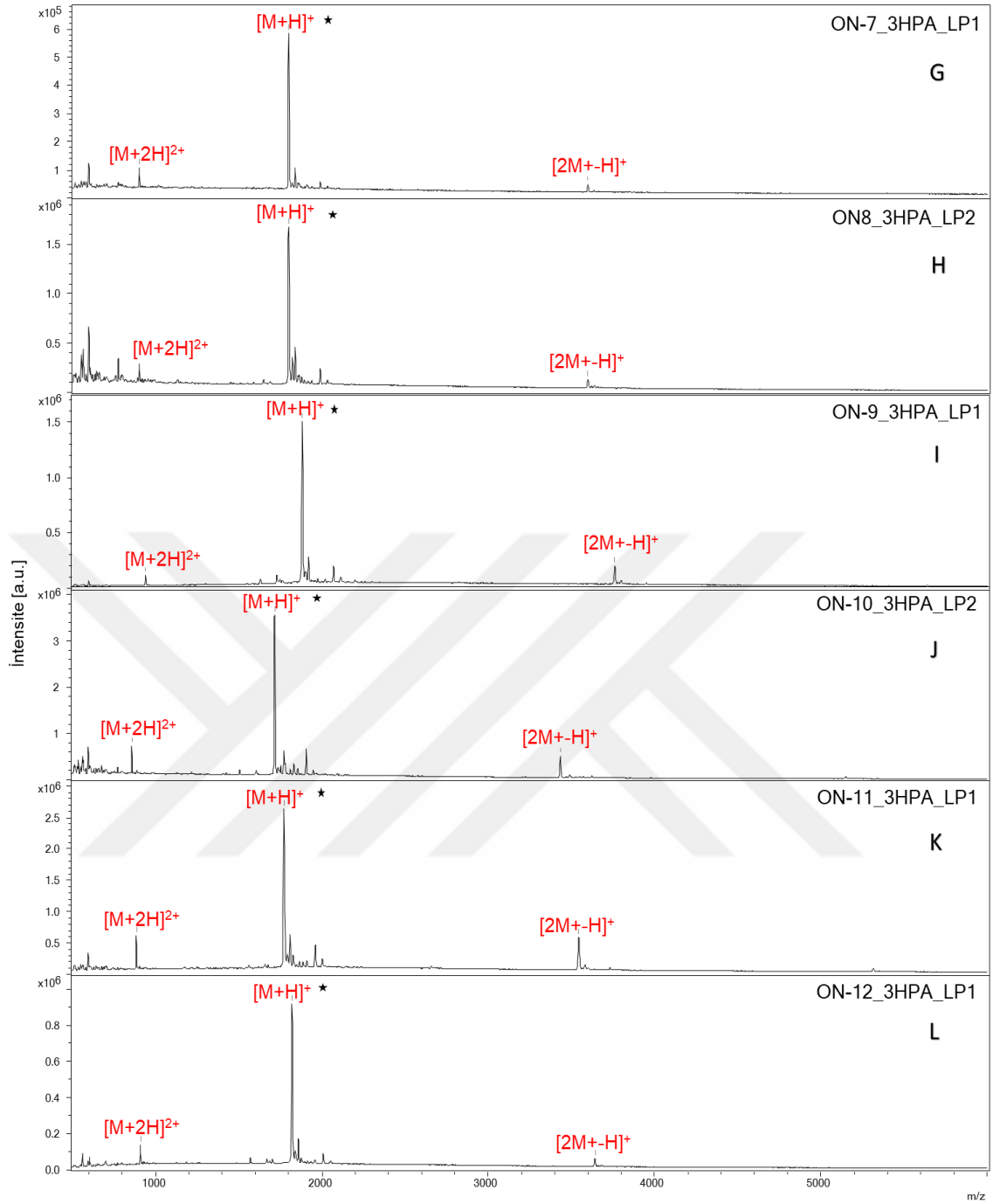
Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'ların karakterizasyonlarının MALDI kütle spektrometresi ile yapılan analizleri sonucunda elde edilen spektrumlarda katyon katılmalarına ait sinyallerin de bulunduğu, bu durumun ayırıcılık ve sinyal şiddetini azalttığı, ayrıca pik genişlemelerine sebep olduğu görülmüştür. Kütle spektrometrik analizlerde katyon katılma mekanizmasının ortamdaki nükleik asit yapısı ile katyonların gaz fazındaki çarpışmaları sonucunda katyonun elektronca zengin olan bölgeye tutunarak yapıya katılım yaptığı düşünülmektedir. Ortamda katyon katılmasına sebebiyet verecek

ajanların bulunmaması durumunda ise bu katılmalar kullanılan deney malzemeleri, yapının safsızlığı vb. yoluyla da kaynaklanabilmektedir [159].

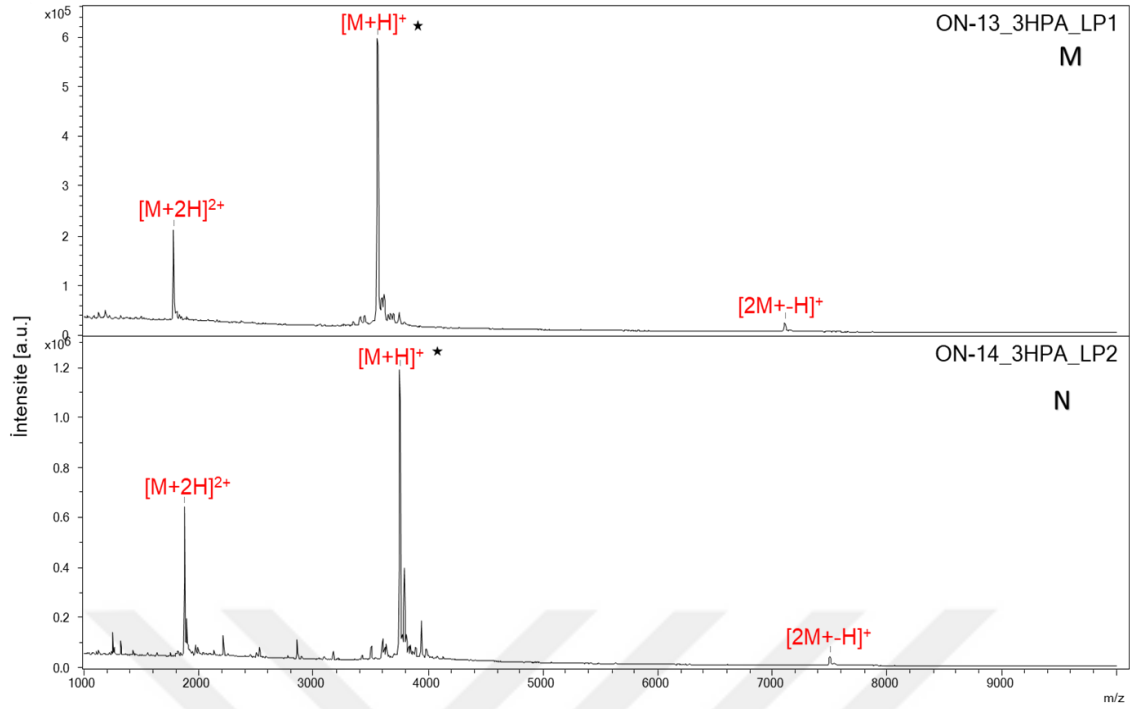
Kütle spektrometrik sistemlerde ortama amonyum eklenmesiyle katyon katılmalarının önüne geçildiği bilinmektedir. Nükleik asit-boya etkileşimlerinin incelendiği deneysel çalışmalarda gerek bu sebeple gerekse nükleik asit-boya etkileşimlerinin fizyolojik koşullarda araştırılması amacıyla inkübasyon ortamı olarak pH=7.0'da amonyum asetat tamponu seçilmiştir. Katyonik moleküller için DNA omurgası boyunca anyonik fosfodiester gruplarına elektrostatik çekim mümkündür [27]. Amonyum iyonu, nükleik asit yapısındaki fosfat gruplarıyla bağlanmış olan alkali metal katyonlarının yerine geçerek bu katyonları yapıdan uzaklaştırır, gaz fazında ise bu amonyum iyonları amonyak olarak uçarak yapıdan ayrılmakta, böylelikle katyon katılmaları minimize edilmektedir. Ayrıca, incelenen spektrumlardaki piklerde, pik taban genişliğinin 10-20 m/z aralığında olduğu tespit edilmiştir. MALDI-MS'te lineer modda yapılan analizlerde yaklaşık 10-20 m/z arasında kütle kaymalarının meydana gelmesi mümkün olmaktadır. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen kütleler ile spektrumlarda hem kütle kaymaları hem de alkali metal katılmaları gözlenmiştir.



Şekil 4. 11. A)ON-1, B)ON-2, C)ON-3 D)ON-4, E)ON-5 ve F)ON-6 kodlu oligonükleotitlerin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler oligonükleotitlerin protone olmuş moleküler iyon pikine aittir).



Şekil 4. 11. G)ON-7, H)ON-8, I)ON-9, J)ON-10, K)ON-11 ve L)ON-12 kodlu oligonükleotitlerin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler oligonükleotitlerin protone olmuş moleküler iyon pikine aittir) (devam ediyor).



Şekil 4. 11. M)ON-13 ve N)ON-14 kodlu oligonükleotitlerin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler oligonükleotitlerin protone olmuş moleküler iyon pikine aittir) (devam ediyor).

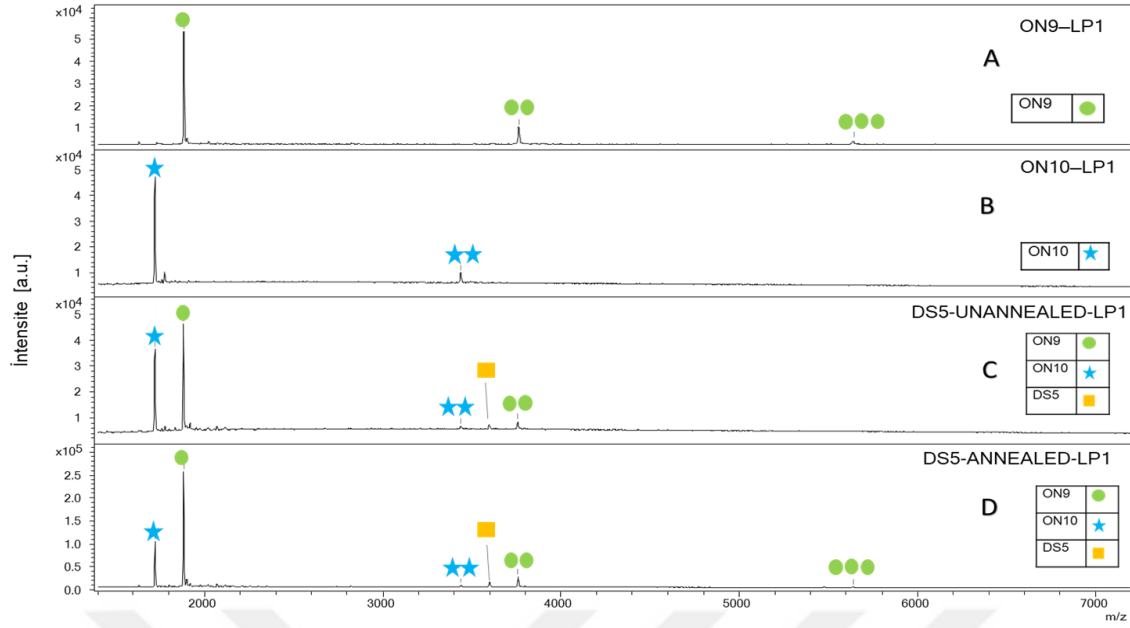
4.1.6. Tavlanma sürecinin (annealing process) çift iplik DNA oluşumu üzerinde etkisinin MALDI-TOF-MS ile analizleri

Çift iplik DNA oluşumunda tavlanma yönteminin etkisinin araştırılması amacıyla birbirlerinin tamamlayıcısı olan Çizelge 3.1’de dizilimleri ve molekül kütleleri belirtilen 100 pmol/µl stok çözeltilerinden deiyonize su ile seyreltilerek 5 pmol/µl derişimde hazırlanan ON-9 ve ON-10 oligonükleotit çiftleri eşit hacimde karıştırılarak çift iplik DNA oluşturulması amacıyla tavlanma işlemi (annealing process) uygulanmıştır. Bu çalışmada model olması açısından yalnızca DS-5 çift iplik DNA ile çalışılmıştır. Tavlanma işlemi için; eşit hacimde karıştırılan eşlenik oligonükleotitler 95°C’deki termomikser cihazında 5 dakika tutulmuştur. 5 dakika sonunda alınan karışım oda sıcaklığında kendi halinde 1 saatlik süre içerisinde kademeli soğumaya bırakılmıştır. 1 saatlik bekleme süresi sonrasında tavlanmış olan DS-5 kodlu çift iplik DNA ve tavlanma işlemi uygulanmadan eşit hacimde karıştırılarak hazırlanan DS-5 kodlu çift iplik DNA örnekleri 3-HPA (1:1 oranında on-spot) maldi maktriği kullanılarak MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Rapiflex MALDI Tissue typer™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve reflektör pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000

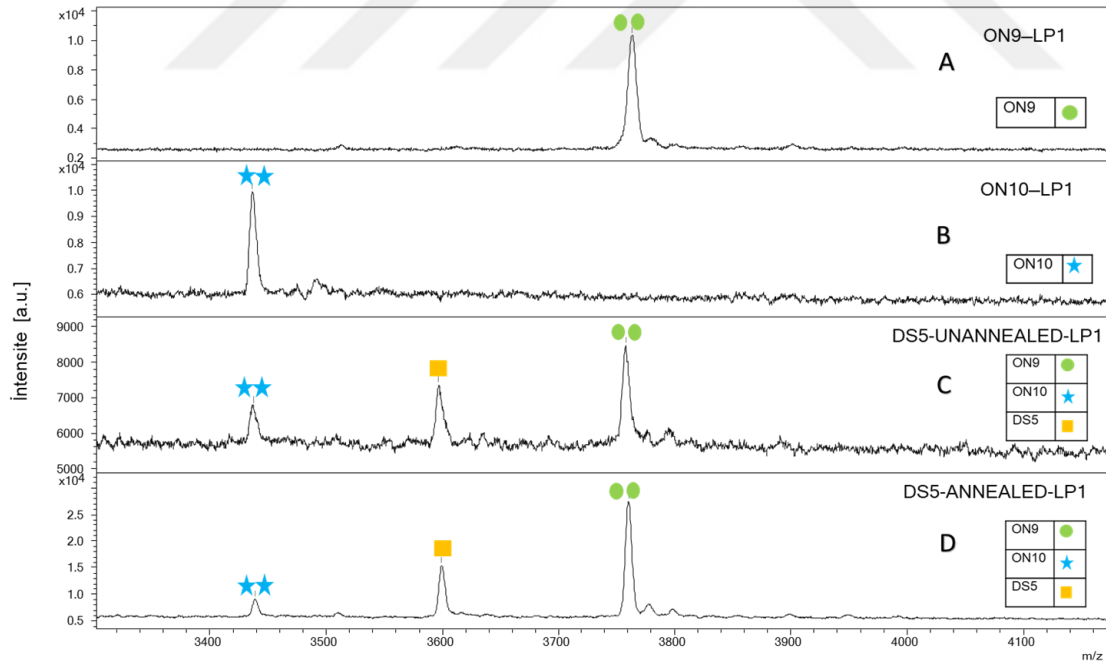
lazer vuruşu toplanarak karakterize edilmiştir. Pozitif iyon lineer modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

Spektrumlarda oligonükleotitlere ve çift iplik DNA'ya ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir. Şekil 4.12.A'da ON-9 kodlu oligonükleotit, B'de ON-10 kodlu oligonükleotit, C'de tavlammamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D'de tavlammış DS-5 kodlu çift iplik DNA'ya ait tam kütle spektrumlarına yer verilmiştir. A'da ON-9'un protone olmuş moleküler iyon piki ve B'de ON-10'un protone olmuş moleküler iyon pikine ait sinyal şiddetleri incelendiğinde her ikisinin de yaklaşık 5×10^4 civarında olduğu görülmüştür.

Şekil 4.13'te ise A'da ON-9 kodlu oligonükleotit, B'de ON-10 kodlu oligonükleotit, C'de tavlammamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D'de tavlammış DS-5 kodlu çift iplik DNA'ya ait 3300-41200 m/z aralığında genişletilmiş kütle spektrumlarına yer verilmiştir. C'de tavlammamış DS-5 yapısına ait spektrumda DS-5'e ait pik sinyal şiddetinin $7,362 \times 10^3$ olduğu ve D'de tavlammış DS-5 yapısına ait spektrumda DS-5'e ait pik sinyal şiddetinin ise $1,550 \times 10^4$ olduğu görülmüştür. Tavlammamış ve tavlammış DS-5'e ait sinyal oranlarının yaklaşık 2 olduğu hesaplanmış olup tavlanna yöntemi ile oluşan çift iplik DNA veriminin daha fazla olduğu yorumu yapılmıştır. C'de serbest haldeki ON-9 ve ON-10 kodlu oligonükleotitlerin intensitelerinin tavlammamış DS-5'e oranı sırasıyla 6,4 ve 5 olarak hesaplanmış D'de ise serbest haldeki ON-9 ve ON-10 kodlu oligonükleotitlerin intensitelerinin tavlammış DS-5'e oranı sırasıyla 16,6 ve 6,5 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde her iki yöntemle de ortamda çift zincir oluşumuna katılmamış serbest oligonükleotitlerin bulunduğu görülmüştür. Ancak tavlanna yöntemi ile oluşan çift zincir DNA veriminin tavlammamış DNA'ya göre verimi daha yüksektir. Buna sebep olarak ısıtma ve ardından kademeli olarak soğumaya bırakma işleminin hibritleşmeyi kolaylaştırdığı gösterilebilir.



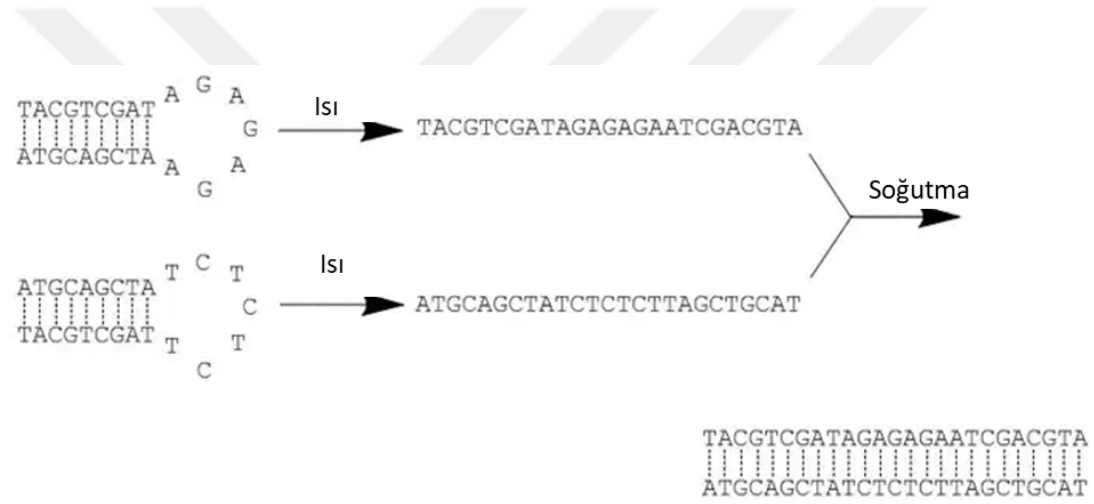
Şekil 4. 12. A)ON-9 kodlu oligonükleotit, B)ON-10 kodlu oligonükleotit, C)Tavlanmamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D)Tavlanmış DS-5 kodlu çift iplik DNA'ya ait hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4. 13. A)ON-9 kodlu oligonükleotit, B)ON-10 kodlu oligonükleotit, C)Tavlanmamış DS-5 kodlu çift iplik DNA ve D)Tavlanmış DS-5 kodlu çift iplik DNA'ya ait hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-

HPA matriks ile 3300-4200 m/z aralığında genişletilmiş lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.

Tavlanma sürecinde ısı ile tüm hidrojen bağları kırılır ve her bir oligonükleotitin içindeki herhangi bir ikincil yapı bozulur. Daha sonra yavaş ve kademeli soğutma işlemi ile birbirlerine eşlenik olan diziler arasında yeni hidrojen bağları oluşukça hibritleşme kolaylaşır. Literatürde tek iplik oligonükleotitlerden çift iplik DNA oluşumu için tavlanma sürecinin kullanıldığı birçok çalışma yer almaktadır [29],[160],[161]. Tez çalışması kapsamında da yapılan analizler sonucunda literatürle uyumlu olarak tavlanmış DNA yapısının daha verimli oluştuğu sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki deneylerde çift iplik DNA oluşturmak için tavlanma süreci uygulanmıştır.



Şekil 4. 14. Tavlanma reaksiyonuna bir örnek [162]

4.1.7. Çift iplik DNA'ların MALDI-TOF MS ile Karakterizasyonu

Çizelge 3.1'de dizilimleri ve moleköl kütleleri belirtilen ve 5 pmol/μl derişimde hazırlanan birbirinin tamamlayıcısı olan oligonökleotit çiftleri eşit hacimde karıştırlarak çift iplik DNA oluşturulması amacıyla tavlanma işlemleri uygulanmıştır. Tavlanma süreci sonunda oluşan çift iplik DNA yapıları 3-HPA (1:1 oranında on-spot) maldi maktriği kullanılarak MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve refletron pozitif/negatif iyon modlarında, ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak karakterize edilmiştir. Pozitif iyon lineer modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir. Spektrumlarda oligonökleotitlere ve çift iplik DNA'ya ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir. Lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.15'teki spektrumlar incelendiğinde;

A'da DS-1 kodlu çift iplik DNA'nın; $[M+H]^+$ protone olmuş iyon ve $[M+2H]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyaller,

B'de DS-2 kodlu DNA'nın $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller,

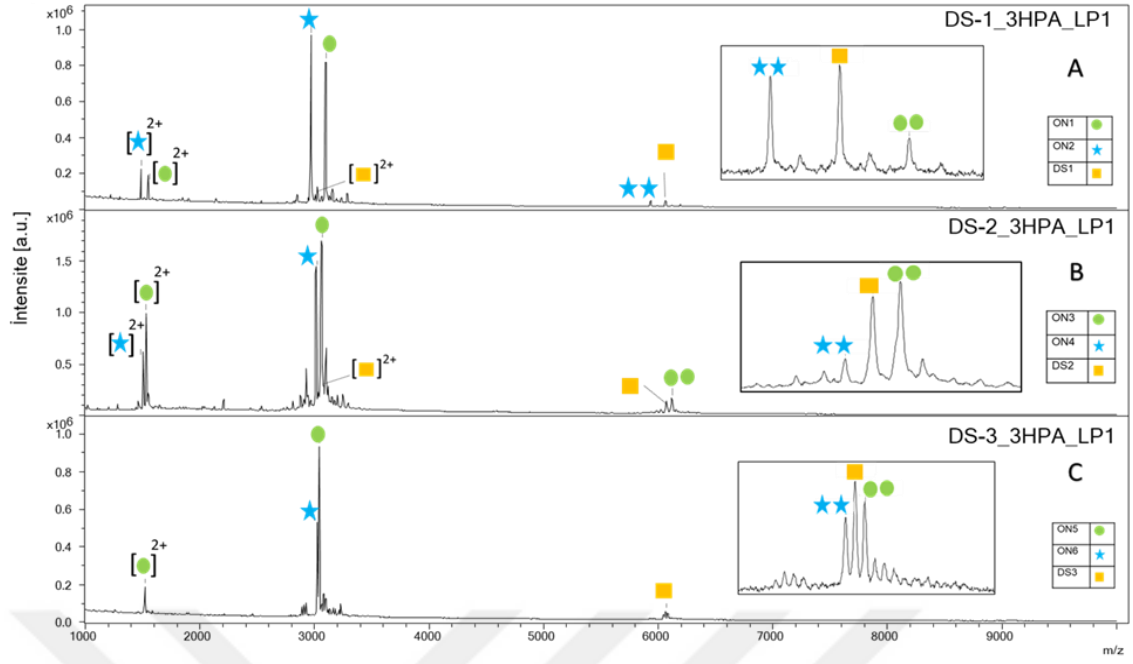
C'de DS-3 DNA'nın $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller,

D'de DS-4 DNA'nın $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller,

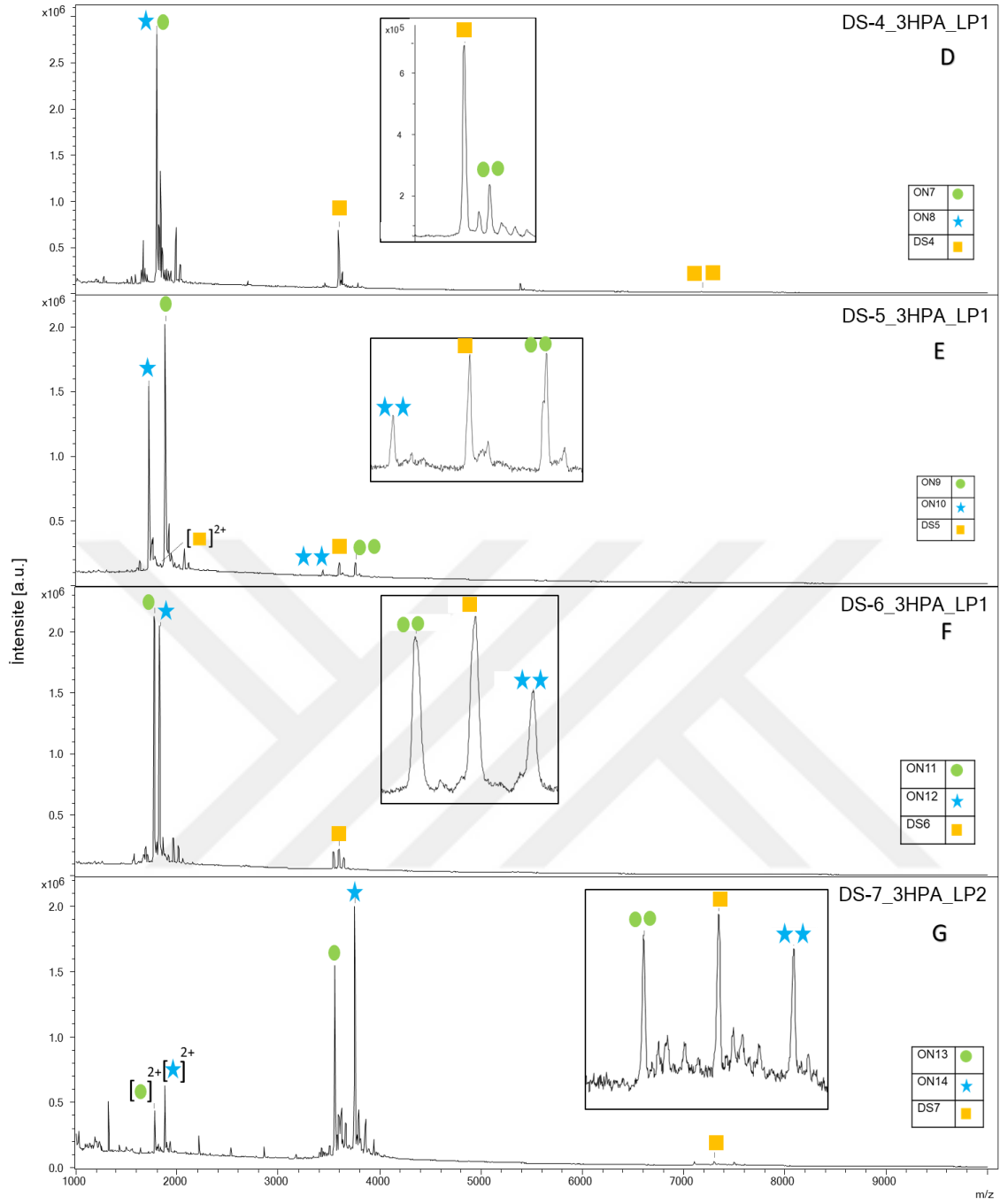
E'de DS-5 DNA'nın $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller,

F'de DS-6 DNA'nın $[M+H]^+$ iyonuna ait sinyaller,

G'de DS-7 DNA'nın $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller tespit edilmiştir.



Şekil 4. 15. A)DS-1, B)DS-2 ve C)DS-3 kodlu çift iplik DNA'ların hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler çift iplik DNA'ların protone olmuş moleküler iyon pikine aittir).



Şekil 4.15. D)DS-4, E)DS-5, F)DS-6 ve G)DS-7kodlu çift iplik DNA'ların hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (yıldız ile işaretli pikler çift iplik DNA'ların protone olmuş moleküler iyon pikine aittir) (devam ediyor).

Çift iplik DNA'ların; M monoizotopik kütlesi, $[M+H]^+$ protone olmuş iyonlarına ve $[M+2H]^{2+}$ çift yüklü iyonlarına ait m/z değerleri Çizelge 4.5'te topluca verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Çift iplik DNA'ların monoizotopik kütleleri ile protone olmuş ve çift yüklü iyonlarına ait m/z değerleri.

Çift iplik DNA kodu	Monoizotopik kütle, M	Protone olmuş iyon a ait m/z değeri, [M+H] ⁺	Çift yüklü iyon a ait m/z değeri, [M+2H] ²⁺
DS-1 (ON-1+ON-2)	6052,09	6053,10	3027,05
DS-2 (ON-3+ON-4)	6054,08	6055,09	3028,05
DS-3 (ON-5+ON-6)	6051,10	6052,11	3026,56
DS-4 (ON-7+ON-8)	3582,69	3583,70	1792,35
DS-5 (ON-9+ON-10)	3582,69	3583,70	1792,35
DS-6 (ON-11+ON-12)	3581,69	3582,70	1791,85
DS-7 (ON-13+ON-14)	7289,29	7290,30	3645,65

DNA yapısının bağlanma özellikleri, çift sarmalı oluşturan GC baz çiftlerinin yüzde oranına bağlı olarak değişmektedir. Yüzde olarak yüksek oranda guanin-sitozin baz çifti içeren çift sarmal DNA'daki iplikler birbirlerine G-C baz çiftleri arasındaki oluşan 3 hidrojen bağından dolayı daha kuvvetli şekilde bağlı olup oransal olarak daha yüksek adenin-timin baz çifti içeren kısa çift sarmal DNA'daki iplikler ise A-T baz çiftleri arasında oluşan 2 hidrojen bağından dolayı birbirleriyle daha zayıf etkileşirler [46]. DS-1 %50, DS-2 %70, DS-3 %40, DS-4 %67, DS-5 %67, DS-6 %50, DS-7 %67 oranında G-C içeriğine sahiptir. Spektrumlardan elde edilen çift iplik DNA'ların protone olmuş iyonlarına ait sinyal şiddetleri ve DNA'ların %G-C içeriği Çizelge 4.6.'da topluca verilmiştir.

Çizelge 4. 6. Çift iplik DNA'ların %G-C içeriği ve sinyal şiddetleri.

Çift iplik DNA kodu	Guanin-Sitozin içeriği, %	Protone olmuş iyon a ait sinyal şiddeti (~)
DS-1 (ON-1+ON-2) -10 baz çifti	50	5x10 ⁴
DS-2 (ON-3+ON-4) -10 baz çifti	70	1x10 ⁵
DS-3 (ON-5+ON-6) -10 baz çifti	40	1x10 ⁵
DS-4 (ON-7+ON-8) -6 baz çifti	67	7x10 ⁵
DS-5 (ON-9+ON-10) -6 baz çifti	67	2x10 ⁵
DS-6 (ON-11+ON-12) -6 baz çifti	50	2x10 ⁵
DS-7 (ON-13+ON-14) -12 baz çifti	67	5x10 ⁴

% G-C içeriği en fazla olan DS-2 kodlu DNA için molekül içi etkileşimlerin kuvvetlenmesinin etkisiyle daha kararlı yapı oluşması beklenirken sinyal şiddeti en yüksek DS-4 kodlu DNA için elde edilmiştir ancak DS-4'ü oluşturan oligonükleotitlerin molekül kütlelerinin aynı olması sebebiyle buradaki sinyalin hem DNA'ya ait iyonlardan hem de oligonükleotitlerin dimerlerine ait iyon sinyallerinin bileşkesi olduğu düşünülmüştür. DS-7'de %67 oranında G-C içeriği olmasına rağmen spektruma bakıldığında çift iplik DNA'ya ait sinyal ile DS-7'yi oluşturan oligonükleotitlerin dimerlerine ait sinyal şiddetlerinin neredeyse aynı olduğu görülmüş ve dimerler iyonlarının çift iplik DNA iyonlarını baskıladığı yorumu yapılmıştır. Benzer durumla DS-1, DS-2, DS-3, DS-5 ve DS-6 kodlu DNA spektrumlarında da karşılaşmıştır. Deneysel çalışmalarda, G-C içeriğinden bağımsız olarak yaklaşık aynı sinyal şiddetlerinin elde edildiği tespit edilmiş olup G-C içeriği kıyaslaması yapılarak DNA kuvveti ve kararlılığıyla ilgili kesin bir yorum yapılamamıştır.

Burada deneysel sonuçlara bakarak yalnızca G-C içeriği kıyaslaması yaparak DNA kararlılığı hakkında yorum yapmanın zor olmasından ziyade MALDI'de gaz fazı kararsızlığı ve lazer ışınının örneğin kararsızlığını artırması sebepleriyle de yüksek şiddette sinyaller elde edilememiş olabileceği de düşünülmüştür.

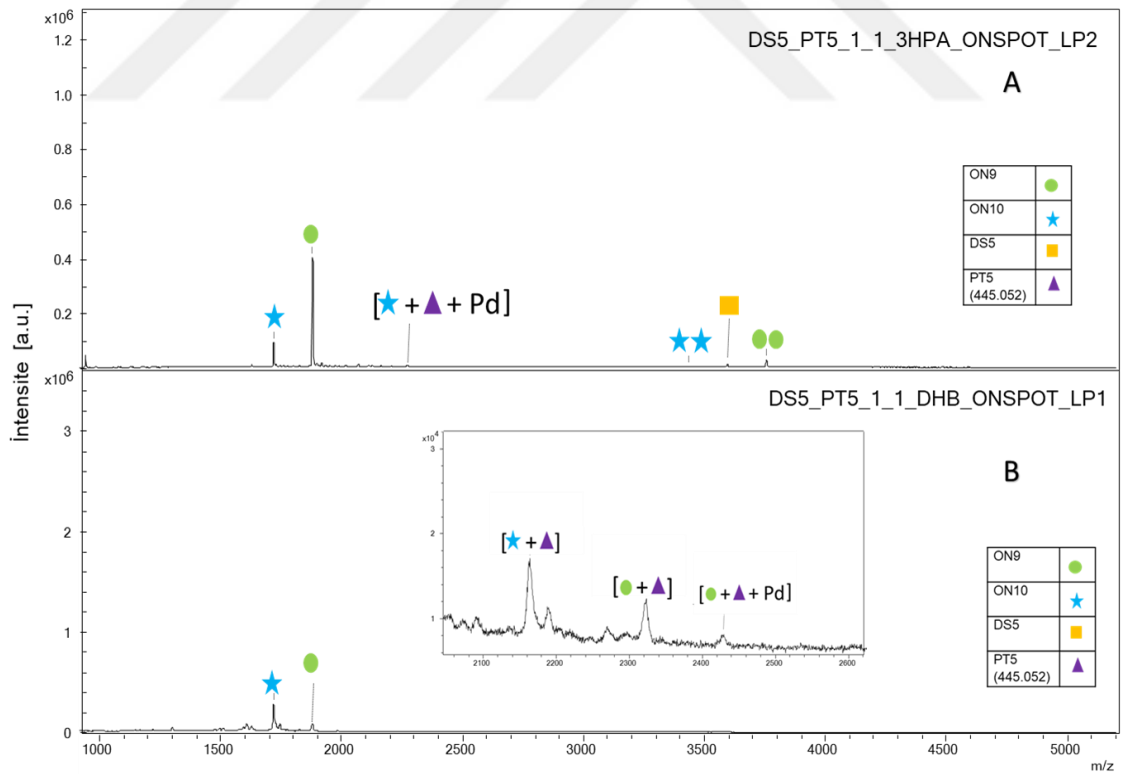
4.1.8. ON9 ve ON10 kodlu oligonükleotitlerin tavlanmasıyla oluşan DS5 kodlu çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi

Oligonükleotitlerin karakterizasyonu amacıyla yapılan analizlerde en iyi çalışan MALDI matriksinin 3-HPA olduğu belirlenmiştir. FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyalarla yapılan MALDI karakterizasyon çalışmalarında ise en uygun spektrumlar DHB matriksi ile elde edilmiştir. Burada oligonükleotit ve boyaların en iyi analiz edilebildiği koşullarda hazırlanarak etkileşim analizleri için optimum matriksin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ON-9 ve ON-10 kodlu oligonükleotitlerin tavlanmasıyla oluşan 5 pmol/μl DS-5 kodlu çift iplik DNA ile 5 pmol/μl derişimde boya çözeltileri hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve refletron pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

DS-5 ile FP-3 kodlu boya etkileşimi için lineer pozitif modda her iki matriks kullanılarak yapılan analizler sonucunda etkileşime ait sinyaller görülememiştir. Spektrumlarda yalnızca ON-9, ON-10, DS-5'e ait sinyaller bulunmakta olup spektruma burada yer verilmemiştir.

Diğer taraftan DS-5 ile PT-5 kodlu boya etkileşimine ait spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,051 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.16'daki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

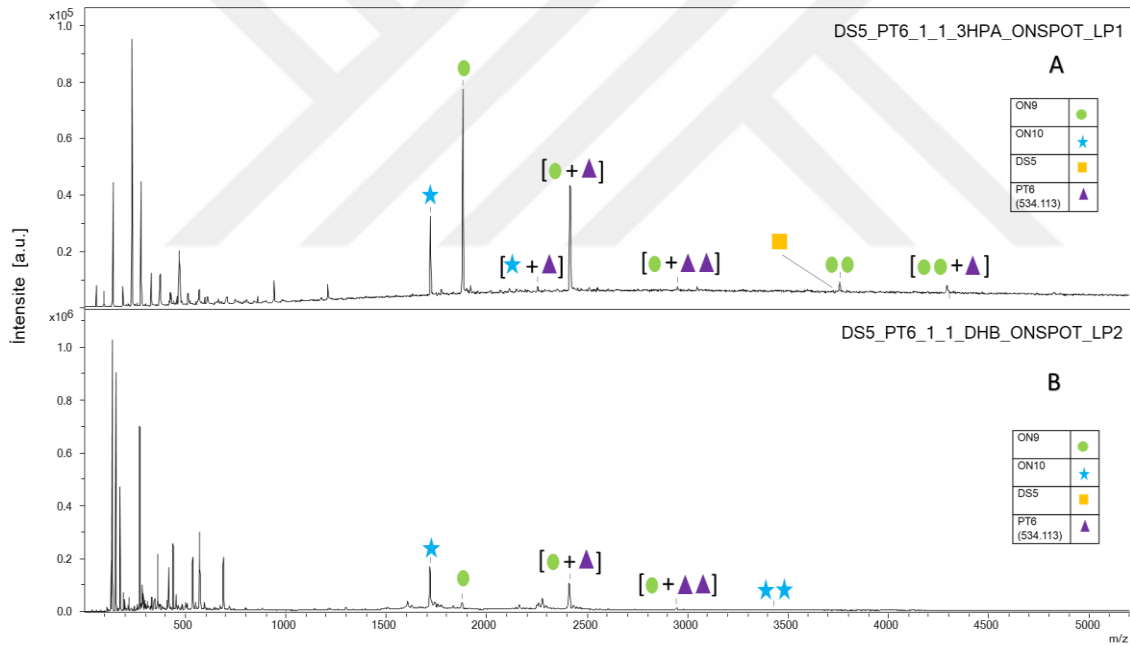
Şekil 4.16. A ve B incelendiğinde; A'da 3-HPA matriksi kullanılarak yapılan analizlerde ON-9, ON-10 ve DS-5'e ait sinyaller ile birlikte 1:1 stokiyometride ON-10 ile PT-5 etkileşimine ait sinyal olduğu, B'de DHB matriksi kullanılarak yapılan analizlerde ON-9, ON-10'a ait sinyaller ile birlikte 1:1 stokiyometride ON-9-PT-5 etkileşimi ve 1:1 stokiyometride ON-10-PT-5 etkileşime ait sinyaller olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 16. A) DS-5-PT-5 etkileşiminin 1:1 onspot 3-HPA matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) DS-5-PT-5 etkileşiminin 1:1 onspot DHB matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu.

Bir başka boya olan PT-6 kodlu boya ile DS-5 etkileşimleri için lineer pozitif modda analizler yapılmıştır. Buradaki spektrumlarda PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,113 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.17'deki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

Şekil 4.17. A ve B incelendiğinde; A'da 3-HPA matriksi kullanılarak yapılan analizlerde ON-9, ON-10 ve DS-5'e ait sinyaller ile birlikte 1:1, 1:2 ve 2:1 stokiyometride ON-9 ile PT-6 etkileşimine ait sinyal olduğu, 1:1 stokiyometride ON-10 ile PT-6 etkileşimine ait sinyal olduğu, B'de DHB matriksi kullanılarak yapılan analizlerde ON-9, ON-10'a ait sinyaller ile birlikte 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-9-PT-6 etkileşimine ait sinyaller olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 17. A) DS5-PT-6 etkileşiminin 1:1 onspot 3-HPA matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) DS5-PT-6 etkileşiminin 1:1 onspot DHB matriksi ile analizine ait lineer mod MALDI kütle spektrumu.

Deneyisel sonuçlar değerlendirildiğinde; nükleik asit-boya etkileşimleri sonucu oluşan iyonlara ait sinyallerin 3-HPA matriksi ile gözlenmesinin daha uygun olduğu ve DHB matriksi ile elde edilen sinyallere göre daha iyi ayırıcılık ve sinyal şiddetine sahip oldukları tespit edilmiştir. DHB matriksi kullanılan analizlerde analit iyonlarında katılmaların ve karmaşık sinyallerin daha az olması sebebiyle sinyal şiddeti uygun

spektrumlar elde edilmiş olsa da kütle ayırıcılığı 3-HPA'ya kıyasla daha az bulunmuştur. DHA matriksinin de bazı kısıtlamalar ile birlikte bu çalışmalarda kullanımının mümkün olduğu görülmüştür.

Bundan sonraki yapılacak MALDI kütle spektrometrik deneysel çalışmaların tümünde 3-HPA matriksi kullanılarak analit:matriks oranı 1:1 (hacimce) olan on-spot yöntemiyle



4.2. Etkileşim

4.2.1. Kütle Spektrometrik Analizler

Tez çalışmasının bu kısmında bağlanma stokiometrisini karakterize etmek, seçici ve seçici olmayan bağlanmaları ayırt etmek ve perilen diimit türevi ve Pt(II) ve Pd(II) metalleri içeren benzimidazol türevi yapıların nükleik asitler ile etkileşimlerinin bağlanma modlarını belirlemek amacıyla bir tarama aracı olarak kütle spektrometrik analizlerin faydalarından yararlanılmıştır.

4.2.1.1. Oligonükleotitler ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin kütle spektrometrik analizleri

4.2.1.1.1. ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boya etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri

Eşit derişimde ve hacimce 1:10 oranında hazırlanan ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla; 214,635 pmol/μl derişimdeki ON-15 stok çözeltisinden ve 320,360 pmol/μl derişimdeki ON-16 stok çözeltisinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 5'er pmol/μl oligonükleotit çözeltileri hazırlanmıştır. Daha önce 1,0 mg/ml (metanol) derişimde hazırlanan stok FP-3 boya çözeltisinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 5 pmol/μl derişimde boya çözeltisi hazırlanmıştır. Hacimce (1:10) oranında oligonükleotit:boya karıştırılarak 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer pozitif modda ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir.

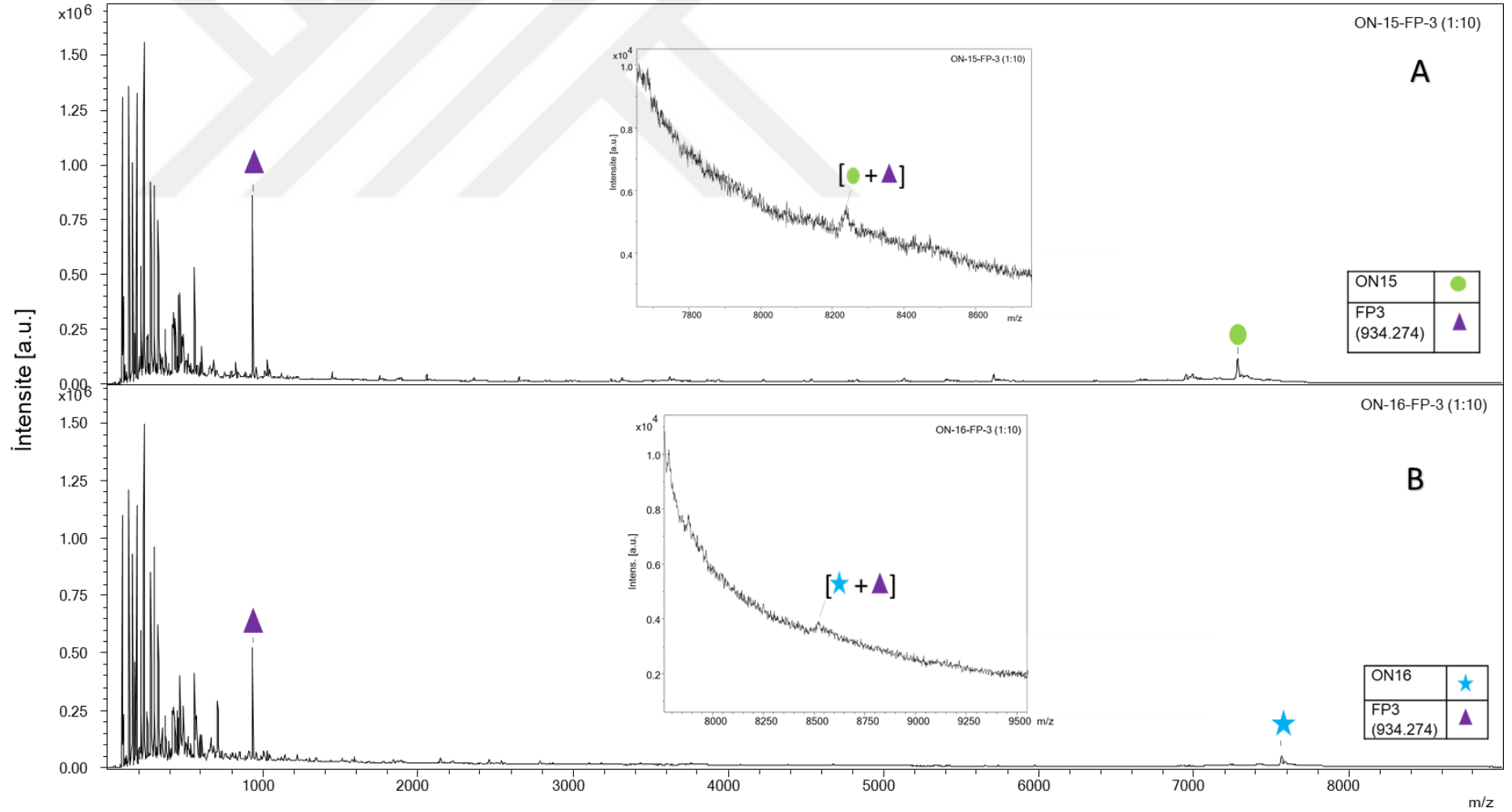
ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimi sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.18'deki spektrumlarda; oligonükleotitlere, FP-3'e ve bunların etkileşimlerine ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir.

-A'da yer alan ON-15-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; ON-15 kodlu oligonükleotide 2 sodyum katılması ve 1 proton ayrılmasıyla oluşan $[ON-15+2Na^+-H^+]^+$ yapısına ait sinyal ve protone olmuş haldeki FP-

3 iyonuna ait sinyal ile ON-15 ve FP-3'ün etkileşimine ait $[\text{ON-15}+2\text{Na}^+-\text{H}^++\text{FP-3}+\text{NH}_4^+-\text{H}^+]^+$ iyonuna ait sinyaller gözlenmiştir.

-B'de yer alan ON-16-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda ON-16 kodlu oligonükleotide 1 proton, 1 klor ve 1 amonyum katılmasıyla oluşan $[\text{ON-16}+\text{H}^++\text{NH}_4^++\text{Cl}^-]^+$ yapısına ait sinyal ve FP-3'e proton katılmasıyla oluşan iyonun sinyal ile ON-16 ve FP-3'ün etkileşimine ait $[\text{ON-16}+2\text{NH}_4^++\text{Cl}^-+\text{FP-3}]^+$ iyonun sinyalleri gözlenmiştir.





Şekil 4. 18. A) ON-15-FP-3 (1:10, v:v) etkileşiminin ve B) ON-16-FP-3 (1:10, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.

Perilen diimit türevleri, hastalıkların erken teşhisinde ve antikanser ve antibakteriyel etkilerde büyük potansiyel göstermektedir [20]. İn vivo deneyler, perilen diimitlerin normal hücreler üzerinde daha az yan etki ile kanser hücrelerini ve tümörleri baskılamak için iyi bir kapasiteye sahip olduğunu desteklemektedir [21]. Ancak perilen dimit yapılarının potansiyel dezavantajı, hücre görüntüleme uygulamalarını sınırlayan perilen kromoforlarının kümelenmesi ve çökmesi (agregasyonu) nedeniyle zayıf çözünürlük ve çok zayıf floresans göstermeleridir [30],[32]. Düzlemsel aromatik yapı π - π istiflenme etkileşimleri yoluyla kümelenme eğilimine sahiptir. Bununla birlikte, perilen tetrakarboksilik asit diimit türevlerinin yük içermesi durumunda elektrostatik yükler arasındaki itici etkileşimler, kümeleşme eğilimini azaltır [163]. Perilen dimitlerin polar çözücülerde çözünürlüğünün olmaması bu yapıların biyolojik ve tıbbi alanlarda kullanımını engellemektedir. [21],[22]. Hastalıkların erken teşhisinde daha yaygın olarak kullanılması için doku ve hücrelerin detaylı görüntüleme yeteneğini geliştirmek amacıyla perilen diimitin suda çözünürlüğünün artırılması ve görüntüleme sinyalinin geliştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür [20]. Bir çalışmada 1-hidroksil-3,4,9,10- tetra(n-bütoksiloksikarbonil) perilen yapısı tasarlanmış ve perilen çekirdeğine bağlı karboksilik ester zincirinin perilen türevlerinin organik çözücülerdeki çözünürlüğünü artırdığı tespit edilmiş olmasına rağmen perilen dimit türevlerinin sudaki çözünürlüğünün halen düşük olduğu rapor edilmiştir [30].

Bağlanma seçiciliğinin değerlendirilmesi yeni nesil anti-kanser ilaçlarının tasarımında kritik bir konudur. Seçiciliği değerlendirmek için dizilimleri birbirinden farklı (değişken G ve A baz dizilimine sahip) ON-15 kodlu (5' CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC 3') ve ON-16 kodlu (5' GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA 3') tek iplik oligonükleotitler kullanılmıştır. Bir perilen dimit türevi olan FP-3 kodlu boya ile tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda çözünürlük problemi sıklıkla karşımıza çıkmıştır. Düşük çözünürlükteki bu boya ile oligonükleotitlerin etkileşimlerinde FP-3 çözeltisinde deneysel çalışmaların hemen öncesinde gözle görülür şekilde çökmeler olduğu görülmüştür. Bu sebeplerle analizlerin hemen öncesinde FP-3 çözeltileri dikkatlice vortekslenmiş ve katıdan çözme işlemlerinde FP-3 çözeltisi ısıtma işlemine maruz bırakılmıştır. FP-3 boyası, sulu çözeltide hem monomer şeklinde hem de agregat şeklinde bulunmaktadır. Şekil 4.18.A ve B'deki etkileşim spektrumları incelendiğinde serbest halde bulunan perilen diimit türevi olan boyanın monomerlerinin veya agregatlarının yüksek şiddette (intensite) sinyal vermekte oldukları görülmüştür ($\sim 10^6$

mertebesinde sinyal şiddeti). Etkileşimlere ait sinyallerin ise göreceli olarak daha düşük şiddette oldukları ($\sim 4-6 \times 10^4$ mertebesinde sinyal şiddeti) tespiti yapılmıştır. İyonlaşma verimi yüksek olan moleküllerin etkileşim sinyallerini baskılamış olabileceği düşünülmektedir.

ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boyanın eşit derişimde ve hacimce 1:10 oranında hazırlanan, kovalent olmayan etkileşimlerinin incelendiği kütle spektrometrik analizler sonucunda; FP-3 kodlu boyanın her iki oligonükleotit ile 1:1 stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür. Ancak etkileşim şiddetleri oldukça düşüktür. Dizilimler ve spektrumlar incelendiğinde FP-3 boyasının bağlanma stokiyometrisinde kayda değer baz çifti seçiciliği göstermediği yorumu yapılmıştır. Bir çalışmada çift iplik DNA ile etkileşen 3 farklı perilen dimit analoglarının (PIPER, Tel11 ve Tel18 kodlu) 4:1, 3:1, 2:1 ve 1:1 bağlanma stokiyometrisine sahip kompleksler oluşturdıkları ve önemli bir baz çifti seçilimi göstermedikleri rapor edilmiştir [29].

Öte yandan küçük moleküllerin katyonik analogları ile DNA'nın fosfat omurgası arasındaki elektrostatik etkileşimlerin bir sonucu olarak dizilimden bağımsız olarak gelişen güzel şekilde (seçimsiz olarak) DNA'ya bağlanma gerçekleşebilir. Bu durumda FP-3 boyasının proton katılmış halinin oligonükleotitler ile baz diziliminden bağımsız, seçimsiz olarak elektrostatik etkileşime girmiş olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada Tel 11 ve Tel 18 kodlu perilen diimit analoglarının tek iplik DNA ile etkileştiği tespit edilmiş olup bu ligandların DNA yapısından bağımsız olarak gelişigüzel şekilde bağlandıkları rapor edilmiştir [29].

4.2.1.1.2. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri

Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla Çizelge 3.1'de dizilimleri ve molekül kütleleri belirtilen oligonükleotitlerin daha önce hazırlanan 100 pmol/μl stok çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 5'er pmol/μl oligonükleotit çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra birbirinin tamamlayıcısı olan oligonükleotit çiftleri eşit hacimde karıştırılarak çift iplik DNA oluşturulması amacıyla tavlama işlemi uygulanmıştır.

Daha önce 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan stok boya çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 5 pmol/µl derişimde FP-3, PT-5 ve PT-6 boya çözeltileri hazırlanmıştır. Oligonükleotit ve çift iplik DNA çözeltileri ile boya çözeltileri hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Rapiflex MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve reflektör pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir. Oligonükleotitlere, çift iplik DNA'lara, boyalara ve bunların etkileşimlerine ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir.

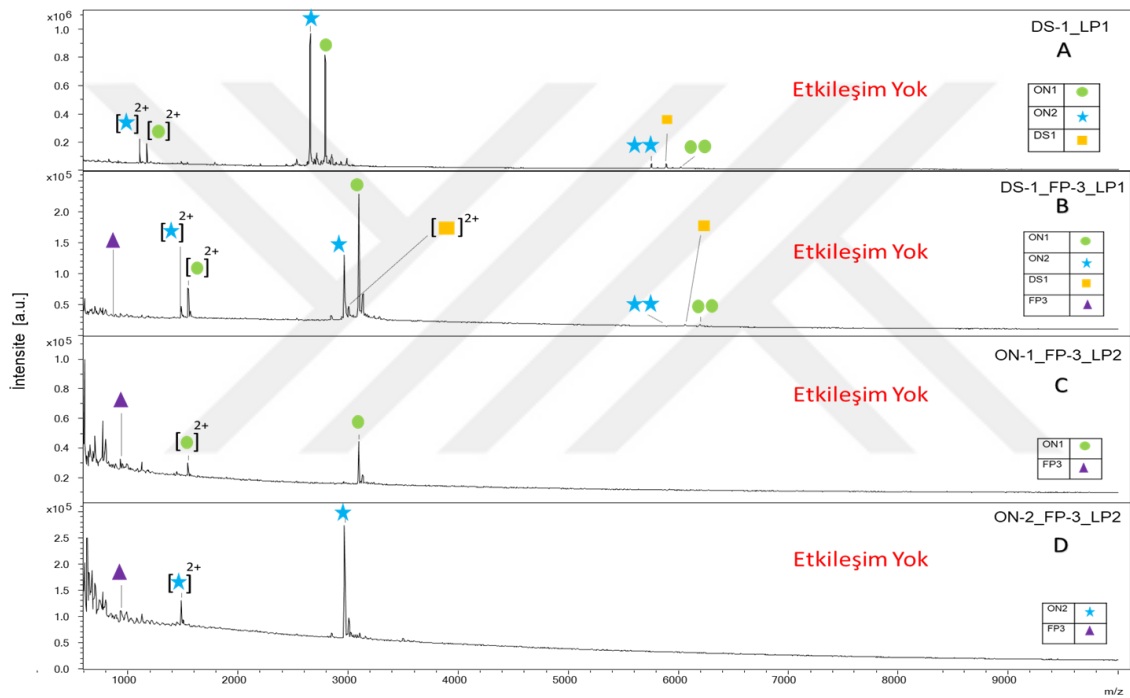
Bağlanma seçiciliğinin değerlendirilmesi yeni nesil anti-kanser ilaçlarının tasarımında kritik bir konudur. Seçiciliği değerlendirmek için dizilimleri birbirinden farklı ON-1'den ON-14'e kadar 14 tek iplik oligonükleotit ile boyaların etkileşimleri ve çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimleri incelenmiştir. ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'lar ile FP-3 kodlu boya etkileşimi için lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.19'daki spektrumlar incelendiğinde; FP-3 kodlu boyanın oligonükleotitler ve kısa çift iplik DNA'lar ile etkileşime girmediği görülmüştür. Spektrumlarda yalnızca tek iplik oligonükleotitler, çift iplik DNA'lar ve FP-3'e ait sinyaller görülmektedir. Burada yalnızca DS-1, DS-1-FP-3, ON-1-FP-3 ve ON-2-FP-3 etkileşimlerine ait spektrumlar verilmiştir. Diğer oligonükleotit-FP3 ve çift iplik DNA-FP-3 etkileşimlerine ait spektrumlar EK 1.2.'de verilmiştir.

Daha önce bahsedildiği üzere perilen dimit türevi olan FP-3 kodlu düşük çözünürlükteki boya ile oligonükleotitlerin etkileşimlerinde FP-3 çözeltisinde deneysel çalışmaların hemen öncesinde gözle görülür şekilde çökmeler olduğu görülmüştür. FP-3 boyasının düşük çözünürlüğünden kaynaklı olarak etkileşim gerçekleşmediği düşünülmektedir.

Perilen diimit türevlerinin uzun iplik nükleik asitler ile etkileşimlere girdiğini rapor eden çalışmalar nadiren bulunmaktadır [21]. DNA'yı oluşturan iplikler, baz çifti paketlemesinin verimliliğini üst düzeye çıkarmak için yaklaşık her on baz çiftinde bir tam dönüşle bir çift sarmal oluşturmak üzere birbirinin etrafında dolar ve iki ipliğin

birbirinin etrafına sarılması ile çift sarmalda iki yarık oluşur. Bu çalışmada kullanılan oligonükleotit iplikleri 6-10-12 baz biriminden oluşan kısa iplikler olup birbirlerinin tamamlayıcısı olan bu nükleik asitlerin eşleşmesiyle meydana gelen çift iplik DNA'nın çok kısa olmasından dolayı doğal rotasyonunu gerçekleştirememekte ve interkalatör olan FP-3 molekülünün çift sarmal arasına interkalasyon yapabilmesi için bir alan (majör yarık gibi) oluşturmamaktadır.

Analiz sonuçları ve kütle spektrumları değerlendirildiğinde yukarıda bahsi geçen nedenlerle FP-3 molekülünün hem kısa iplikli oligonükleotitler hem de kısa zincirli DNA'lar ile etkileşime girmediği yorumu yapılmıştır.

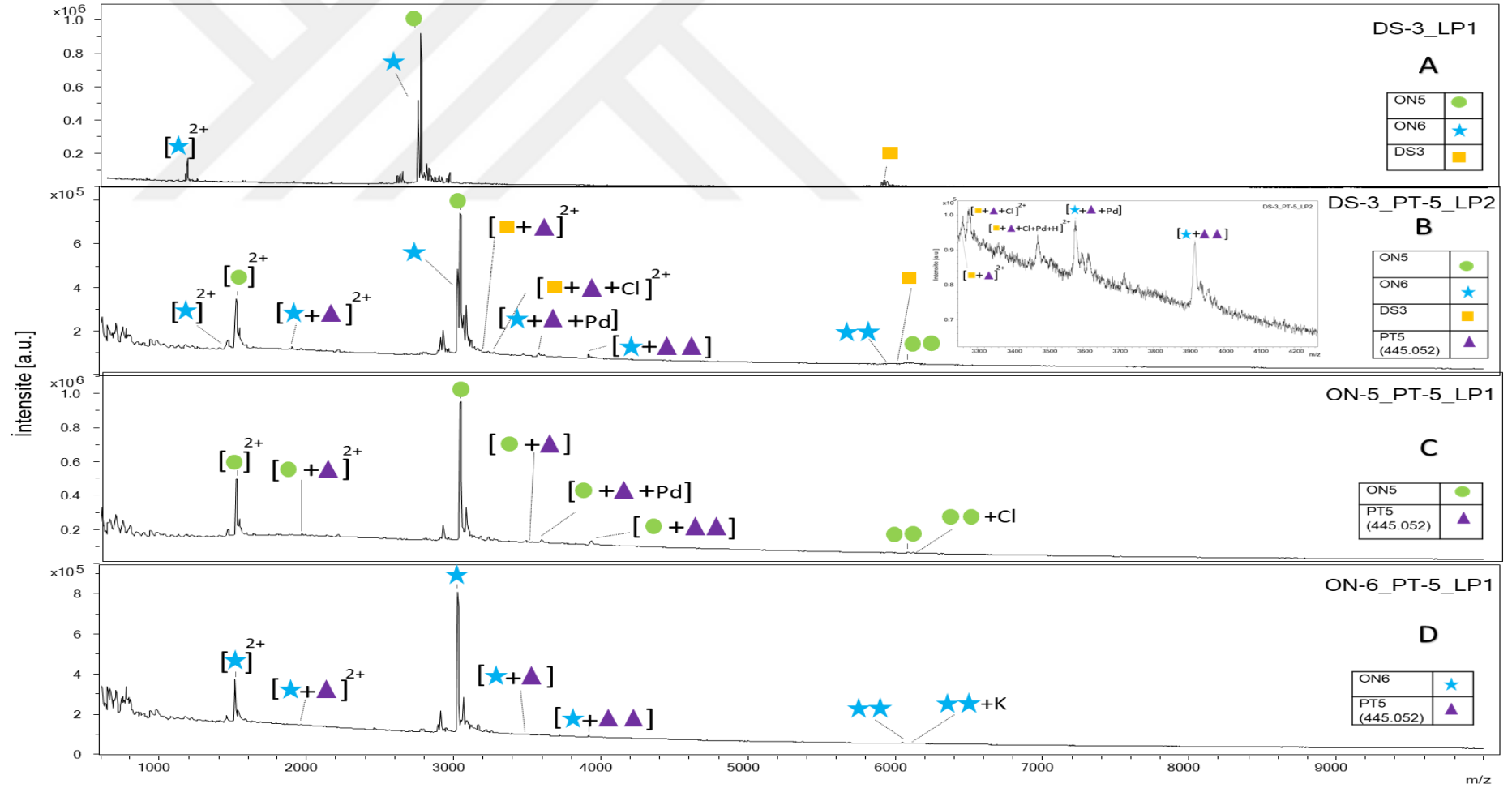


Şekil 4. 19. A)DS-1, B)DS-1-FP-3 etkileşimi, C)ON-1-FP-3 etkileşimi ve D)ON-2-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.

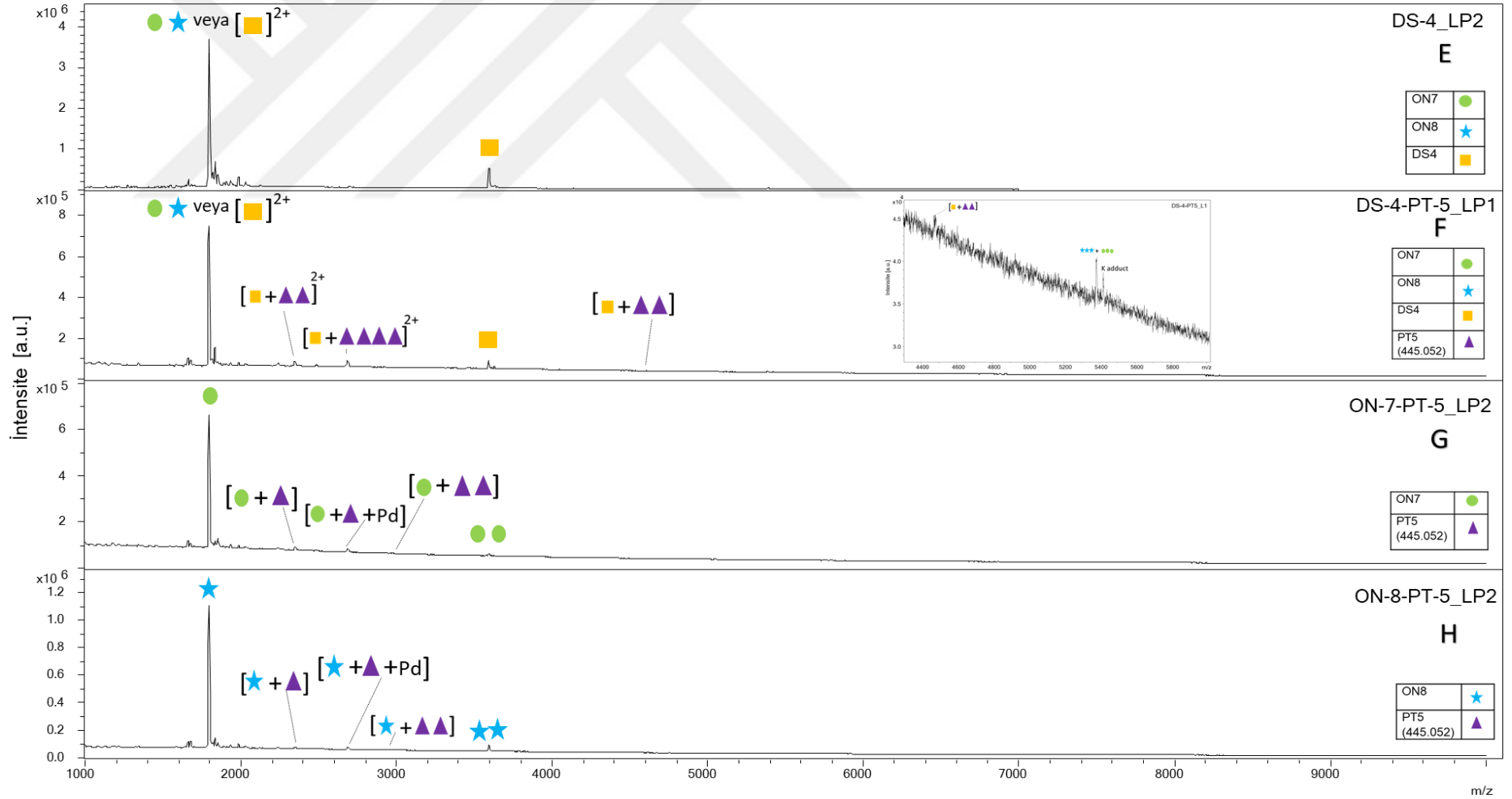
Diğer taraftan ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boya etkileşimi için lineer pozitif modda analizler yapılmıştır. Buradaki spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,05 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.20'deki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir. Burada yalnızca oligonükleotit-PT-5 ve çift iplik DNA-PT-5 etkileşimi görülen spektrumlara yer verilmiştir. Diğer oligonükleotit-PT-5 ve çift iplik DNA-PT-5 etkileşimlerine ait spektrumlar EK 1.3.'te verilmiştir.

Şekil 4.20. A, B, C ve D incelendiğinde; A'da ON-5, ON-6 ve DS-3'e ait sinyaller olduğu, B'de 1:1 stokiyometride DS-3 ile PT-5 etkileşiminin +2 yüklü iyonuna ait sinyal ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-6-PT-5 etkileşimine ait sinyal olduğu, C'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-5-PT-5 etkileşimi olduğu, D'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-6-PT-5 etkileşimlerine ait sinyaller olduğu görülmüştür.

Şekil 4.20. E, F, G ve H incelendiğinde ise; E'de ON-7, ON-8 ve DS-4'e ait sinyaller olduğu, F'de 1:2 stokiyometride DS-4 ile PT-5 etkileşiminin ve bunun +2 yüklü iyonuna ait sinyaller olduğu, G'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON7-PT-5 etkileşimi olduğu, H'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-8-PT-5 etkileşimlerine ait sinyaller olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 20. A)DS-3, B)DS-3-PT-5 etkileşimi, C)ON-5-PT-5 etkileşimi ve D)ON-6-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



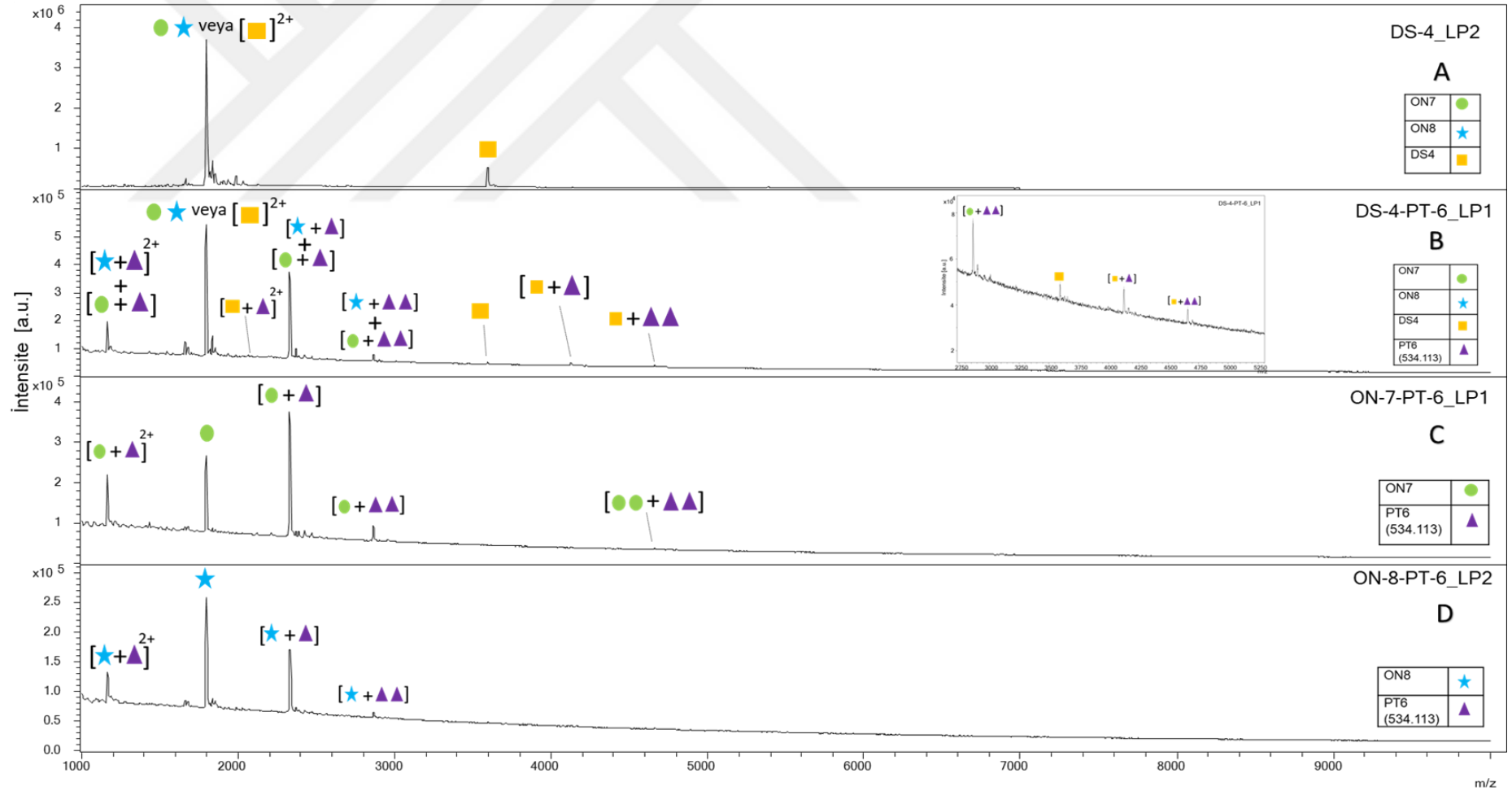
Şekil 4.20. E)DS-4, F)DS-4-PT-5 etkileşimi, G)ON-7-PT-5 etkileşimi ve H)ON-8-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile linear moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

Bir başka boya olan PT-6 kodlu boya ile ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'ların etkileşimleri için lineer pozitif modda analizler yapılmıştır. Buradaki spektrumlarda PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,11 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.21'deki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir. Burada yalnızca oligonükleotit-PT-6 ve çift iplik DNA-PT-6 etkileşimi görülen spektrumlara yer verilmiştir. Diğer oligonükleotit-PT-6 ve çift iplik DNA-PT-6 etkileşimlerine ait spektrumlar EK 1.4'te yer almaktadır.

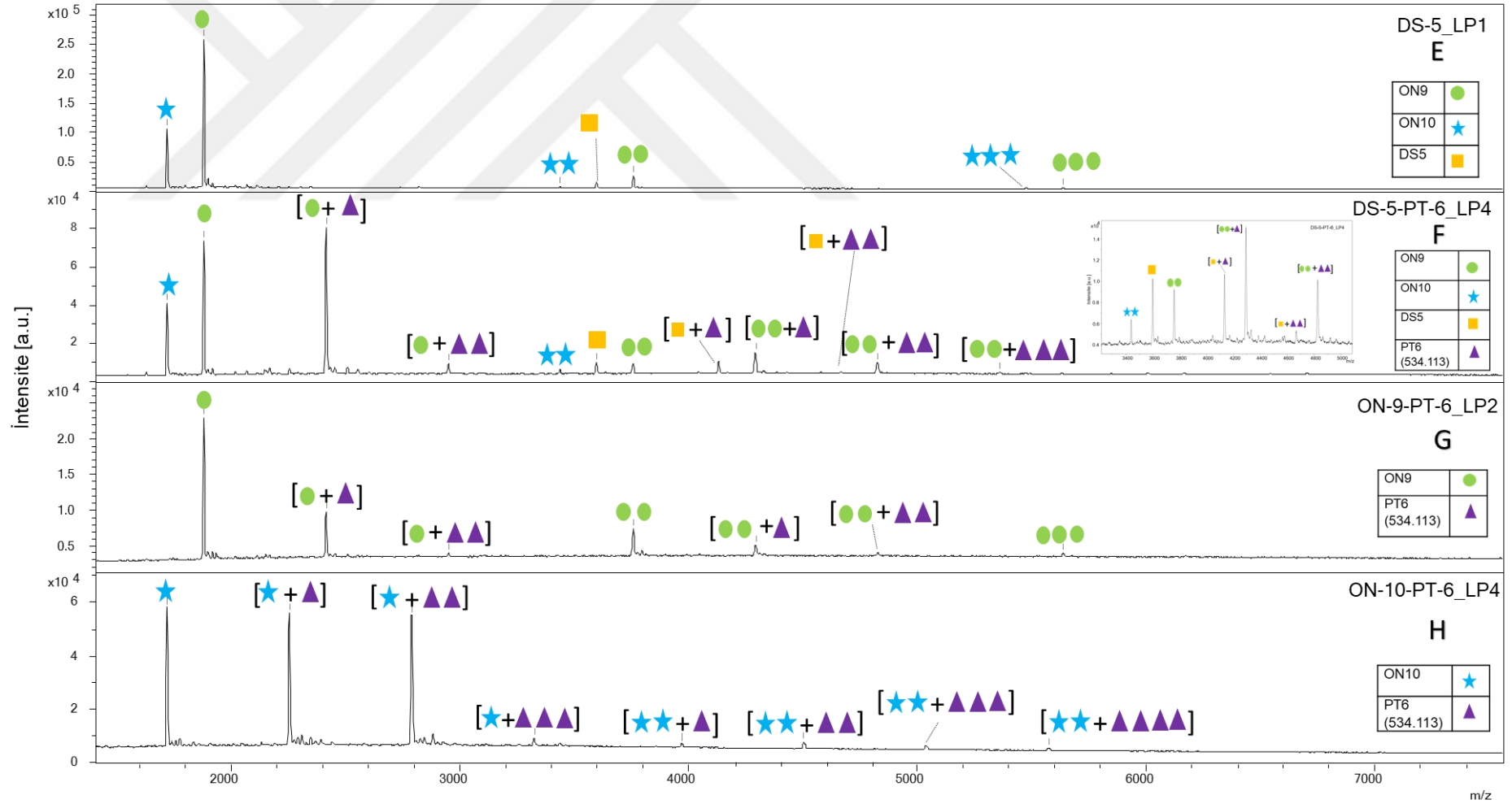
Şekil 4.21. A, B, C ve D incelendiğinde; A'da ON-7, ON-8 ve DS-4'e ait sinyaller olduğu, B'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride DS-4 ile PT-6 etkileşimlerinin olduğu, C'de 1:1, 1:2 ve 2:2 stokiyometride ON-7-PT-6 etkileşimleri olduğu, D'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-8-PT-6 etkileşimlerine ait sinyaller olduğu görülmüştür.

Şekil 4.21. E, F, G ve H incelendiğinde; E'de ON9, ON-10 ve DS-5'e ait sinyaller olduğu, F'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride DS-5 ile PT-6 etkileşimleri ile 1:1, 1:2, 2:1 ve 2:2 stokiyometride ON-9-PT-6 etkileşimleri olduğu, G'de 1:1, 1:2, 2:1 ve 2:2 stokiyometride ON-9-PT-6 etkileşimleri olduğu, H'de 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2:2, 2:3 ve 2:4 stokiyometride ON-10-PT-6 etkileşimlerine ait sinyaller olduğu görülmüştür.

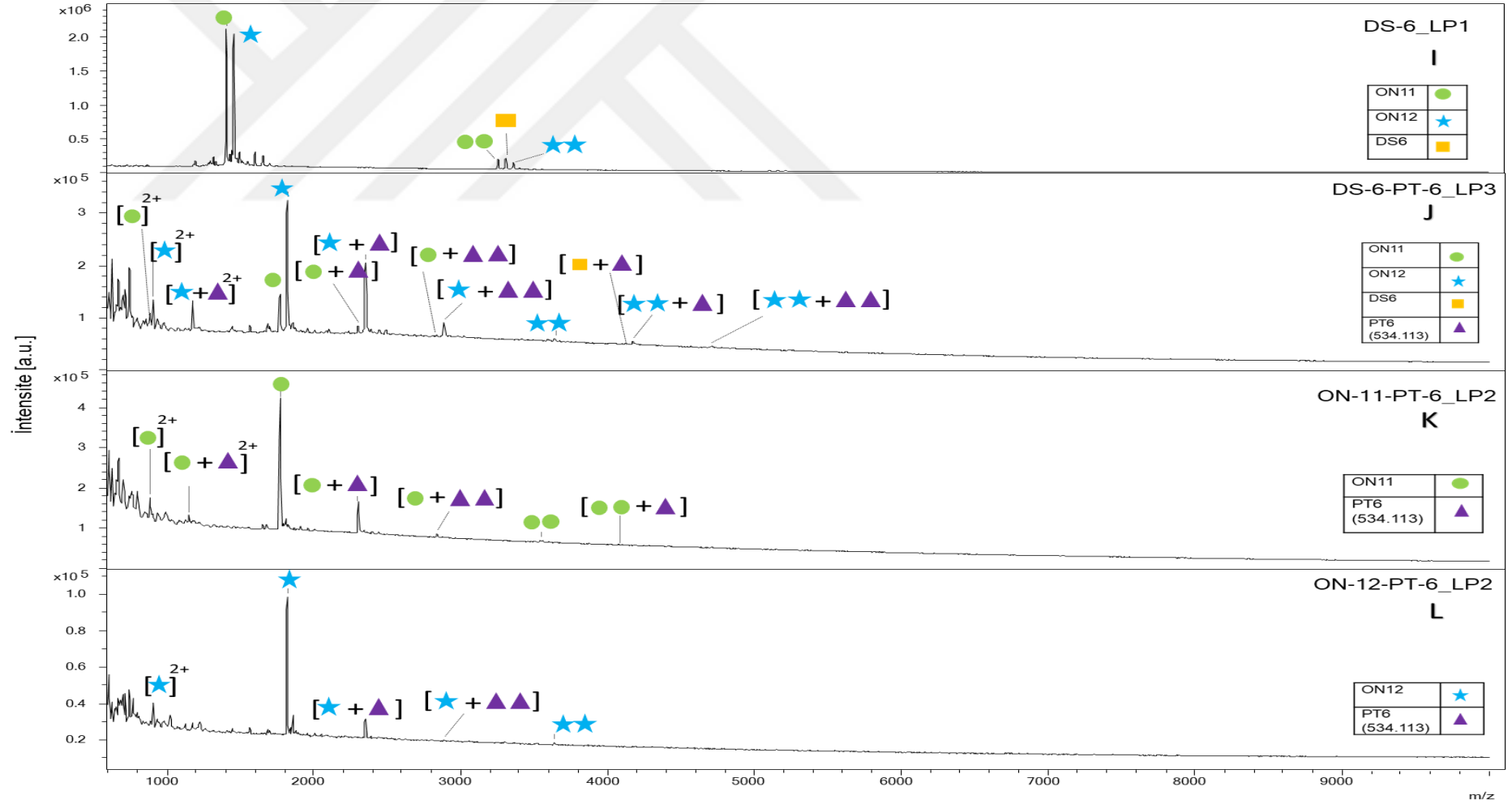
Şekil 4.21. I, J, K ve L incelendiğinde ise; I'da ON-11, ON-12 ve DS-6'ya ait sinyaller olduğu, J'de 1:1 stokiyometride DS-5 ile PT-6 etkileşimi ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-11-PT-6 etkileşimleri ve 1:1, 1:2, 2:1 ve 2:2 stokiyometride ON-12-PT-6 etkileşimleri olduğu, K'de 1:1, 1:2 ve 2:1 stokiyometride ON-11-PT-6 etkileşimleri olduğu, L'de 1:1, ve 1:2 stokiyometride ON-12-PT-6 etkileşimlerine ait sinyaller olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 21. A)DS-4, B)DS-4-PT-6 etkileşimi, C)ON-7-PT-6 etkileşimi ve D)ON-8-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4.21. E)DS-5, F)DS-5-PT-6 etkileşimi, G)ON-9-PT-6 etkileşimi ve H)ON-10-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



Şekil 4.21. I)DS-5, J)DS-5-PT-6 etkileşimi, K)ON-9-PT-6 etkileşimi ve L)ON-10-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile linear moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

Nükleik asitler, aday anti-tümör metaloilaçlar için kritik bir moleküler hedeftir. Elektron bakımından zengin fosfat omurgası, nükleobazlardaki verici heteroatomlar ve karmaşık ikincil ve üçüncül yapılar, hem “serbest” metal iyonları hem de kompleksler için potansiyel bağlanma ortamları oluşturmak üzere birleşirler. Tıbbi kimya bakış açısından, seçici olarak oligonükleotitleri ve spesifik oligonükleotit konformasyonlarını hedefleyen yeni ilaçlar geliştirmek için DNA-metal kompleks koordinasyonunu araştırmak gereklidir. Ayrıca, genetik bilginin depolanması ve dolayısıyla güvenilir hücre replikasyonuna aracılık için DNA çift sarmalının gerekliliği göz önüne alındığında, bu bağlantı noktasında biyo-oluşumun (biyogenez) kesintiye uğraması metal-ilaç keşfi için temel bir hedef sağlamaktadır [164],[165].

Benzimidazol yapısı, DNA nükleotitlerinin yapısında bulunan pürinlerle belirli bir kimyasal analogiye sahip olmaları sebebiyle avantajlı bir bileşik olup güçlü biyolojik aktivite sergileyerek nükleik asit sentezini engellemektedir. Benzimidazol ligandları ile metallerin kombinasyonu ve etki mekanizmaları klinik deneylerde çalışılan antikanser ilaçların tasarımında önemli faktörlerdir. Raporlanan sonuçlara göre koordinasyon komplekslerinin incelenen metal iyonundan bağımsız olarak benzimidazol ligandına göre sitotoksik veya hücre büyümesini engelleyen (antiproliferatif) aktiviteyi her zaman arttırdığı gözlenmiştir. Koordinasyon kompleksleri ile ilgili olarak metal içerikli ilaçların tasarlanmasındaki en önemli noktalar çözünürlük, küresel yük (katyonik bileşikler nötr bileşiklere nazaran daha iyi sitotoksik etki göstermektedir), yapı ve geometridir (kare-düzlemsel ve kara-piramidal bileşikler tetrahedral, trigonal ve oktahedral bileşiklerden daha fazla sitotoksik aktivite göstermektedir). İlaç tasarımında metal merkezi ile ilgili olarak anahtar noktalar ise metalin yükseltgenme durumu, metal iyonunun boyutu ve elektronik konfigürasyonudur. Antikanser ilaçların aktivitesi genel olarak, ikinci sıra geçiş metalleri için rutenyum>paladyum>gümüş>rodyum ve üçüncü sıra geçiş metalleri için platin>altın>iridyum>osmiyum eğilimindedir [15].

Literatürdeki çalışmalarda incelenen koordinasyon komplekslerinin etki mekanizmalarının rapor edilmediği ancak benzimidazol ligandı ve metal merkezinin doğru seçiminin er ya da geç kansere karşı mücadelede anahtar bir bileşik bulunmasına yol açacağı konusunda ortak görüş bulunmaktadır. Cis-platin haricinde klinik deneylerdeki de dahil olmak üzere diğer metaloilaçların etki mekanizmaları tam olarak tanımlanamamıştır. Bununla birlikte; reaktif oksijen türleri oluşumu (reactive oxygen

species generation-ROS üretimi), interkalasyon ve eklenti/katılma oluşumu, enzim inhibisyonu gibi olası üç mekanizmanın olabileceği düşünülmektedir. Bunun nedeni olarak metaloilaçlar hücreye girdiğinde ve nükleik asitler, proteinler, fosfolipitler, glutatyon veya metalotiyoninler gibi hücre sel bileşenlerle reaksiyona girdiği ve sonuç olarak apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açtığı için geçiş metali koordinasyon komplekslerinin en önemli terapötik hedefleri etkisiz hale getirmek üzere tasarlanmış olmaları gösterilmektedir [15].

Cis-platin, cis-diamindiklorplatin(II) yapısı testis, yumurtalık, mesane, akciğer, mide gibi çeşitli kanser türlerinde dikkate değer bir kematerapötik potansiyel sergileyen en etkili antikanser ajanlarından biridir. Bir antitümör ilaç olarak cis-platinin başarısı, daha iyi farmakolojik özelliklere sahip yeni metal komplekslerinin arayışını motive etmiştir. Uzun zamandır platin kimyasının ana hedefi cis-platin ve türevlerinden daha az ciddi yan etkiye sahip veya cis-platine dirençli tümörlerin tedavisi için geniş bir kapsama sahip yeni ilaçların tasarımına yönelmiştir. Bu amaçla yeni ilaç tasarımında a) cis-platin analoglarının sentezi veya doğrudan modifikasyonu, b) platinden farklı diğer metallerin kullanımı, c) metal iyonlarına koordine edilen bilinen maddelerin veya aktif organik ilaçların kullanımı şeklinde üç ana yaklaşım ortaya çıkmıştır.

Paladyum (II) türleri, çözültide iyi bir model olarak bulundukları için platin (II) analoglarının bağlanma özelliklerini taklit etmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Paladyum (II)'nin alifatik aminler ile koordinasyon bileşiklerinin bulunması üzerine π vericileri olarak hareket eden ve π alıcıları olarak işlev gören aromatik heterosikliklerle de çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. π alıcı özellikleri sayesinde aromatik heterosiklik yapılar pürin ve pirimidin bazlarıyla π - π istiflenmesi yoluyla DNA ile kompleksleşmeyi iyileştirmekte ve ilaç etkinliğini artırmaktadır. Azot heterosikliklerinin birçok doğal ve sentetik molekülle benzerlikleri nedeniyle farmakolojik aktivite sergilediği ve bu yapısal benzerlik nedeniyle canlı sistemlerin biyomolekülleri ile kolayca etkileşime girebildikleri bilinmektedir [19]. (1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)-methamine ligandı ile paladyum (II)'nin kükürt ve azot vericileri gibi yardımcı ligandlar ile koordinasyon komplekslerinin oluşumunun incelendiği bir çalışma literatürde yer almıştır [15]. Terpiridin (tpy) ve türevleri, çok çeşitli geçiş metali komplekslerinde ve DNA bağlayıcı ajanlarda ligandlar olarak hareket etme yeteneklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Ayrıca bir dizi insan kanser hücre hattına karşı sitotoksikite sergilemektedirler. İn vitro bir çalışmada, bir

paladyum(II) kompleksi, $[Pd(sac)(tpy)](sac).4H_2O$ (sac=sakkarinat) hücre ölüm reseptörleri yoluyla apoptozu indükleyerek insan meme kanseri hücre dizileri MCF-7 ve MDA-MB-231'ya karşı güçlü bir anti-kanser aktivitesi göstermiştir [166].

Metal bazlı antikanser ilaçların çoğu, DNA'nın yarıklarına koordine ve kovalent olmayan interkalasyon ve yarık bağlanma etkileşimleri yoluyla bağlamayı hedeflemektedir. Bu tür etkileşimlere; π - π istiflenme, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları eşlik eder ve küçük moleküller DNA'ya bağlanarak stabilize edilirler. DNA ve metal bazlı antikanser ilaçları arasındaki etkileşimler, metalin oksidasyon durumuna ve metal merkeze bağlı organik kısımlara bağlı olup bu ligandlar sterik etkiye bağlı olarak bağlanma modunu belirlemektedir [15],[74]. Protein ve oligonükleotit gibi uzun yapılar DNA ile majör yarık üzerinden etkileşime girerken ilaçlar gibi küçük moleküller genellikle minör yarık üzerinden DNA ile bağlanırlar [55]. Küçük moleküllerin, belirli bir bağlanma modu ile DNA ile etkileşime girdiği bilinmekte olup bununla birlikte, birkaç çalışma, DNA ile etkileşime giren çeşitli küçük moleküller için karışık veya birden fazla bağlanma modu bildirmiştir [28]. Tek bir bileşik, örneğin hem interkalasyon hem de yarık bağlama gibi birden fazla DNA bağlama modu kullanabilir [58]. Bağlanmanın hangi yarık yoluyla gerçekleşeceği molekül ve yarık üzerindeki elektrostatik çeşitlilik, H bağı yapabilme olasılığına göre değişkenlik göstermektedir.

DNA'nın dış yüzeyinde bulunan gruplarla etkileşimlerin çoğu elektrostatik etkileşimler olup bu etkileşimler DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla küçük moleküllerin pozitif yüklü uçlarının etkileşmesiyle gerçekleşmekte ve DNA'nın kararlılığını arttırmaktadır. DNA ile yapılan diğer etkileşim türleri de (interkalasyon, yarık bağlanma gibi) molekülde bulunan fonksiyonel grupların özelliklerine bağlı olarak elektrostatik etkileşimi ile kararlılıklarını arttırabilirler [28],[36].

DNA veya proteinler gibi biyolojik moleküllerin çoğu elektron yoğunluğu bakımından zengin olup metal iyonları ise elektron bakımından eksiktirler. Bu nedenle, metal iyonlarının biyolojik moleküllerle etkileşime girmek için büyük ilgisinin olduğu gözlenir. DNA'nın nükleobazları ve fosfat grupları, metal iyonlarının ve açık koordinasyon bölgelerine sahip metal komplekslerinin bağlanabileceği donör atomları sağlarlar [56]. Metal komplekslerinin (özellikle geçiş metal bileşiklerinin) eşleşen şekil ve boyut nedeniyle belirli DNA yapıları veya dizileri ile etkileşime girdiği literatürde birçok

çalışmada rapor edilmiştir [15],[16],[19],[64],[68],[71],[74], [76]–[78]. Barton ve diğerleri, substratın geometri, boyut, hidrofobiklik ve hidrojen bağlama yeteneği gibi önemli özelliklerinin DNA bağlanma afinitesine katkıda bulunabileceğini göstermiştir [167] DNA'nın çift sarmalı, DNA bazlarının kenarlarında konumlanmış pek çok hidrojen bağlama bölgesine sahiptir, piridin halkalarındaki azot atomları ve serbest ligandda hidroksil grubunun varlığı, DNA baz çiftleri ile hidrojen bağı yapma olasılığını oldukça arttırmaktadır [35].

Nükleik asitlerin yapılarında bulunan pürin bazlarının imidazol halkasının kuvvetli nükleofilik özelliğinin seçimli bağlanmalar üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir [168]. Nükleotit ve oligonükleotitler ile yapılan çalışmalar sonucunda, Pt-amin bileşiklerinin özellikle guanin nükleotidine bağlandıklarını ve 3' ucundaki ardışık GG bağlanmasını tercih ettiği bulunmuştur [68].

Literatüre göre cis-platin ve diğer platin komplekslerinin DNA ile genel olarak kabul edilen bağlanma mekanizmasının; birincil donör atom olarak kabul edilen guanin bazlarının N7 atomunun Pt(II) merkezine bağlanması ve bu bağlanmanın daha sonra DNA'daki komşu pürin bazları (%60-65 oranında 1,2-GG veya % 20-25 oranında 1,2-AG) arasında yaklaşık %90 oranında iplik içi veya karşılıklı guaninler arasında gerçekleşen (%2) GG iplikler arası çapraz bağlar oluşturması ile sonuçlanması şeklinde olduğu bilinmektedir [16],[66],[68],[70],[169]. Aynı zincir üzerinde gerçekleşen diğer bir bağlanma Pt-bağlı guaninler arasında farklı bir bazın bulunduğu GpXpG 1,3 zincirler arası bağlanmasıdır ve %2 oranında izlenmiştir. Ayrıca guanin üzerinden %2 oranında tekli bağlanma olduğu da görülmüştür [68],[169]. Bununla birlikte nadiren de gözlenirse, tek iplik DNA veya RNA yapılarında adenin N1 atomu ve sitozin N3 atomları aracılığıyla da Pt bağlanabilmektedir [66],[170].

Platin (II) metali içeren PT-6 yapısının DS-4, DS-5 ve DS-6 kodlu DNA'lar ile etkileşime girdiği görülmüştür.

DS-4 kodlu DNA yapısını oluşturan ON-7 kodlu oligonükleotit ipliğinde 1 adet ardışık GG ile bir adet A bazı ve ON-8 kodlu oligonükleotit ipliğinde 2 adet G ve bir adet A bazı bulunmakta olup 1:1 ve 1:2 stokiyometrideki DNA ile ON-7'nin 3' ucundaki ardışık GG ve tek adenin ile ON-8'deki 2 adet guanin veya 1 adet adenin üzerinden platin bağlı ligand ile bağlanmanın gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Ayrıca %67 oranında G-C içeriğine

sahip olan DS-4'te molekül içi hidrojen bağlarının etkisiyle bağlanma kararlığı artırılmıştır. Ancak, DS-4'ü oluşturan oligonükleotitlerin molekül kütlelerinin aynı olması sebebiyle buradaki sinyalin hem DNA ile platin bağlı ligandın etkileşimine ait iyondan hem de oligonükleotitlerin dimerleri ile iki adet platin bağlı ligandın etkileşiminin +2 yüklü iyonuna ait sinyallerinin bileşkesi olduğu yorumunu akla getirmektedir.

Tek zincir baz dizilimlerinden görüleceği üzere DS-5 kodlu DNA'yı oluşturan ON-9 kodlu oligonükleotit ipliğinde iki adet ardışık GG ve bir adet ardışık AG bazları bulunmakta ON-10'da ise bir adet A bazı bulunmakta olup DNA'daki komşu pürin bazlarında bulunan GG ve AG arasında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağ oluşumu ile platin bağlı ligand ile etkileşimin gerçekleşmiş olduğu yorumu yapılmıştır. Ayrıca ON-9'un 3' ucundaki ardışık GG baz diziliminin de etkileşimde rol oynadığı düşünülmüştür. Burada DS-5 ile PT-6 arasında hem özgün 1:1 hem de 1:2 stokiyometride etkileşim gerçekleşmiştir. Bununla birlikte %67 oranında G-C içeriğine sahip olan DS-5'te molekül içi hidrojen bağlarının etkisiyle bağlanma kararlığının arttığı düşünülmüştür. Ancak etkileşime ait iyon sinyallerinin şiddetinin düşük olmasının nedeni olarak iyonlaşma verimi yüksek olan oligonükleotit-boya etkileşimlerine ait yüksek sinyal şiddetine sahip diğer iyonlar tarafından baskılandığı düşünülmektedir. Öte yandan ON-10 kodlu oligonükleotit ile platin içeren ligand ile 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2:2, 2:3 ve 2:4 stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür. Literatürde yer alan bir çalışmada yapısında hiç guanin bulunmayan 5'TCACACACACACACACACTT3' baz dizilimine sahip tek iplik oligonükleotit ile platin (II) bağlı ligandın etkileşime girdiği rapor edilmiş olup buradaki bağlanmanın cis-platin ve diğer platin bazlı ilaç adayları için yaygın olarak kabul edildiği üzere adenin üzerinden alternatif bir bağlanma bölgesi oluşturmakla birlikte ayrıca sitozin ve timinin de platin(II)'yi bağlayabildiğini bildirilmiştir [66]. Bununla birlikte yine aynı çalışmada, Pt(II)'nin (O,S) şelatlayıcı grup içeren β -hidroksisinnamik ester türevi yapılarla oluşturduğu kompleks yapılarının 9-metilguanin ve DNA ile kararlı etkileşimler oluşturduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bu çalışmada guaninler seçimli bağlanma yeri olarak tanımlanmıştır. Ancak guanin içermeyen DNA diziliminde alternatif nükleobazlar da bağlanma için hedef bölge olabilmektedir [66]. Yapısında hiç guanin bulunmayan ON-10 yapısıyla çoklu stokiyometride platin etkileşimlerinin gerçekleşmiş olması literatürle uyumlu olarak 5'CCTACC3' diziliminde olan ON-10 kodlu oligonükleotitin adenin bağlanmasının

yanı sıra yüksek sitozin ve timin içeriği nedeniyle bu bazlar aracılığıyla da bağlanma bölgesi oluşturduğu tespit edilmiştir.

DS-6 kodlu DNA'yı oluşturan ON-11 kodlu oligonükleotit ipliğinde bir adet G ve bir adet A bazı bulunmakta ON-12'de ise ikişer adet A ve G bazları ile bir adet ardışık AG bazları bulunmakta olup komşu pürin bazlarında bulunan AG arasında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağ oluşumu ve tekli guanin, adenin, sitozin ile platin bağlı ligand ile etkileşimin gerçekleşmiş olabileceği yorumu yapılmıştır. Burada DS-6 ile PT-6 arasında özgün 1:1 stokiyometride etkileşim gerçekleşmiştir. Etkileşime ait iyon sinyallerinin şiddetinin düşük olmasının nedeni olarak iyonlaşma verimi yüksek olan ON-11 ve ON-12 kodlu oligonükleotitler ile PT-6 etkileşimlerine ait yüksek şiddette sinyal veren diğer iyonlar tarafından baskılandığı düşünülmektedir.

Spektrumlardan elde edilen verilere göre paladyum (II) metali içeren PT-5 yapısının yalnızca DS-3 ve DS-4 kodlu DNA'lar ile etkileşime girdiği görülmüştür. Tek zincir baz dizilimlerinden görüleceği üzere DS-3 kodlu DNA'yı oluşturan her iki iplikte bulunan ikişer adet G bazı ve ikişer adet ardışık AG içeriği ile ON-5'te bulunan bir adet GAG içeriği üzerinden paladyum bağlı ligand ile bağlanmanın gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Ancak etkileşime ait iyon sinyallerinin şiddetinin düşük olmasının nedeni olarak iyonlaşma verimi yüksek olan oligonükleotit-boya etkileşimlerine ait diğer iyonlar tarafından baskılandığı düşünülmektedir.

DS-4 kodlu DNA yapısını oluşturan oligonükleotitlerin aynı molekül kütlesine sahip olmaları nedeniyle yukarıda bahsedilen durum ile aynı olarak burada da PT-5 ile DS-4 etkileşimine ait sinyallerin hem oligonükleotitlerin dimerleri ile paladyum bağlı ligand etkileşimlerine hem de DNA yapısı ile paladyum bağlı ligand etkileşimlerine ait sinyallerin bileşkesi olduğu düşünülmüştür.

MALDI'de gaz fazı kararsızlığı ve lazer ışınının örneğin kararsızlığını artırması sebepleriyle de yüksek şiddette sinyaller elde edilememiş olabileceği de düşünülmektedir. Dolayısıyla yalnızca baz dizilimi, G-C içeriği kıyaslaması yaparak DNA kararlılığı hakkında yorum yapmak zor olmaktadır. Platin bağlı ligandla (PT-6) olan etkileşimlerin paladyum bağlı ligand (PT-5) ile olan etkileşimlere kıyasla daha yüksek şiddette sinyal vermiş olması literatürle uyumlu olarak platin etkileşimlerinin daha kuvvetli ve kararlı olduğu yorumunu yapmaya imkan sağlamıştır. Bu yorumdan ve deneysel sonuçlardan

yola çıkılarak platin ve paladyum bağlı boyaların baz dizilimine bağlı olarak etkileşime girdikleri söylenebilmektedir.

Diğer taraftan 3 adet GG ve AG ile bir adet GAG içeren DS-7 kodlu DNA ile ne platin ne de paladyum bağlı boya etkileşimlerinin gerçekleşmemiştir. Fakat DS-7'yi oluşturan ON-13 ve ON-14 kodlu tek iplik oligonükleotitler ile 1:1 özgün etkileşimlerin yanı sıra 1:2, 1:3 ve 1:4 etkileşimlerin görülmesi, DS-7'ye ait sinyal olmaması DS-7 oluşma veriminin düşük olduğu ve sarmal kararlılığının düşük olması sebebiyle çift iplik DNA'nın açıldığı ve çözeltide bulunan serbest haldeki oligonükleotitler ile yüksek stokiyometride boya etkileşimlerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan ON-13 ve ON-14 kodlu tek iplik oligonükleotit yapıları Mügge ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kullandıkları yapılardan yola çıkarak belirlenmiştir. Bu çalışmada; dizilimleri 5'CCTCTGGTCTCC3' (ON-13 ile aynı dizilimde), 5'GGAGACCAGAGG3' (ON-14 ile aynı dizilimde) ve 5'TCACACACACACACACACTT3' olan tek iplik oligonükleotit yapılarıyla Pt(II)'nin (O,S) şelatlayıcı grup içeren β -hidroksisinnamik ester türevleriyle oluşturduğu komplekslerin 24 saatlik inkübasyonundan sonra 1:1 stokiyometride DNA:kompleks etkileşimleri gözleendiği, artan metal derişimiyle birlikte ikili ve üçlü etkileşimler elde edildiği ve etkileşim stokiyometrilерinde artış gözleendiği, ancak tüm spektrumlarda etkileşime girmemiş nükleik asit sinyalinin en baskın tür olduğu, artan guanin sayısına uygun olarak ikinci oligonükleotit dizisiyle olan çoklu platin etkileşimlerinin elde edildiği, guanin içermeyen üçüncü oligonükleotit ile yine platin bağlanması gözlenmesinin sonucu olarak platin bileşiklerinin guaninden başka bazıları da hedefleyebildiği ancak guanin yokluğunun etkileşim oluşumunu önemli ölçüde sınırladığı rapor edilmiştir [66]. Nükleobaz bağlanmasına bir alternatif olarak, Pt(II)'nin fosfat omurgasına bağlanması düşünülebilir. Ancak bu durum hem dizilime özgü olmayan etkileşimlere yol açacaktır hem de geçiş metallerinin tercihen DNA nükleobazlarını bağladığı, oysa alkali ve toprak alkali metallerin genellikle omurga fosfodiester gruplarını tercih ettiği bilinmektedir [66],[171]. Mügge ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ve tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre ON-13 ve ON-14 ile boyaların çoklu stokiyometrideki etkileşim sonuçlarının uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Pt (II) ve Pd (II) arasındaki birçok benzerlikten dolayı, antikanser ilaçlar olarak paladyum (II) komplekslerinin çalışılmasına büyük ilgi bulunmaktadır. Pd (II) komplekslerinin su ve ligand değişim oranları, Pt (II) analoglarından yaklaşık 10^5 kat daha hızlıdır ve Pd (II) kompleksleri Pt (II) komplekslerine kıyasla daha iyi çözünürlüğe sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı en azından bazı Pd (II) komplekslerinin önemli bir kanser tedavisi potansiyeline sahip olabileceği öngörülmektedir [15],[17],[35]. Ancak, paladyum (II) bileşiklerinin yüksek reaktivitesinin, sitoplazmadaki yapısal bütünlüklerini DNA'ya ulaşacak kadar uzun süre korumalarına izin vermemesi nedeniyle antikanser ajanları olarak kullanımlarını zorlaştırdığı [15] da bilinmektedir. Barton ve arkadaşları bir geçiş metali kompleksinin yapısının, DNA'ya genel bağlanma afinitesini belirlemede en önemli faktörlerden biri olduğunu gösterdi [Barton]. Nispeten iyi bir anyonik ayrılan grup (halojenürler, sakkarinat vb.) içeren Pd(II) kompleksinde, bu anyonun kaybı ile paladyum merkezinde DNA'nın baz çiftlerinin azot atomları tarafından erişilebilen bir koordinasyon bölgesini açığa çıkarmaktadır. $[Pd(4-OHPh-tpy)Cl]Cl \cdot 1.5H_2O$ ile DNA etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada, 4-OHPh-tpy ligandının aromatik halkaları ile DNA'nın baz çiftlerinin halkaları arasında $\pi-\pi$ istiflenmesi ve hidrofobik etkileşimler de meydana gelebileceği sonucuna varılmıştır [35].

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlara göre paladyum (II) içeren PT-5 kodlu boya ile oligonükleotit ve çift iplik DNA'ların etkileşimlerinin iyon şiddetleri kıyaslandığında platin (II) içeren PT-6 kodlu boya etkileşimlerine göre daha kararsız olduğu görülmüştür. Paladyum (II) metalinin ligand değişim kinetiğinin çok hızlı olması nedeniyle yapısal bütünlüğünü uzun süre koruyamaması sonucunda etkileşim ortamında daha kararsız yapıda bulunması sebebiyle literatür ile uyumlu olarak nükleik asitler ile daha kararsız etkileşime girdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bununla birlikte, küçük moleküllerin katyonik analogları ile DNA'nın fosfat omurgası arasındaki elektrostatik etkileşimlerin bir sonucu olarak dizilimden bağımsız biçimde gelişi güzel şekilde de (seçimsiz olarak) DNA'ya bağlanma gerçekleşebilir. Bu durumda PT-5 ve PT-6 boyalarının protonlanmış ve katyon katılmış hallerinin de oligonükleotitler ile baz diziliminden bağımsız, seçimsiz olarak elektrostatik etkileşime girmiş olabileceği ve çift iplik DNA ile boya etkileşimlerini minimize ettiği ve baskıladığı düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak sarmal kararlılığının düşük olması nedeniyle çift iplik DNA'nın açıldığı ve

eşlenik olan tek iplik oligonükleotitlerin çözeltide serbest halde bulundukları tespit edilmiştir. Spektrumlardan da görüleceği üzere tek iplik oligonükleotitler ile boyaların etkileşimlerinin çift sarmal DNA etkileşimlerine oranla daha yüksek şiddette ve kararlılıkta oldukları yorumu akla gelmiştir.

Oligonükleotit ve çift iplik DNA'ların boyalar ile etkileşimleri için inkübasyon ortamı olarak hem fizyolojik ortamı taklit etmek amacıyla [66],[68] hem de kütle spektrometrik sistemlerle uyumlu olması açısından 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) seçilmiştir. Kütle spektrometrik sistemlerde tuz eklentilerini azaltmak amacıyla ortama amonyum asetat eklenmektedir. Ancak fizyolojik ortam oluşturmak için ortama eklenen NaCl kaynaklı sodyum ve safsızlıklar kaynaklı ortamda bulunan potasyum iyonlarının girişimleri nedeniyle tuz/kasyon katımlarıyla oluşmuş etkileşimlerin arttığı ve özgün etkileşimlerin sinyal oranlarının düşmüş olduğu ve baskılandığı görülmüştür. MALDI kütle spektrometrisi analizlerinde her ne kadar amonyum asetat eklenmiş olsa dahi etkileşimler için gerekli olan fizyolojik ortamı oluşturmak için inkübasyon ortamına eklenen tuzların moleküler iyonlara ait sinyalleri baskılayıp sinyal şiddetlerini düşürdüğü ve özgün bağlanmayı azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte DNA ve oligonükleotitler ile boyalar arasındaki etkileşimlere ilave etkileşimler ile (elektrostatik, H bağı gibi) komplekslerin kararlılığının arttırıldığı düşünülmüştür. Çizelge 4.7'de oligonükleotitlerin ve çift iplik DNA'ların PT-6 ile Çizelge 4.8'de ise PT-5 ile etkileşim stokiyometrilere topluca verilmiştir.

Çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimlerinde, boyaların farklı DNA yapılarına bağlanma derecesinin göreceli bir karşılaştırmasını elde etmek için kütle spektrumlarında yer alan serbest DNA iyonları ve bağlanmış DNA iyonlarının bağıl bolluklarından yola çıkarak bağıl DNA bağlanma yüzdesi hesaplanmış ve Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bağıl DNA bağlanma yüzdesi hesaplaması Eşitlik 4.1'de yer alan denklem ile hesaplanmıştır [29].

$$\% \text{bağlanmış DNA} = 100 \times \frac{I(1:1) + I(1:2) + I(1:n)}{I(\text{DNA}) + I(1:1) + I(1:2) + I(1:n)} \quad \text{Eşitlik 4.1}$$

Eşitlik 4.1'de $I(\text{DNA})$ spektrumdaki serbest DNA'nın, $I(1:n)$ ise farklı stokiyometrilere DNA-boya etkileşimlerinin bağıl bolluğudur.

DNA ile boyaların etkileşimleri için en yüksek bağlanma oranının şaşırtıcı olarak DS-3 kodlu DNA ile olduğu görülmüştür. Baz dizilimleri incelendiğinde diğer DNA'lara kıyasla literatür bilgisine göre daha az bağlanma bölgesi içeren DS-3 ile en yüksek bağlanma olmasının nedeni olarak baz dizilimi seçiciliği olmadan bağlanma olasılığının yüksek olduğu düşünülmüştür. Diğer DS'ler ile etkileşimlerin göreceli olarak literatürle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Ancak tüm deneysel sonuçlardan da görüleceği üzere çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olması nedeniyle iplik açılması oluşmakta ve DS'leri oluşturan oligonükleotitlerle boyaların çoklu stokiyometride ve çift iplik DNA:boya etkileşimlerine kıyasla daha yüksek şiddette ve daha kararlı etkileşime girdikleri görülmüştür.



Çizelge 4. 7. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-6 ile etkileşim stokiyometrilere.

ON kodu : boya kodu	ON : boya etkileşim stokiyometrisi	DS kodu : boya kodu	DS : boya etkileşim stokiyometrisi	DS : boya etkileşiminde bağı DNA bağlanma yüzdesi
ON1 : PT-6	1:1, 1:2	DS1 : PT-6	-	-
ON2 : PT-6	1:1, 1:2, 1:3			
ON3 : PT-6	1:1, 1:2	DS2 : PT-6	-	-
ON4 : PT-6	1:1, 1:2, 2:1, 2:2			
ON5 : PT-6	1:1, 1:2	DS3 : PT-6	-	-
ON6 : PT-6	1:1, 1:2			
ON7 : PT-6	1:1, 1:2, 2:2	DS4 : PT-6	1:1, 1:2	%76,97
ON8 : PT-6	1:1, 1:2			
ON9 : PT-6	1:1, 1:2, 2:1, 2:2	DS5 : PT-6	1:1, 1:2	%60,96
ON10 : PT-6	1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2:2, 2:3, 2:4			
ON11 : PT-6	1:1, 1:2, 2:1	DS6 : PT-6	1:1	%46,84
ON12 : PT-6	1:1, 1:2			
ON13 : PT-6	1:1, 1:2, 1:3, 1:4	DS7 : PT-6	-	-
ON14 : PT-6	1:1, 1:2, 1:3			

Çizelge 4. 8. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-5 ile etkileşim stokiyometrilere.

ON kodu : boya kodu	ON : boya etkileşim stokiyometrisi	DS kodu : boya kodu	DS : boya etkileşim stokiyometrisi	DS : boya etkileşiminde bağlı DNA bağlanma yüzdesi
ON1 : PT-5	1:2	DS1 : PT-5	-	-
ON2 : PT-5	1:1, 1:2			
ON3 : PT-5	-	DS2 : PT-5	-	-
ON4 : PT-5	1:1, 1:2			
ON5 : PT-5	1:1, 1:2	DS3 : PT-5	1:1, 1:3	%83,99
ON6 : PT-5	1:1, 1:2			
ON7 : PT-5	1:1, 1:2	DS4 : PT-5	1:2, 1:4	%69,93
ON8 : PT-5	1:1, 1:2			
ON9 : PT-5	-	DS5 : PT-5	-	-
ON10 : PT-5	1:1			
ON11 : PT-5	1:2	DS6 : PT-5	-	-
ON12 : PT-5	-			
ON13 : PT-5	1:1, 1:2	DS7 : PT-5	-	-
ON14 : PT-5	1:1, 1:2			

4.2.1.1.3. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile boyaların etkileşimlerinin ESI-QTOF-MS ile analizleri

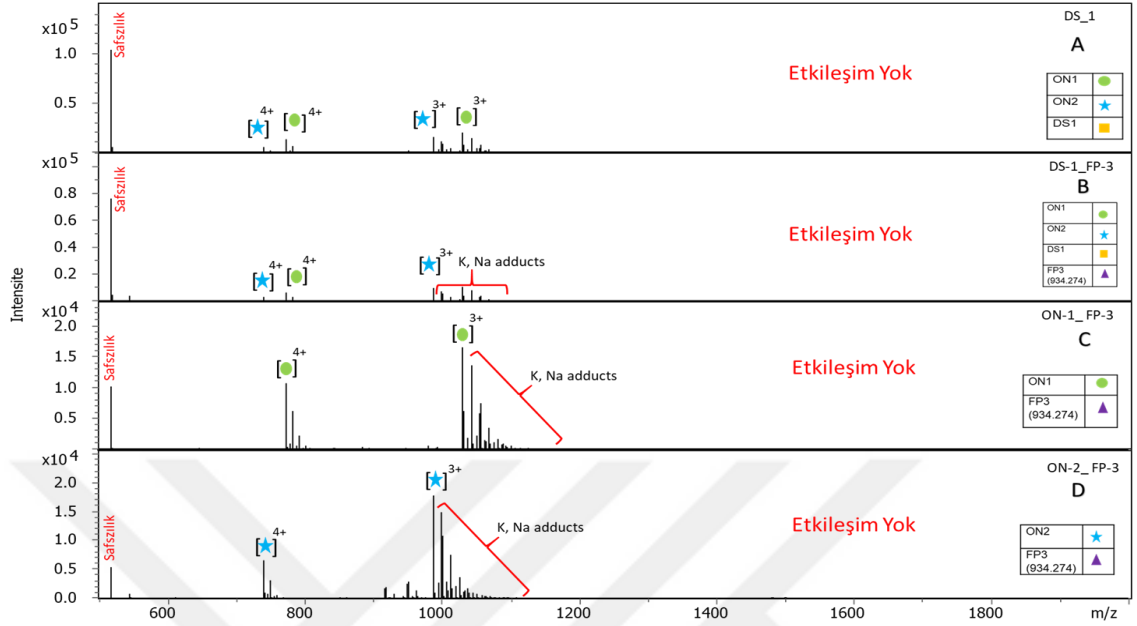
Bağlanma seçiciliği ile potansiyelinin değerlendirilmesi ve daha önce yapılmış olan MALDI-TOF-MS analizleri sonuçlarının karşılaştırılması amacıyla ON-1'den ON-14'e kadar farklı dizilimdeki 14 tek iplik oligonükleotit ile boyaların etkileşimleri ESI-QTOF kütle spektrometresi ile de incelenmiştir.

5'er pmol/μl derişimde hazırlanan oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile 5'er pmol/μl derişimde hazırlanan FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılmış olan ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası etkileşimlerinin elektrosprey iyonlaşmalı kütle spektrometrisi analizleri Bruker Daltonics (Almanya) firmasının Trapped Ion Mobility Spectrometry-Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (tims-QTOF-MS) cihazı kullanılarak pozitif ve negatif iyon modlarında gerçekleştirilmiştir. Pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir. Oligonükleotitlere, çift iplik DNA'lara, boyalara ve bunların etkileşimlerine ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir.

ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'lar ile FP-3 kodlu boya etkileşimi için pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.22'deki spektrumlar incelendiğinde; FP-3 kodlu boyanın ne oligonükleotitler ile ne de çift iplik DNA'lar ile etkileşime girdiği görülmüştür. Spektrumlarda yalnızca tek iplik oligonükleotitlere ait sinyaller görülmektedir. Burada yalnızca DS-1, DS-1-FP-3, ON-1-FP-3 ve ON2-FP-3 etkileşimlerine ait spektrumlar verilmiştir. Diğer oligonükleotit-FP3 ve çift iplik DNA-FP-3 karışımlarına ait spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir.

Perilen dimit türevi olan FP-3 kodlu düşük çözünürlükteki boya ile oligonükleotitlerin hem MALDI-TOF-MS hem de ESI-QTOF-MS analizlerinde etkileşime ait sinyaller görülmemiştir. FP-3 boyasının çözünürlüğünün düşük olması, çözelti ortamında çökmeler olması, bu çalışmada kullanılan oligonükleotit ipliklerinin 6-12 baz birimi aralığında olması nedeniyle bu oligonükleotitlerin eşleşmesinden oluşan çift iplik DNA'ların kısa olması ve tam rotasyon yapamayarak interkalatör FP-3 molekülü için bağlanma bölgesi (groove) oluşturmaması nedeniyle de etkileşimlerin gerçekleşmediği

düşünülmüştür. Öte yandan yüksüz olan bu yapının DNA'nın fosfat omurgası ile de herhangi bir etkileşime girmediği görülmüştür.



Şekil 4. 22. A)DS-1, B)DS-1-FP-3, C)ON-1-FP-3 ve D)ON-2-FP-3'ün 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları.

Analiz sonuçları ve kütle spektrumları değerlendirildiğinde yukarıda bahsi geçen nedenlerle FP-3 molekülünün hem kısa iplikli oligonükleotitler hem de kısa sarmal DNA'lar ile etkileşime girmediği yorumu MALDI-TOF-MS sonuçlarına ilaveten ESI-Q-TOF-MS analizleri sonuçlarıyla da desteklenmiştir.

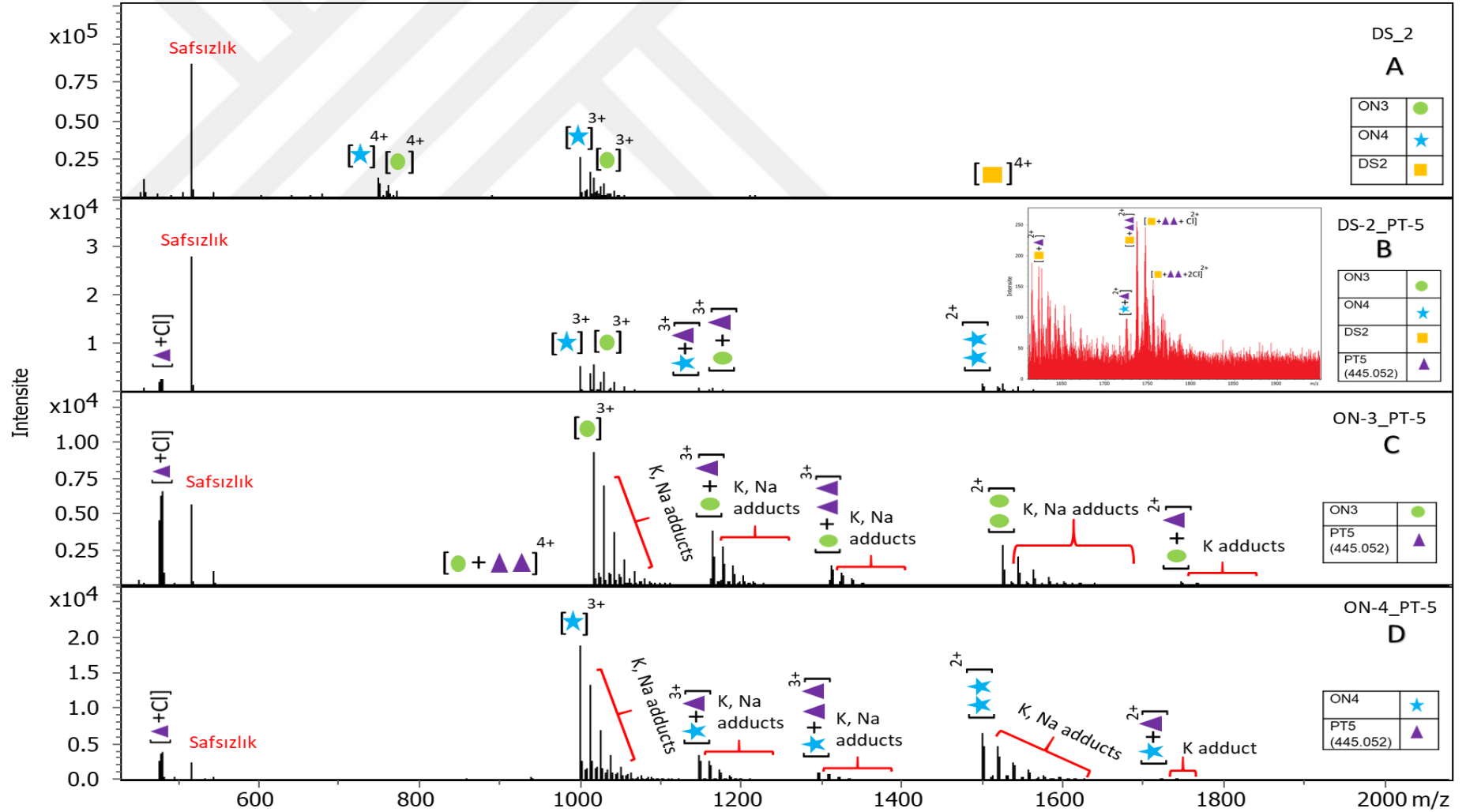
ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boya etkileşimi için pozitif iyon modunda analizler yapılmıştır. Burada yalnızca çift iplik DNA-PT-5 etkileşimi görülen spektrumlara yer verilmiştir. Etkileşim görülmemiş olan diğer çift iplik DNA-PT-5 karışımlarına ait spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir. Spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,05 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.23'teki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

Şekil 4.23. A, B, C ve D incelendiğinde; A'da ON-3, ON-4 ve DS-2'ye ait çoklu yüklü sinyaller olduğu, B'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride DS-2 ile PT-5 etkileşiminin +2 yüklü

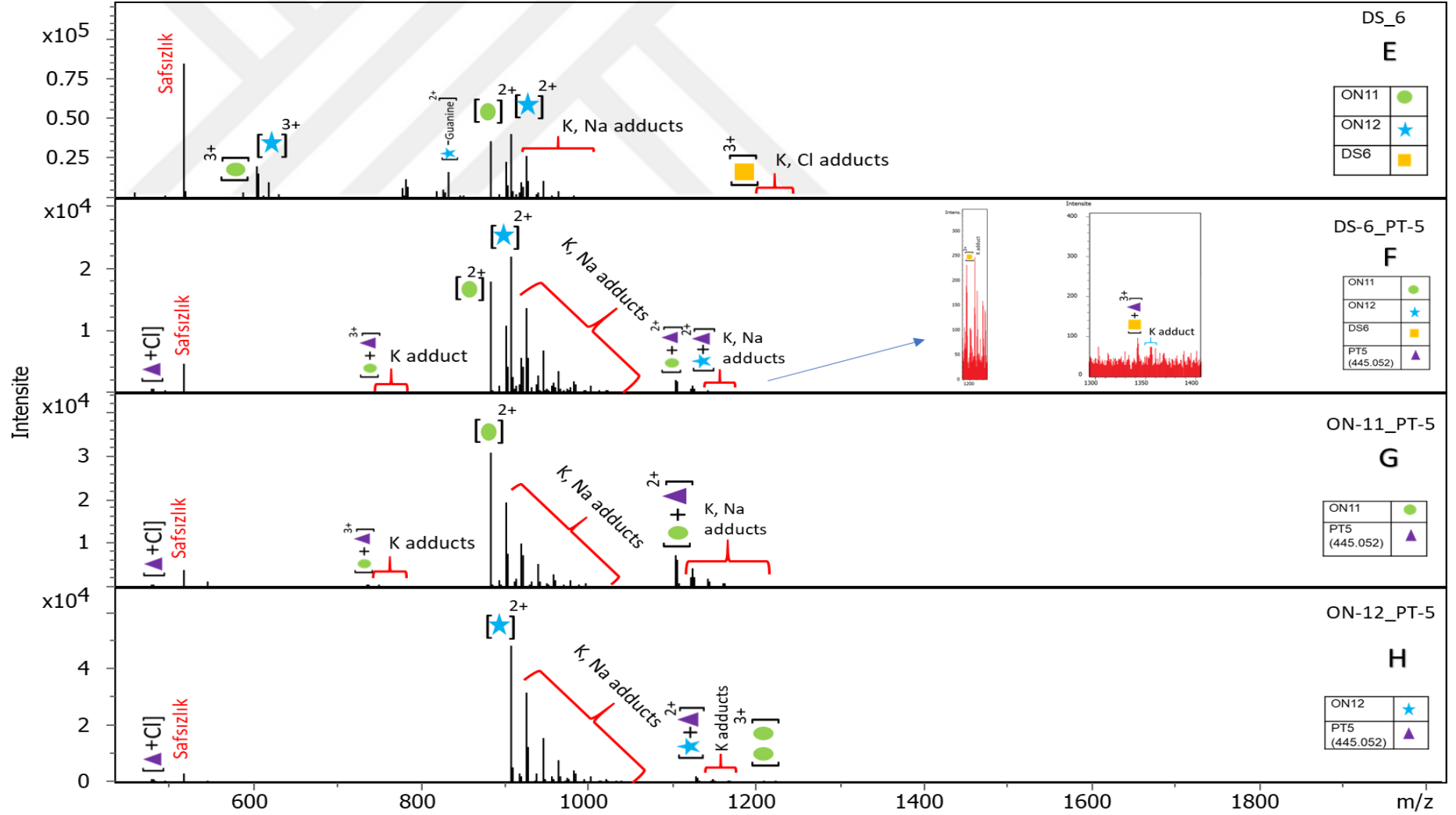
iyonlarına ait sinyaller ile bunların klor katılmalarına ait +2 yüklü iyonlara ait sinyaller ve 1:1 stokiyometride ON-3-PT-5 ve 1:1 stokiyometride ON-4-PT-5 etkileşimlerinin +3 yüklü iyonlarına ait sinyaller olduğu, C'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-3-PT-5 etkileşimi olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3, +4) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu, D'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-4-PT-5 etkileşimleri olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür. DS-2 ile PT-5 boyasının etkileşimlerine ait sinyallerin şiddeti çok düşüktür.

Şekil 4.23. E, F, G ve H incelendiğinde; E'de ON-11, ON-12 ve DS-6'ya ait çoklu yüklü sinyaller olduğu, F'de 1:1 stokiyometride DS-6 ile PT-5 etkileşiminin +3 yüklü iyonuna ait sinyal ile potasyum katılmasına ait +3 yüklü iyonuna ait sinyal ve 1:1 stokiyometride ON-11-PT-5 etkileşiminin çoklu iyonlarına ait (+2, +3) sinyaller ile bunların potasyum, sodyum katılmalarına ait sinyaller ve 1:1 stokiyometride ON-12-PT-5 etkileşimlerinin +2 yüklü iyonuna ait sinyal olduğu, G'de 1:1 stokiyometride ON-11-PT-5 etkileşiminin çoklu iyonlarına ait (+2, +3) sinyaller ile bunların potasyum, sodyum katılmalarına ait sinyaller olduğu, H'de 1:1 stokiyometride ON-12-PT-5 etkileşimi olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonların ve potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.

Şekil 4.23. I, J, K ve L incelendiğinde ise; I'da ON-13, ON-14 ve DS7'ye ait çoklu yüklü sinyaller olduğu, J'de 1:1 stokiyometride DS-7 ile PT-5 etkileşiminin +4 yüklü iyonuna ait sinyaller ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-13-PT-5 ve 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-14-PT-5 etkileşimlerinin +2, +3 ve +4 yüklü iyonlarına ait sinyaller ile potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, K'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-13-PT-5 etkileşimi olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3, +4) ait iyonlar ile potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, L'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-14-PT-5 etkileşimleri olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+3, +4) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 23. A)DS-2, B)DS-2-PT-5, C)ON-3-PT-5 ve D)ON-4-PT-5'in 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları.



Şekil 4.23. E)DS-6, F)DS-6-PT-5, G)ON-11-PT-5 ve H)ON-12-PT-5'in 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları (devam ediyor).

Bir başka boya olan PT-6 kodlu boya ile ON-1'den ON-14'e kadar tüm oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar tüm çift iplik DNA'ların etkileşimleri için pozitif iyon modunda analizler yapılmıştır. Buradaki spektrumlarda PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,11 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. Analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.24'teki spektrumlar incelendiğinde; iyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak oligonükleotit-boya ve çift iplik DNA-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir. Burada yalnızca çift iplik DNA-PT-6 etkileşimi görülen spektrumlara yer verilmiştir. Etkileşim görülmeyen diğer çift iplik DNA-PT-6 karışımlarına ait spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir.

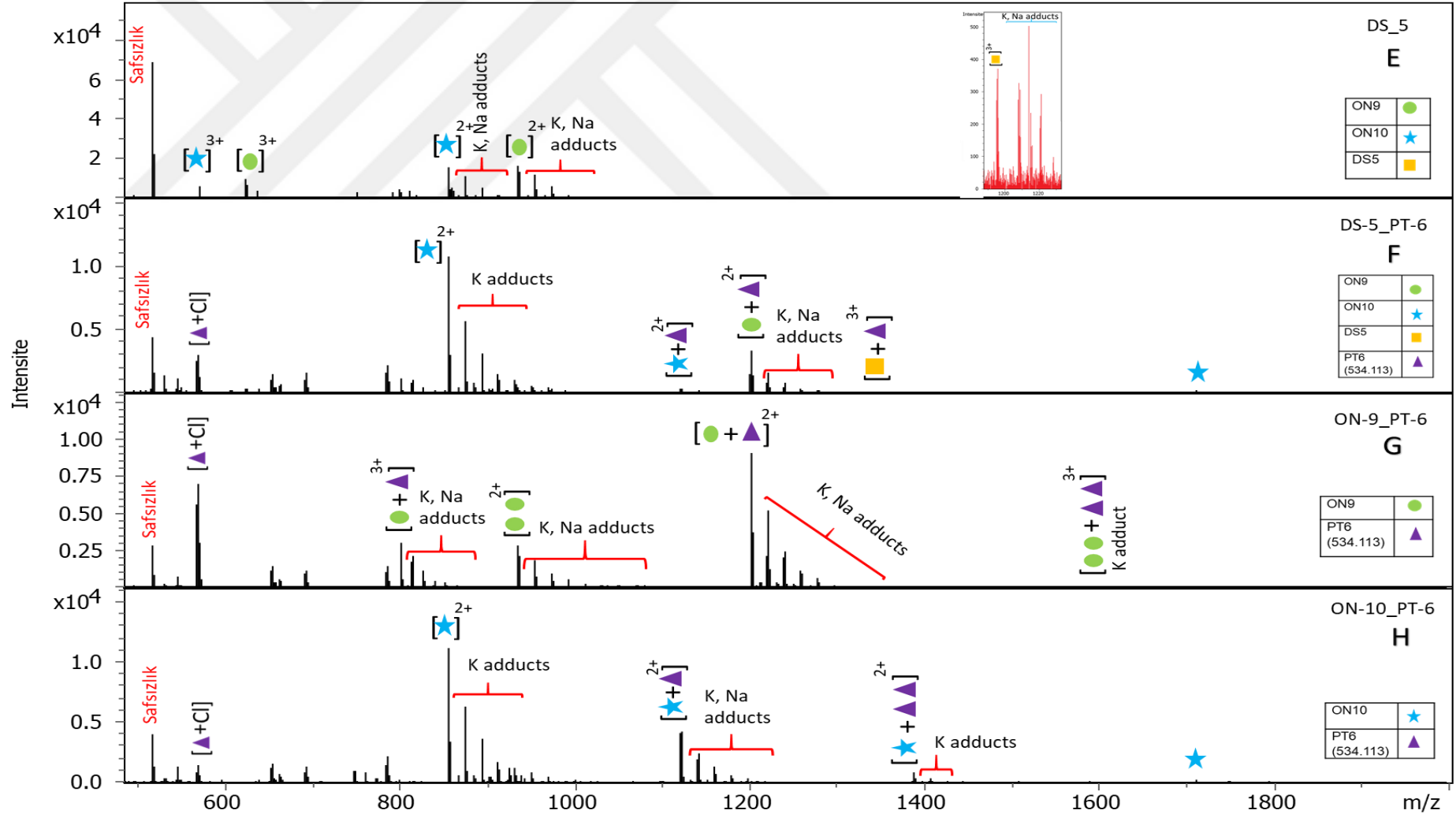
Şekil 4.24. A, B, C ve D incelendiğinde; A'da ON-7, ON-8 ve DS-4'e ait çoklu yüklü sinyaller ile potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, B'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride DS-4 ile PT-6 etkileşiminin +3 yüklü iyonlarına ait sinyaller ile bunların potasyum katılmalarına ait sinyaller ve 1:1 stokiyometride ON-7-PT-6 ve 1:1 stokiyometride ON-8-PT-6 etkileşimlerinin +2 yüklü iyonlarına ait sinyaller ve potasyum katılmaları olduğu, C'de 1:1 stokiyometride ON-7-PT-6 etkileşimi olduğu, D'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-8-PT-6 etkileşimleri olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonların ve bunların potasyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.

Şekil 4.24. E, F, G ve H incelendiğinde; E'de ON-9, ON-10 ve DS-5'e ait çoklu yüklü sinyaller ile potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, F'de 1:1 stokiyometride DS-5 ile PT-6 etkileşiminin +3 yüklü iyonlarına ait sinyaller ile bunların potasyum katılmalarına ait sinyaller ve 1:1 stokiyometride ON-9-PT-6 ve 1:1 stokiyometride ON-10-PT-6 etkileşimlerinin +2 yüklü iyonlarına ait sinyaller ve potasyum katılmaları olduğu, G'de 1:1, 1:2 ve 2:2 stokiyometride ON-9-PT-6 etkileşimlerinin çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonlar ve potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, H'de 1:1 ve 1:2 stokiyometride ON-10-PT-6 etkileşimleri olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonların ve bunların potasyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.

Şekil 4.24. I, J, K ve L incelendiğinde ise; I'da ON-11, ON-12 ve DS-6'ya ait çoklu yüklü sinyaller ile potasyum, sodyum, klor katılmalarının olduğu, J'de 1:1 stokiyometride DS-6 ile PT-6 etkileşiminin +3 yüklü iyonlarına ait sinyaller ile bunların potasyum katılmalarına ait sinyaller ve 1:1 stokiyometride ON-11-PT-6 ve 1:1 stokiyometride ON-12-PT-6 etkileşimlerinin +2 yüklü iyonlarına ait sinyaller ve potasyum katılmaları olduğu, K'de 1:1 ve 2:1 stokiyometride ON-11-PT-6 etkileşimlerinin çoklu

yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonlar ve potasyum, sodyum katılmalarının olduğu, L'de 1:1, 2:1 ve 2:2 stokiyometride ON-12-PT-6 etkileşimleri olduğu ve bunların çoklu yüklenmelerine (+2, +3) ait iyonların ve bunların potasyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.





Şekil 4.24. E)DS-5, F)DS-5-PT-6, G)ON-9-PT-6 ve H)ON-10-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerine ait ESI kütle spektrumları (devam ediyor).

Nükleik asitlerin yapılarının geçiş metalleriyle seçimli bağlanmaları daha önceki bölümde belirtilmiştir. Bu bağlanma seçicilikleri göz önünde bulundurularak ESI-QTOF-MS analizleri sonuçları aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.

Spektrumlardan elde edilen verilere göre paladyum (II) metali içeren PT-5 yapısının yalnızca DS-2, DS-6 ve DS-7 kodlu DNA'lar ile etkileşime girdiği görülmüştür. Tek zincir baz dizilimlerinden görüleceği üzere DS-2 kodlu DNA'yı oluşturan ON-3 kodlu oligonükleotit ipliğinde bir adet ardışık GGG, bir adet G ve 2 adet A bazları ve ON-4'te ise üç adet G bazı ve bir adet A bazı üzerinden paladyum bağlı ligand ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride bağlanmaların gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Etkileşime ait iyon sinyallerinin şiddetinin (~180, 250 sırasıyla) düşük olmasının nedeni olarak iyonlaşma verimi yüksek olan oligonükleotit-boya etkileşimlerine ait diğer iyonlar tarafından baskılandığı düşünülmüştür.

DS-6 kodlu DNA'yı oluşturan ON-11 kodlu oligonükleotit ipliğinde bir adet G ve bir adet A bazı bulunmakta ON-12'de ise ikişer adet A ve G bazları ile bir adet ardışık AG bazları üzerinden paladyum bağlı ligand ile 1:1 stokiyometride bağlanmanın gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Etkileşime ait iyon sinyalinin şiddeti düşük bulunmuştur (~90).

Yapısında 3 adet GG ve AG ile bir adet GAG bulunan DS-7 kodlu DNA ile PT-5 kodlu paladyum bağlı boyanın 1:1 özgün stokiyometride etkileşime girmiş olduğu görülmüştür. MALDI-MS analizlerinin aksine ESI-MS analizlerinde DS-7 kodlu DNA ile metal etkileşimlerinin gözlenmiştir. MALDI'de gaz fazı kararsızlığı ve lazer ışınının örneğin kararsızlığını artırması ayrıca MALDI iyonlaşmasının her ne kadar yumuşak iyonlaşma tekniği olsa da elektrosprey iyonlaşmanın MALDI'ye kıyasla daha yumuşak iyonlaşma tekniği olmasından dolayı ESI-MS analizlerinde örneğin zarar görmeden iyonlaşması, kovalent olmayan kararsız-zayıf etkileşimlerin bozulmadan gaz fazına geçişinin sağlandığı için etkileşime ait sinyallerin görülebildiği düşüncesini akla getirmiştir. Ancak etkileşime ait sinyal şiddeti çok düşüktür (~75).

MALDI-MS analiz sonuçlarında olduğu gibi ESI-MS analizlerinde de platin (II) metali içeren PT-6 yapısının DS-4, DS-5 ve DS-6 kodlu DNA'lar ile etkileşime girdiği görülmüştür.

DS-4 kodlu DNA ile platin bağılı ligandın 1:1 ve 1:2 stokiyometrideki etkileşimlerinin DS-4'ü oluşturan ON-7'nin 3' ucundaki ardışık GG ve tek adenin ile ON-8'deki 2 adet guanin veya 1 adet adenin üzerinden gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. %67 oranında G-C içeriğine sahip olan DS-4 yapısında molekül içi hidrojen bağlarının etkisiyle bağlanma kararlılığı arttırılmıştır. Ancak, DS-4'ü oluşturan oligonükleotitlerin molekül kütlelerinin aynı olması sebebiyle MALDI-MS sonuçlarındaki yorum ile aynı şekilde burada da DS-4-PT-5 etkileşime ait sinyalin hem DNA ile platin bağılı ligandın etkileşimine ait iyondan hem de oligonükleotitlerin dimerleri ile iki adet platin bağılı ligandın etkileşiminin +2 yüklü iyonuna ait sinyallerinin bileşkesi olduğu yorumunu tekrar akla getirmiştir. 1:1 ve 1:2 stokiyometrideki etkileşimlere ait sinyal şiddetleri sırasıyla ~280, 720 olduğu görülmüştür.

DS-5 kodlu DNA'yı oluşturan komşu pürin bazlarında bulunan iki adet GG ve bir adet AG arasında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağ oluşumu ile platin bağılı ligand ile etkileşimin gerçekleşmiş olduğu yorumu yapılmıştır. DS-5 ile PT-6 arasında özgün 1:1 stokiyometride etkileşim (sinyal şiddeti ~120) gerçekleşmiştir. Ayrıca %67 oranında G-C içeriğine sahip olan DS-5'te molekül içi hidrojen bağlarının etkisiyle bağlanma kararlılığının arttığı düşünülmüştür. Yapısında hiç guanin bulunmayan ON-10 yapısıyla 1:1 ve 1:2 stokiyometride platin etkileşiminin gerçekleşmiş olması MALDI-MS sonuçlarıyla ve literatürle [66] uyumlu olarak guaninin olmadığı dizilimlerde yaygın olarak alternatif bağlanma bölgesi oluşturan adenin içeriğinin yanı sıra sitozin ve timin bazları aracılığıyla da platinin bağlanabileceğini göstermiştir.

DS-6 kodlu DNA yapısındaki komşu pürin bazlarında bulunan AG arasında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağ oluşumu ve tek iplik oligonükleotit dizilerinde bulunan tekli guanin, adenin, sitozin ile platin bağılı ligand ile etkileşimin gerçekleşmiş olabileceği yorumu yapılmıştır. Burada DS-6 ile PT-6 arasında özgün 1:1 stokiyometride etkileşim gerçekleşmiştir. Etkileşime ait iyon sinyallerinin şiddetlerinin düşük olduğu görülmüştür (~160). Çizelge 4.9'da ise oligonükleotitler ile çift iplik DNA'ların PT-5 ve PT-6 ile etkileşim stokiyometrilere ile bağılı DNA bağlanma yüzdeleri topluca verilmiştir.

ESI-MS verileri incelendiğinde; DNA ile boyaların etkileşimleri için en yüksek bağlanma oranının, literatür bilgisine ve baz dizilimine uygun olarak en fazla bağlanma bölgesi içeren DS-2 kodlu DNA ile olduğu görülmüştür. Ancak DS-7 kodlu DNA için şaşırtıcı olarak çok düşük oranda bağlanma olduğu görülmüş ve bunun nedeni olarak DNA çift

ipliğinin kararsızlığı düşünülmüş ve iplik açılmasıyla birlikte serbest oligonükleotitlerle boyaların çoklu stokiyometride, daha kararlı ve daha yüksek şiddette etkileşime girdikleri görülmüştür.

Oligonükleotit ve çift iplik DNA'ların FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyalarla kovalent olmayan etkileşimlerin kütle spektrometrik yöntemlerle tayinleri gerçekleştirilmiştir. FP-3 kodlu perilen diimit türevi yapı ile etkileşimin gerçekleşmediği hem MALDI-MS hem de ESI-MS yöntemleriyle tespit edilmiştir. Paladyum (II) ve platin(II) metallerini içeren benzimidazol türevi PT-5 ve PT-6 kodu yapılar ile hem oligonükleotit dizilerinin hem de çift iplik DNA'ların farklı stokiyometrilere etkileşimlerinin olduğu her iki kütle spektrometrik yöntemle tespit edilmiştir.

Kovalent olmayan komplekslere MALDI-MS yöntemini uygulamak oldukça zordur çünkü zayıf etkileşim kuvveti hem örnek kristalleşmesi hem de lazer desorpsiyon/iyonlaştırma işlemi sırasında kararlı kalmalıdır [48]. MALDI'de analit ve matriks molekülleri, çözünme şartı olmayan kuru bir ortamda birlikte bulunmaktadır. Bu durum MALDI'yi kompleks oluşumunu izlemek için uygun bir yöntem yapar. Bu yöntemde analit molekülleri gaz fazında iyonlaşmakta ve gaz fazında tekrar bir araya gelerek kompleksleşme meydana gelmektedir. Ancak MALDI iyonlaştırmasında tek yüklü (singly charged) iyonların oluşması yüksek molekül ağırlıklı kompleksleri analiz etmeyi kısıtlamaktadır. Ayrıca platin ve paladyum gibi yüklü metallerin bağlı olduğu ligandların tek yüke inmesi MALDI mekanizması için zor olabilir ve bu durum iyonlaşma verimini düşürüyor olabilir. Öte yandan MALDI'de gaz fazı kararsızlığı ve lazer ışığının örneğin kararsızlığını arttırması da düşük sinyal şiddetlerinin görülmesinin sebeplerindendir. Ayrıca gaz fazındaki spesifik olmayan katyon katılmaları sebebiyle kompleks kararlılığı ve sinyal şiddetinin azaldığı tespit edilmiş olup bu durumun çözelti fazını tam olarak yansıtmadığı yorumu yapılmıştır.

Çizelge 4. 9. Oligonükleotitlerin ve DNA'ların PT-5 ve PT-6 ile etkileşim stokiyometrilere.

ON kodu : boya kodu	ON : boya etkileşim stokiyometrisi	DS kodu : boya kod	DS : boya etkileşim stokiyometrisi	DS : boya etkileşiminde bağlı DNA bağlanma yüzdesi
ON3 : PT-5	1:1, 1:2	DS2 : PT-5	1:1, 1:2	%75,27
ON4 : PT-5	1:1, 1:2			
ON11 : PT-5	1:1	DS6 : PT-5	1:1	%29,57
ON12 : PT-5	1:1			
ON13 : PT-5	1:1, 1:2	DS7 : PT-5	1:1	%39,47
ON14 : PT-5	1:1, 1:2			
ON7 : PT-6	1:1	DS4 : PT-6	1:1, 1:2	%61,25
ON8 : PT-6	1:1, 1:2			
ON9 : PT-6	1:1, 1:2, 2:2	DS5 : PT-6	1:1	%59,50
ON10 : PT-6	1:1, 1:2			
ON11 : PT-6	1:1, 2:1	DS6 : PT-6	1:1	%6,10
ON12 : PT-6	1:1, 2:1, 2:2			

ESI-MS yönteminde ise analit molekülleri iyon kaynağına çözelti fazında birlikte giderek iyonlaştırmaya uğramaktadır. Bu yöntemde çoklu yüklenme (multiply charged) olması yüksek molekül kütleli yapıların gözlenebilmesine imkan sağlanmaktadır. Ancak ESI'da çözünürlüğün düşük olmasıyla birlikte iyonlaşma verimi azdır. Ayrıca çoklu yüklenmenin bir sonucu olarak sinyal şiddetlerinin düşük olması ile karşılaşmaktadır. Tez çalışması kapsamındaki analizler sonucunda elde edilen spektrumlardan da görüleceği üzere çift iplik DNA'lar ile PT-5 ve PT-6 yapılarının etkileşimlerine ait sinyal

şiddetleri oldukça düşüktür. Tek iplik oligonükleotit dizileriyle etkileşimlerin sinyal şiddetlerinin $\sim 10^4$ mertebesinde olduğu görülmekte olup bu etkileşimler ait iyonların çift iplik DNA-boya etkileşimlerine ait iyon sinyallerini baskılamış olabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan sodyum, potasyum gibi katyon katılmaları ile etkileşime ait sinyallerin kararlılığının ve dolayısıyla sinyal şiddetlerinin azaldığı görülmüştür. Literatürde yer alan birçok çalışmada da oligonükleotit-küçük molekül etkileşimleri için yapılan ESI-MS analizleri sonucunda çoklu yükteki etkileşimlere ait sinyallerin oldukça düşük olduğu görülmüştür [3],[64],[66],[67],[99],[160].

MALDI-MS analizlerinde olduğu gibi ESI-MS analiz sonuçlarından da çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olduğu gözlenmiştir. Etkileşim çalışmalarında kullanılan oligonükleotit iplikleri 6-10-12 mer uzunlukta olup çift iplik DNA oluşumunda tavlanma sürecinde baz eşleşmesinin yanı sıra iplikler arası bağlanmalar, kuvvetler ile kararlı hale gelecek uzunlukta iplikler olmaması nedeniyle çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olduğu yorumu yapılmıştır. Sarmal kararlılığının düşük olmasının çift iplik DNA'nın açılarak oligonükleotit dizilerinin çözeltide serbest halde bulunmasına imkan verdiği ve bu oligonükleotitler ile boyaların etkileşimlerinin çift iplik DNA-boya etkileşimlerine kıyasla daha kararlı oldukları ve dolayısıyla daha yüksek şiddette sinyal verdikleri ayrıca özgün etkileşimlerin yanı sıra çoklu stokiometride de etkileşime girdikleri görülmüştür.

MALDI ve ESI kütle spektrometresi analizlerinde gerek PT-5 gerekse PT-6 yapılarının her ikisinin de tüm baz birimleriyle etkileşime girdiği tespit edilmiştir. Bu durum literatürde yer alan Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II) klorür molekülünün tüm baz birimleriyle etkileşime girdiğini bildiren sonuçlarla benzerlik göstermektedir [68].

MALDI-TOF-MS ve ESI-QTOF-MS analizleri sonucunda tüm çift iplik DNA'lar ile etkileşim gerçekleşmemiş olduğu görülmüştür. MALDI-MS'te DS-3-PT-5, DS-4-PT-5, DS-4-PT-6, DS-5-PT-6, DS-6-PT-6 ve ESI-MS'te ise DS-2-PT-5, DS--6-PT-5, DS7-PT-5, DS-4-PT-6, DS5-PT-6, DS-6-PT-6 etkileşimlerinin olduğu tespit edilmiştir. PT-6 kodlu platin bağlı ligandla DS-4, DS-5, DS-6 kodlu DNA'ların etkileşimleri her iki kütle spektrometrik yöntemle de tayin edilebilmiştir. Ancak etkileşim stokiyo metrikleri ve sinyal şiddetleri her iki yöntemde farklı bulunmuştur. Etkileşim tayinindeki bu farklı sonuçların nedenleri olarak daha önce detaylı şekilde anlatıldığı gibi iyonlaşma mekanizmalarındaki farklılık, tekli ve çoklu yüklenme özellikleri, MALDI'de gaz fazında

kompleks oluşumu, ESI'da çözelti fazında kompleks oluşumu, ESI iyonlaştırmanın etkileşimler sonucunda oluşan kompleks yapıların iyonlaşmasına uygun bir yöntem olmaması sayılabilir.

Çözücü perdelemesinin olduğu ortamda kovalent olmayan etkileşimler arasından özellikle hidrofobik etkileşimler çok önemlidirler. Özgün olan etkileşimler, hidrofobik kuvvetler ve van der Waals etkileşimleri üzerinden yürümektedir. Gaz fazı metodlarında, kompleksin desolvasyona uğradığı ve yapısal olarak Kulombik, dipolar, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri ile bir arada tutulduğu varsayılmaktadır. Hidrofobik etkileşimlerin ise gaz fazında kısmen veya tamamen yok olduğu varsayılmaktadır. Çözücü perdelemesinin olmadığı ortamlarda elektrostatik ve dipolar etkileşimleri daha kuvvetlidir. Çözücü uzaklaştırıldığı zaman, gaz fazındaki iyonlaşma sırasında oluşan kompleks iyon-dipol etkileşimleri ile kararlılığını sağlamaktadır. Özgün olmayan kompleks oluşumundaki etkileşimler elektrostatik kuvvetler üzerinden yürümektedir. Genel olarak, kovalent olmayan etkileşimlerle oluşmuş komplekslerin gaz fazı kararlılığı ve çözelti fazı kararlılıkları arasında bir ilişki bulunmamaktadır [48].

Nükleik asit-boya etkileşimlerinin kütle spektrometrik yöntemlerle tayininde katyon katılmalarını önleyerek analit iyonlarının sinyal şiddetini arttırmak için inkübasyon ortamı olarak amonyum asetat tamponu kullanılmış olsa da etkileşimler için gerekli olan fizyolojik ortamı oluşturmak için inkübasyon ortamına eklenen tuzların moleküler iyonlara ait sinyalleri baskılayarak sinyal şiddetlerini düşürdüğü ve özgün bağlanmayı azalttığı görülmüştür.

MALDI-MS sonuçlarıyla uyumlu olarak ESI-MS analizleri sonucunda da yalnızca baz dizilimi, G-C içeriği kıyaslaması yaparak DNA bağlanma kararlılığı hakkında kesin kanaate varmak mümkün olamamaktadır. Platin komplekslerinin paladyum komplekslerine nazaran yüksek şiddette sinyal vermeleri MALDI sonuçlarıyla ve literatürle benzer sonuçların elde edildiğinin göstergesidir. Tüm etkileşim sonuçları değerlendirildiğinde platin ve paladyum bağlı ligandların baz dizilimi seçiciliğiyle etkileşime girmiş oldukları tespiti yapılmıştır. Paladyum (II) bileşiklerinin yüksek reaktivitesi nedeniyle ligand değişim kinetiğinin çok hızlı olmasından kaynaklı olarak platin komplekslerine kıyasla daha kararsız kompleks oluşturması nedeniyle düşük sinyal şiddetine sahip etkileşim iyonları oluşturmuştur.

4.2.1.1.4. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin stokiyometrik olarak incelenmesi

Çift iplik DNA'lar ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların inkübasyon ortamındaki stokiyometrilere kompleks oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla boyaların sabit derişimine karşı DS-5 kodlu çift iplik DNA'nın farklı derişim oranlarındaki etkileşimleri MALDI-TOF-MS ile incelenmiştir.

50 pmol/μl sabit boya derişimi ile DS-5:boya derişim oranı olarak 0,04:1'den 2:1 oranına kadar değişen (hacimce 1:1 oranında) karışımlar hazırlanmış ve 37°C'de 24 saatlik inkübasyona (10 mM amonyum asetat tamponu, 10 mM NaCl varlığında pH 7'de) bırakılmıştır. 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve reflektyon pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

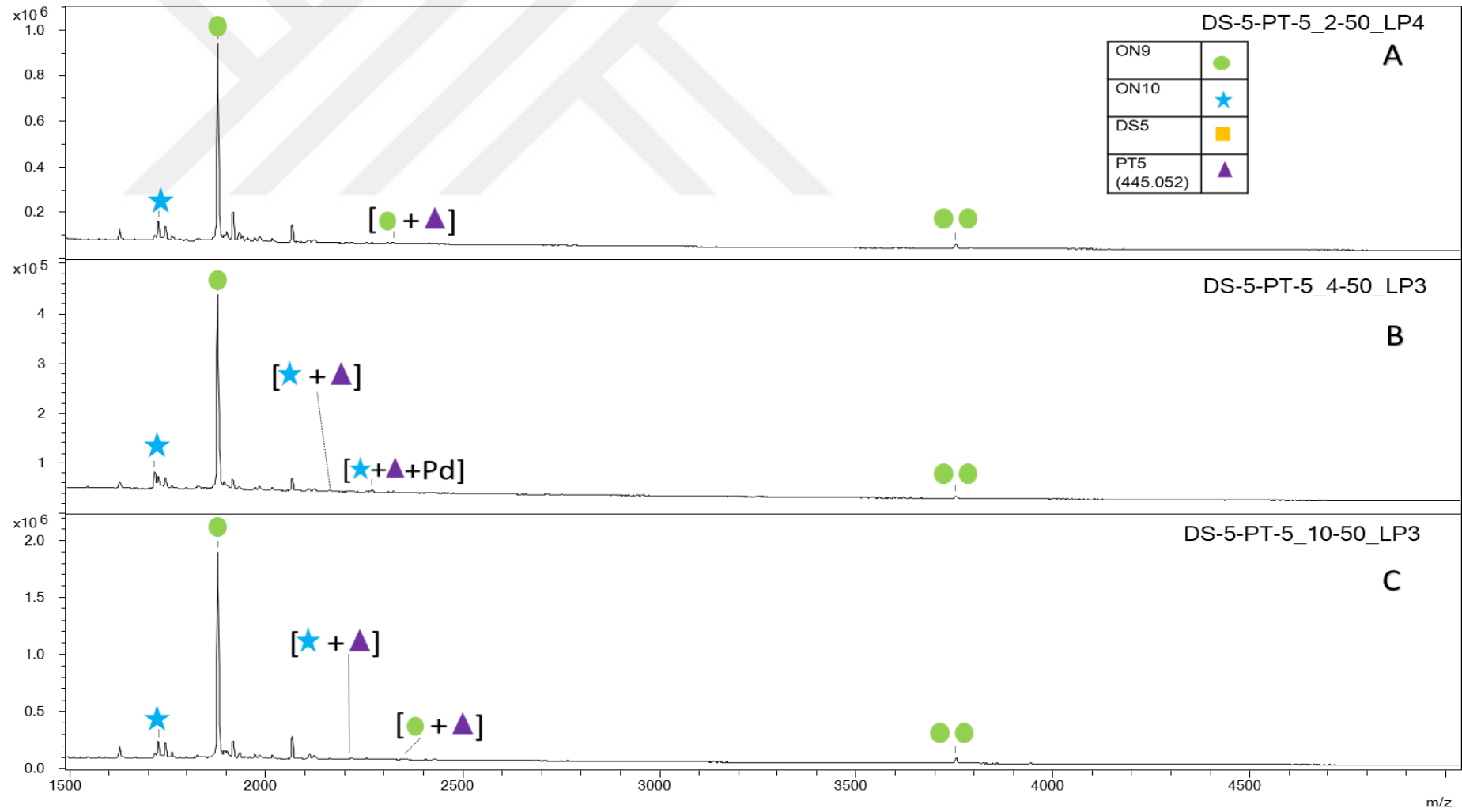
Farklı oranlardaki DS-5:FP-3 boya karışımları için pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda; FP-3 kodlu boyanın ile etkileşimin olmadığı görülmüş olup spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir.

Spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,05 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,11 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. İyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak DS-5-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

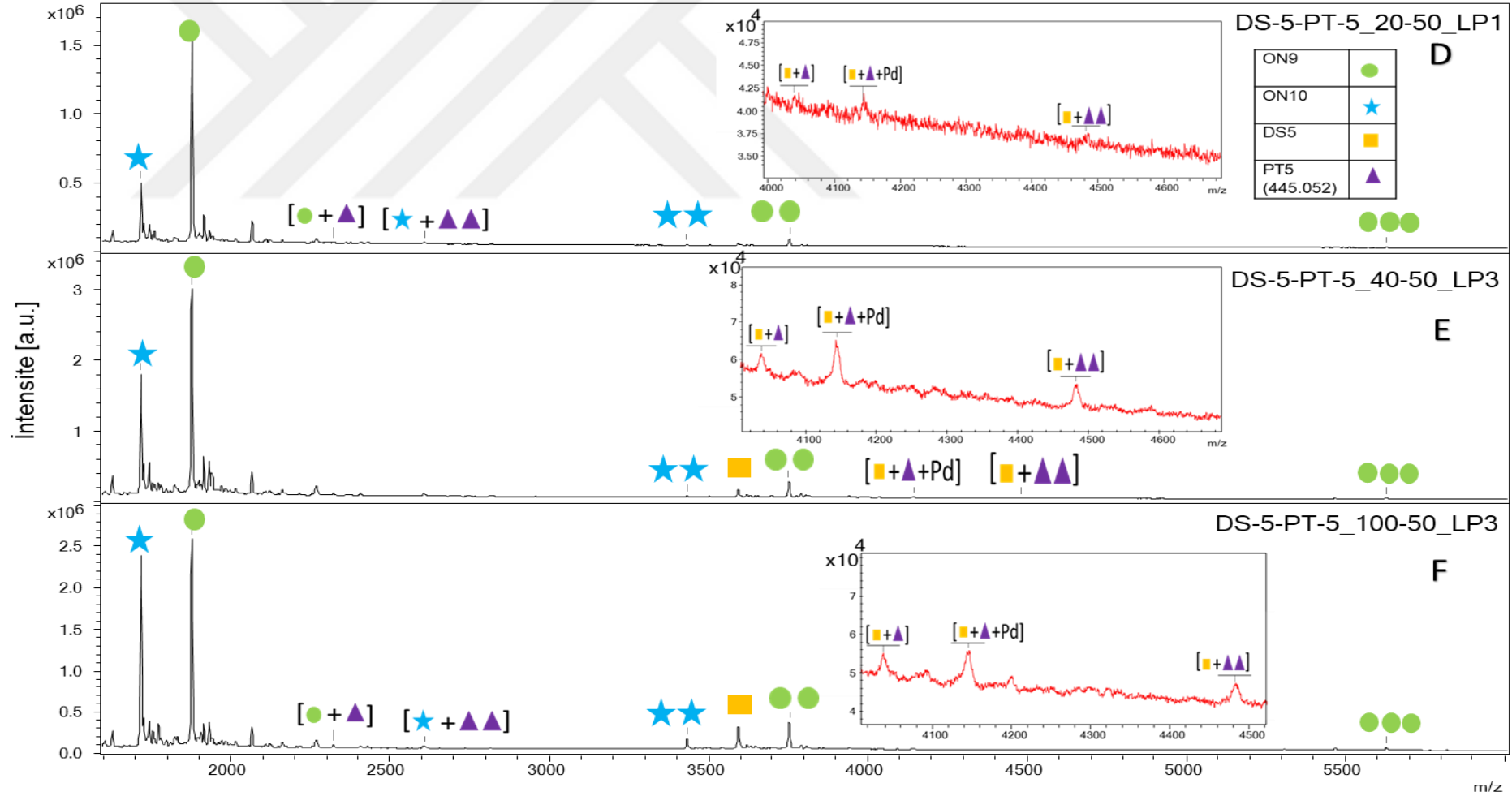
DS-5 ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif iyon modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.25.A, B ve C'deki spektrumlar incelendiğinde; 0,04:1, 0,08:1 ve 0,2:1 derişim oranındaki karışımlar için çift iplik DNA ile etkileşimine ait sinyal görülememiştir. Ancak DS-5'i oluşturan eşlenik ON-9 ve ON-10 kodlu oligonükleotitler ile PT-5'in 1:1 stokiyometrideki etkileşimleri gözlenmiştir. Şekil 4.25.D, E ve F'de ise artan DNA derişimiyle (20pmol/μl'den 100 pmol/μl'ye) birlikte hem oligonükleotitler ile etkileşim stokiyometrilere arttığını (1:1 ve 1:2,

oligonükleotit:boya) hem de DS-5 ile PT-5'in 1:1 ve 1:2 stokiyometride etkileşime girdiği ve ayrıca etkileşimlere ait sinyal şiddetlerinin arttığı tespit edilmiştir.



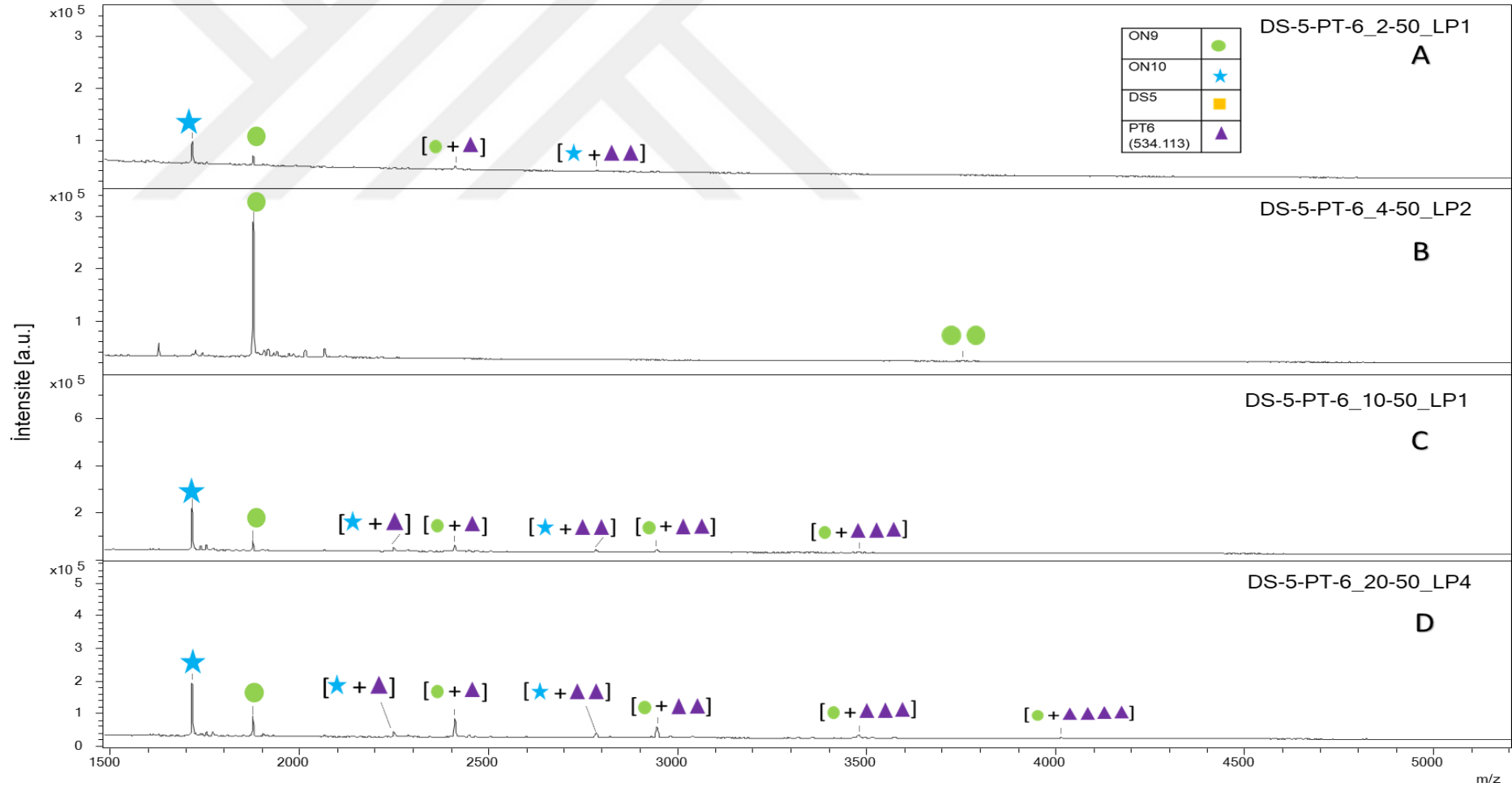


Şekil 4. 25. A) 0,04:1, B) 0,08:1 ve C) 0,2:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-5 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.

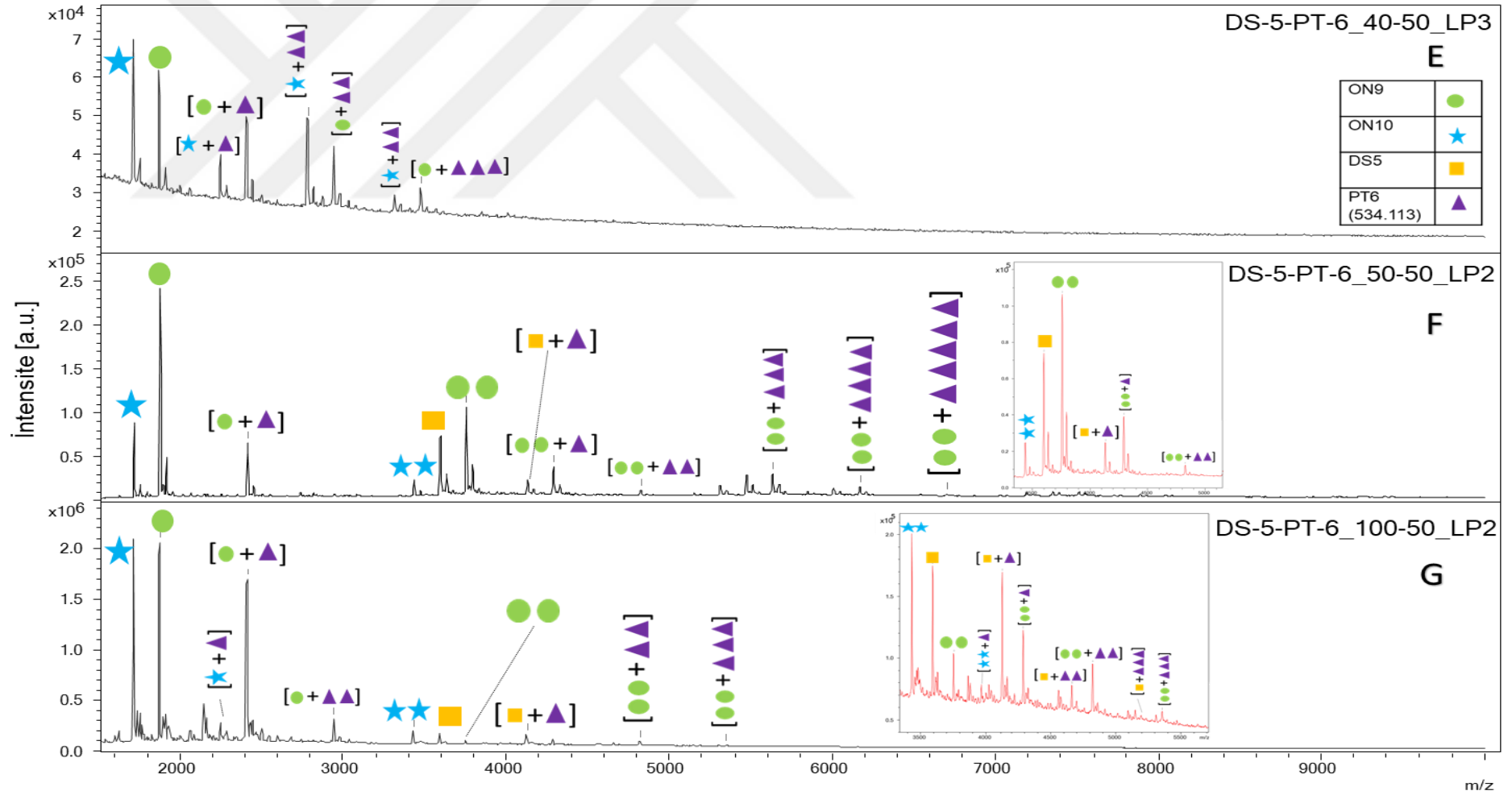


Şekil 4.25. D) 0,4:1, E) 0,8:1 ve F) 2:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-5 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

DS-5 ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif iyon modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.26.A, B, C, D ve E'deki spektrumlar incelendiğinde ise; 0,04:1, 0,08:1, 0,2:1, 0,4:1 ve 0,8:1 derişim oranındaki karışımlar için çift iplik DNA ile etkileşimine ait sinyal görülememiştir. Bununla birlikte DS-5'i oluşturan eşlenik ON-9 ve ON-10 kodlu oligonükleotitler ile PT-5'in 1:1 ve 1:2 stokiyometrideki etkileşimleri ile ON9:PT-5'in 1:3 ve 1:4 stokiyometrideki etkileşimleri de gözlenmiştir. ON-9 ile çoklu stokiyometrideki etkileşimlerin, oligonükleotitin dizilimindeki hem 3' hem de 5' ucunda yer alan ardışık iki adet GG ve bir adet A içeriğinden kaynaklı olarak PT-6 ile baz seçimli meydana geldiği yorumu yapılmıştır. Şekil 4.26.E ve F'de ise artan DNA derişimiyle (50pmol/μl'den 100 pmol/μl'ye) birlikte ON-9 kodlu oligonükleotit ile etkileşim stokiyometrilerinin arttığını (1:1, 2:1, 2:2, 2:3, 2:4 ve 2:5 oligonükleotit:boya) hem de DS-5 ile PT-6'nın 1:1 stokiyometride etkileşime girdiği ve ayrıca etkileşimlere ait sinyal şiddetlerinin arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 26.A) 0,04:1, B) 0,08:1, C) 0,2:1 ve D) 0,4:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-6 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4.26. E) 0,8:1, F) 1:1 ve G) 2:1 derişim oranlarındaki DS-5-PT-6 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

Paladyum (II) metali içeren PT-5 yapısının DS-5 ile platin (II) metali içeren PT-6 yapısına kıyasla daha fazla stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür. Ancak etkileşimlere ait sinyal şiddetleri incelendiğinde paladyum bağlı iyonlara ait sinyal şiddetlerinin 10^4 mertebesinde platin bağlı iyonlara ait sinyal şiddetlerinin ise 10^5 mertebesinde olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda literatürle uyumlu olarak platin etkileşimlerinin paladyum etkileşimlerine oranla daha kararlı olduğu yorumu yapılabilmektedir. Öte yandan spektrumlardan da görüleceği üzere oligonükleotit iyonlarına ait sinyale şiddetlerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiş olup çalışılan derişim oranlarında ortamda halen etkileşime girmemiş serbest oligonükleotitlerin baskın olduğu yorumu yapılmıştır. Ayrıca DS-5'i oluşturan oligonükleotit ipliklerinin 6 baz biriminden oluşmaları nedeniyle tavlama sürecinde baz eşleşmesinin dışında iplikler arası bağlanmaları artıracak etkileşimlerin kuvvetli olmamasıyla birlikte tavlama süreci sonrasında ipliklerin açıldığı ve kararlı bir DNA yapısı oluşmadığı bunun sonucu olarak da DNA oluşma veriminin düşük olduğunu akla gelmektedir.

Analizlerden elde edilen sonuçlardan etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, artan DNA:boya derişim oranlarındaki farklılıkla birlikte hem etkileşime ait sinyal şiddetlerinin izlenerek etkileşime ait bağl iyon şiddetinden yola çıkılarak etkileşim derişimlerinin hesaplanması hem de inkübasyon ortamında serbest halde bulunan (etkileşime girmemiş) boyaların sinyal şiddetlerinin izlenerek etkileşime girmeyen boyalara ait bağl iyon şiddetinden serbest boya derişimlerinin hesaplanması gerekmektedir. Ancak analizlerden elde edilen spektrumlarda, hem PT-5 hem de PT-6 kodlu boyaların moleküler iyonlarına ait sinyaller izlenemediği için ortamda etkileşime girmeyen serbest halde bulunan boyaların bağl iyon şiddetleri izlenememiştir. Bu kısıtlamadan kaynaklı olarak DNA:boya bağlanma sabiti hesaplamaları yapılamamıştır.

4.2.1.1.5. İnkübasyon süresinin çift iplik DNA ve oligonükleotitler ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimleri üzerine etkisinin incelenmesi

Etkileşim süreci için inkübasyon süresi önemli bir parametredir. İnkübasyon süresinin kompleks oluşum miktarına etkisinin araştırılması için 0-72 saat aralığında bir zaman taraması deneyi planlanmıştır. Etkileşimin denge konumuna gelinceye kadar geçen süreye inkübasyon süresi denilmektedir.

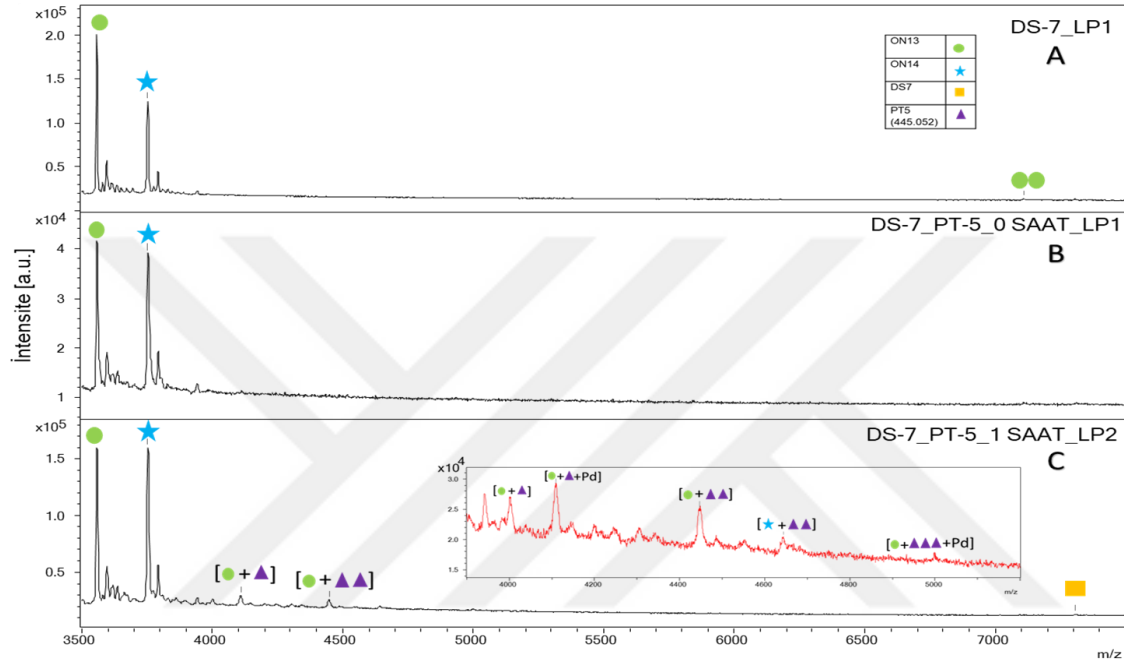
DS-7 kodlu çift iplik DNA diziliminde birden fazla ardışık GG ve GAG bazlarının bulunduğu görülmekte olup literatür bilgisinden yola çıkılarak bu dizilimdeki DNA ile çoklu stokiyometride etkileşim olacağı öngörülmüştür. Bu amaçla inkübasyon süresinin etkileşim stokiyometrisi üzerine etkisinin incelenmesi için DS-7 kodlu çift iplik DNA kullanılmıştır.

DS-7 kodlu çift iplik DNA ile FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların etkileşimleri ve DS-7'yi oluşturan ON-13 ve ON-14 kodlu tek iplik oligonükleotitler ile boyaların etkileşimleri üzerine inkübasyon süresinin etkisinin incelenmesi amacıyla 5'er pmol/μl oligonükleotit çözeltileri ve 5'er pmol/μl boya çözeltileri hazırlanmış, tavlanma sürecinin ardından DS-7 ve boya çözeltileri hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 0, 1, 6, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve refletron pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

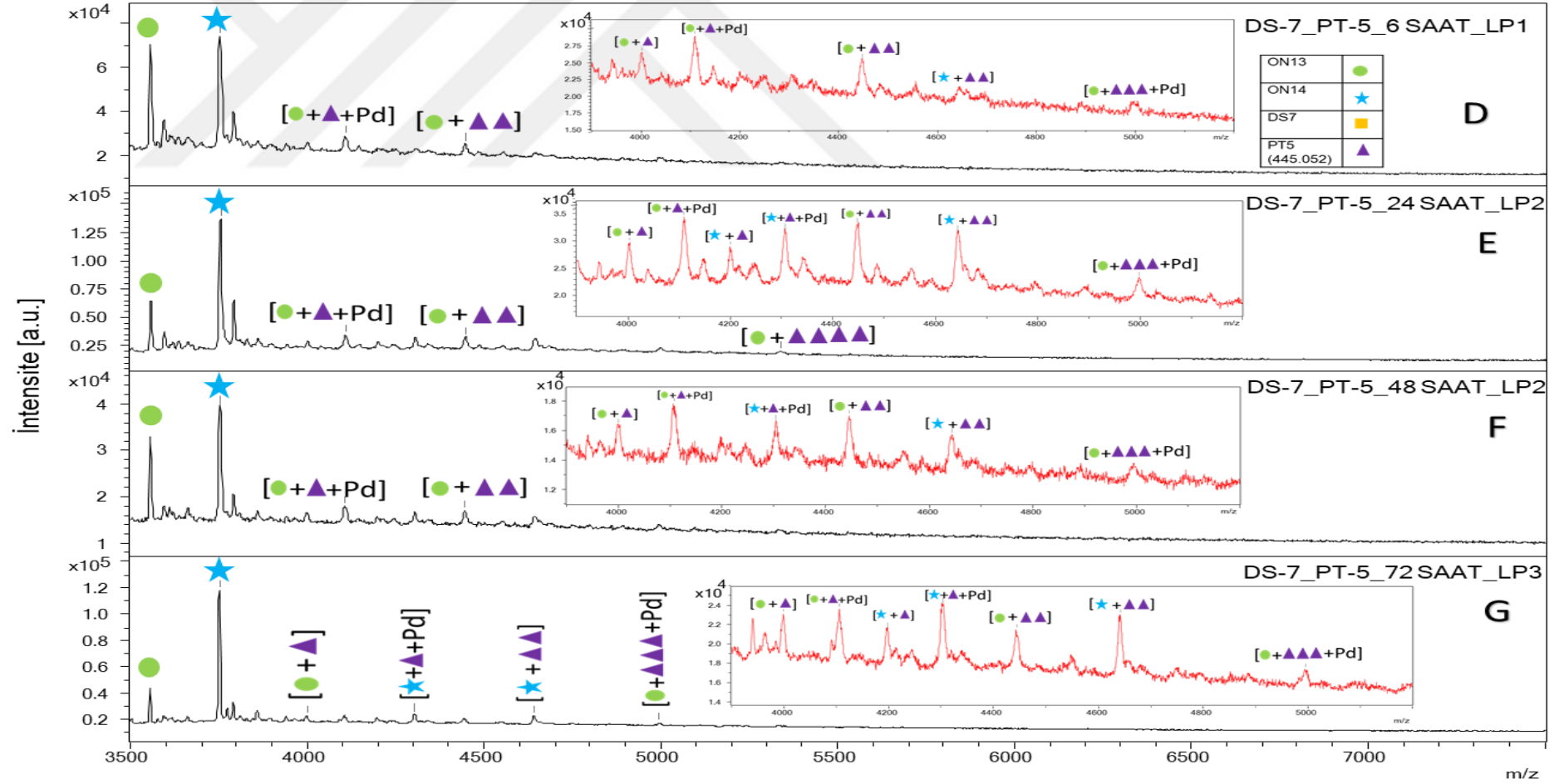
Farklı inkübasyon süresindeki DS-7-FP-3 boya karışımları için pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda; FP-3 kodlu boyanın ile hiçbir zaman aralığında etkileşimin olmadığı görülmüş olup spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir.

Spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,05 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,11 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. İyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak DS-7-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

Şekil 4.27’deki spektrumlar incelendiğinde; DS7-PT-5 etkileşimlerine ait sinyal gözlenememiştir. Ancak ON-13 ve ON-14 kodlu oligonükleotitler ile farklı stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu tespit edilmiştir. DS-7-PT5 etkileşimine ait sinyal olmaması DS-7 oluşma veriminin düşük olduğu ve sarmal kararlılığının düşük olması sebebiyle çift iplik DNA’nın açıldığı ve çözeltide bulunan serbest haldeki oligonükleotitler ile PT-5 etkileşimlerinin olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 27. A) DS7’nin kütle spektrumu, B) 0 saat ve C) 1 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-5’in 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4.27. D) 6 saat E) 24 saat, F) 48 saat ve G) 72 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-5'in 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

Şekil 4.27.C'deki spektrumdan görüleceği üzere ON-13 ile PT-5'in 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1:1, 1:2 ve 1:3 stokiyometride etkileşime girdiği, D, E, F ve G'deki spektrumlardan görüleceği üzere 6, 24, 48 ve 72 saat sonunda halen bu stokiyometrilere ait sinyallerin bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1:4 stokiyometride ON-13-PT-5 etkileşimi de gözlenmiştir. 1:1 stokiyometrideki etkileşim miktarında 1. saatten sonra 24. saate kadar önemli bir artış olduğu, 24. saatte etkileşimin maksimum miktarına ulaştığı, 24. saatten sonra kompleks miktarının azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte zamana artışıyla çoklu stokiyometrilere kompleks oluşumlarında artış gözlenmiş olup bu artışla birlikte 1:1 stokiyometrideki etkileşimin miktarı zamanla azalmıştır.

Şekil 4.27.C ve D'deki spektrumlardan görüleceği üzere ON-14 ile PT-5'in 1 ve 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1:2 stokiyometride etkileşime girdiği, E, F ve G'deki spektrumlardan görüleceği üzere 24, 48 ve 72 saat sonunda 1:1 ve 1:2 stokiyometrilere ait sinyallerin bulunduğu tespit edilmiştir. 1:1 stokiyometrideki etkileşimin 24. saatten sonra oluştuğu ve burada en yüksek miktarına çıktığı, 24. saatten sonrasında etkileşim miktarında yaklaşık 2 kat kadar bir azalış olduğu görülmüştür. Ayrıca zamanla birlikte çoklu stokiyometrilere kompleks oluşumlarında artış gözlenmiştir.

Spektrumlarda gözlenen sinyal alanları (ya da bağıl şiddet) oluşan kompleks miktarıyla ilişkilidir. Şekil 4.27'deki spektrumlardaki sinyal alanlarından yola çıkılarak 1:1 stokiyometrideki oluşan kompleks miktarları belirlenmiştir. Çizelge 4.10'da DS-7-PT-5, ON-13-PT-5 ve ON-14-PT-5'in 1:1 stokiyometrideki etkileşimlerinin inkübasyon süresi sonunda oluşan sinyal alanları (bağıl şiddet) toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 10. Nükleik asit:PT-5 etkileşimine ait sinyal alanının inkübasyon süresine göre değişimi.

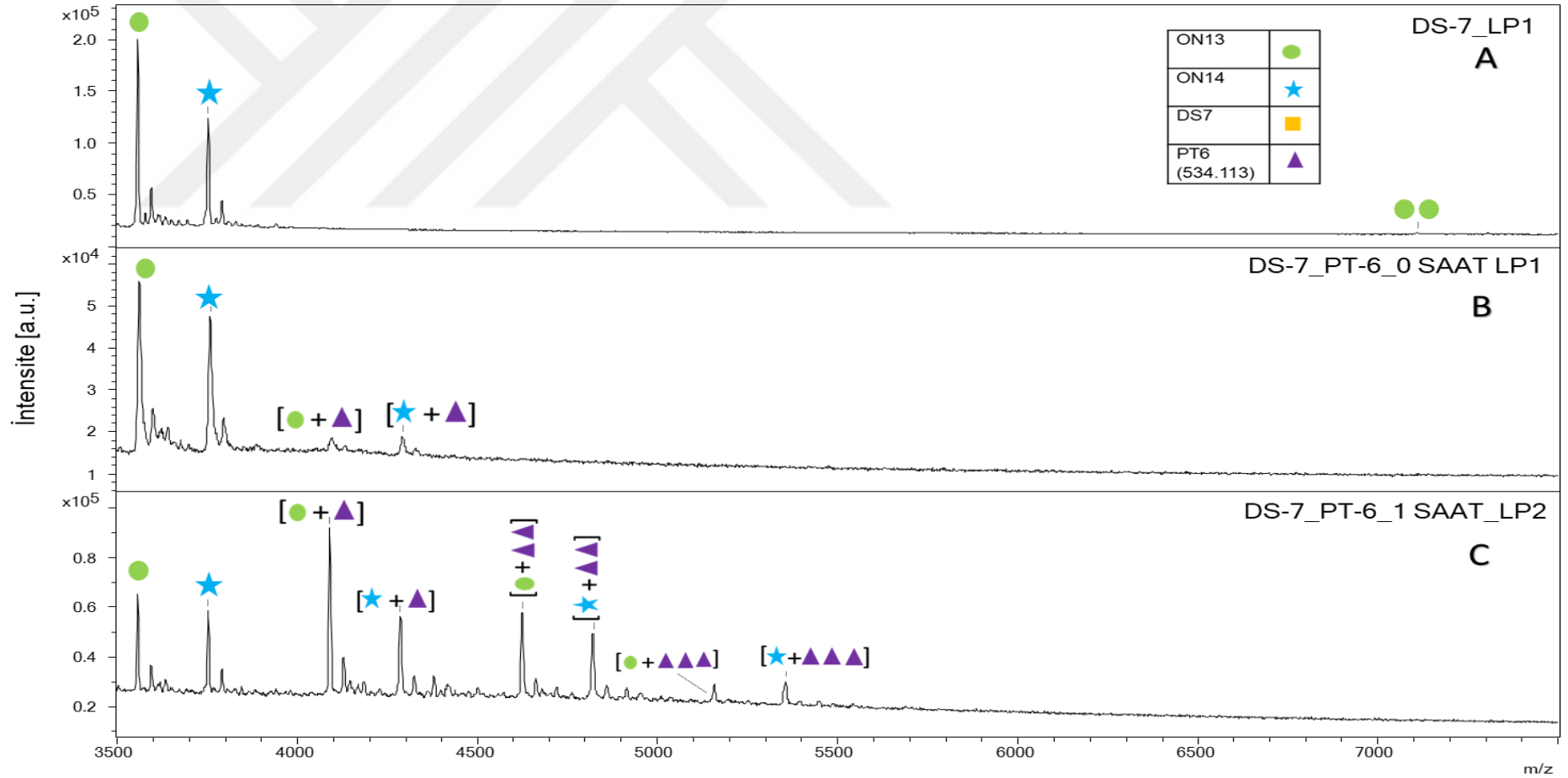
	Nükleik asit:PT-5 Etkileşimi	İnkübasyon süresi					
		0 saat	1 saat	6 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Sinyal alanı (bağlı şiddeti)	DS-7:PT-5 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.
	ON-13:PT-5 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	Etkileşim tespit edilmedi.	5,53x10 ⁴	5,00x10 ⁴	8,60x10 ⁴	2,73x10 ⁴	4,39x10 ⁴
	ON-14:PT-5 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	7,71x10 ⁴	Etkileşim tespit edilmedi.	3,73x10 ⁴

DS-7-PT-6 etkileşimlerinin yer aldığı Şekil 4.28'deki spektrumlar incelendiğinde; DS-7-PT-6 etkileşimlerine ait sinyal gözlenememiştir. Ancak ON-13 ve ON-14 kodlu oligonükleotitler ile farklı stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu tespit edilmiştir. Daha önce de belirtildiği üzere DS-7 oluşma veriminin düşük olması sebebiyle sarmal kararsız ve çift iplik DNA'nın açılmış ve çözeltide bulunan serbest haldeki oligonükleotitler ile PT-6'nın etkileşime girdiği sonucuna varılmıştır.

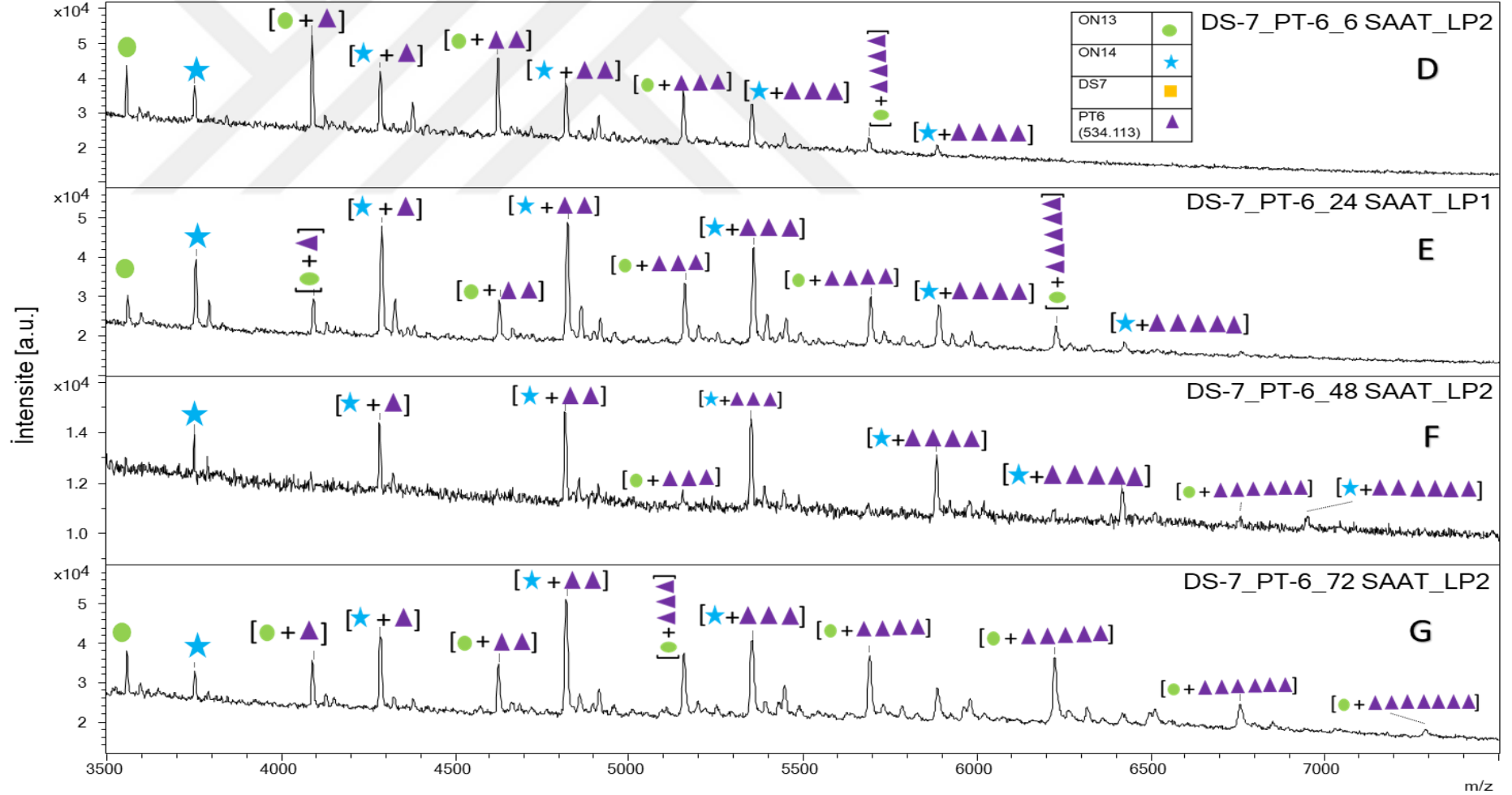
Şekil 4.28. B, C, D, E, F, G'deki spektrumlardan görüleceği üzere ON-13 ile PT-6'nın 0. saatten 72. saatte kadar 1:1 stokiyometride etkileşime girdikleri, 1:1 stokiyometrideki etkileşimin yanı sıra 1. saat sonunda 1:2, 1:3 stokiyometrilere, 6. saat sonunda 1:4, 24. saat sonunda 1:5, 48. saat sonunda 1:6 ve 72. saat sonunda 1:7 stokiyometride etkileşime girdikleri tespit edilmiştir. 1:1 stokiyometrideki etkileşim miktarında karıştırıldıkları andan (0. saat) itibaren etkileşim oluşmakta olup 24. saate kadar önemli bir artış olmadan neredeyse aynı miktarda kompleks oluşumu olduğu ve 24. saatten sonra kompleks miktarında önemli bir azalış olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte zamana artışıyla çoklu stokiyometrilere kompleks oluşumlarında artış gözlenmiştir. 48. saatte 1:1 stokiyometride anlamlı miktarda kompleks oluşmaması deneysel hata veya bu saatte çoklu stokiyometrilere oluşan diğer komplekslerin baskılaması olarak düşünülmüştür.

Şekil 4.28.B, C, D, E, F, G'deki spektrumlardan görüleceği üzere ON-14 ile PT-6'nın 0. saatten 72. saate kadar 1:1 stokiyometride etkileşime girdikleri, 1:1 stokiyometrideki etkileşimin yanı sıra 1. saat sonunda 1:2, 1:3 stokiyometrilere, 6. saat sonunda 1:4, 24. saat sonunda 1:5, 48. saat sonunda 1:6 stokiyometride etkileşime girdikleri tespit edilmiştir. 1:1 stokiyometrideki etkileşim karıştırıldıkları andan itibaren (0. saat) oluşmakta ve 24. saate kadar artmaktadır. 24. saatte en yüksek miktarına ulaşan kompleks 72. saate kadar azalma eğilimindedir ve 72. saatte kompleks miktarında yaklaşık 2 kat azalma olmuştur. Bununla birlikte çoklu stokiyometrilere kompleks oluşumlarında artış gözlenmiştir. 6. ve 48. saatlerde 1:1 stokiyometride kompleks oluşum miktarında sapmaların olması deneysel hata veya bu saatlerde çoklu stokiyometrilere oluşan diğer komplekslerin baskılaması olarak düşünülmüştür.

Çizelge 4.11'de DS-7-PT-6, ON-13-PT-6 ve ON-14-PT-6'nın 1:1 stokiyometrideki etkileşimlerinin inkübasyon süresi sonunda oluşan sinyal alanları (bağıl şiddet) toplu olarak verilmiştir.



Şekil 4. 28. A) DS7'nin kütle spektrumu, B) 0 saat ve C) 1 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları.



Şekil 4.28. D) 6 saat E) 24 saat, F) 48 saat ve G) 72 saat inkübasyon süresi sonundaki DS7-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerine ait lineer mod MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

Çizelge 4. 11. Nükleik asit:PT-6 etkileşimine ait sinyal alanının inkübasyon süresine göre değişimi.

	Nükleik asit:boya Etkileşimi	İnkübasyon süresi					
		0 saat	1 saat	6 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Sinyal alanı (bağıl şiddeti)	DS-7:PT-6 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.	Etkileşim tespit edilmedi.
	ON-13:PT-6 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	$6,07 \times 10^4$	$4,71 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5$	$8,38 \times 10^4$	Etkileşim tespit edilmedi.	$9,78 \times 10^4$
	ON-14:PT-6 etkileşimi (1:1 stokiyometri)	$6,73 \times 10^4$	$2,47 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$	$2,67 \times 10^5$	$2,01 \times 10^4$	$1,70 \times 10^5$

Deneyssel çalışmalar sonucunda özgün 1:1 stokiyometrideki tüm etkileşimler için optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada yalnızca 1:1 stokiyometrideki etkileşime ait oluşma miktarları değerlendirilmiştir. Spektrumlardan görüleceği üzere inkübasyon süresi arttıkça özgün olan 1:1 stokiyometrideki etkileşimlerin yanında baz seçimli etkileşimlerin meydana gelmesiyle çoklu stokiyometrilere de etkileşimler gerçekleşmiştir. Farklı stokiyometrilere de etkileşimlerin zaman ile birlikte artmasıyla özgün stokiyometride etkileşim oluşma miktarı azalmıştır. Ayrıca kompleks yapısında zamanla birlikte oluşan ilave kuvvetlerle de (H bağı, yük-dipol etkileşimleri gibi) etkileşimlerin kararlılığının artmış olduğu düşünülmüştür.

4.2.1.2. Oligonükleotitler ile PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin iyon hareketliliği kütle spektrometresi (IM-MS) ile analizleri ve konformasyonel değişikliklerin incelenmesi

Kütle spektrometrisi yönteminde aynı kütle/yük oranına sahip olan farklı türlerin ayırt edilmesi mümkün olmamakta olup iyon hareketliliği ile kütle spektrometrisinin birleştiği sistemde bu türlerin ayırt edilebilmesi, yapı aydınlatma ve kimyasal izomerlerin belirlenmesi çalışmaları da gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemde eş zamanlı olarak hem iyonların kütleleri belirlenebilmekte hem de yapısal olarak farklı ancak aynı kütle/yük oranında olan iyonlar kesin olarak analiz edilebilmektedir. Bu teknik iyonun yüküne, büyüklüğüne ve şekline büyük oranda bağlı olup bu teknikle yapılan analizler neticesinde iyonların yapısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir [139].

Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi ile iyonların boyut/yük oranına göre ayrımları gerçekleştirilmektedir. İyonun elektriksel alanda inert bir gaz yardımıyla sürüklenme tüpünde geçirdiği zaman ölçülmekte ve iyonların tüp içerisinde kaldıkları süre boyunca oluşturdıkları yapının şekilsel ve boyutsal olarak bilgisi sağlanmaktadır. Şeklen büyük olan iyonlar elektriksel alanda daha az tutulurlar ve daha hızlı hareket ederler bu sebeple çıkış hunisine daha yakındırlar ve kütle analizörüne en erken ulaşırlar. Şeklen küçük olan iyonlar ise elektriksel alanda daha çok tutuldukları için kütle analizörüne en geç ulaşırlar. Sürüklenme tüpünü terk ederek kütle analizörüne en erken ulaşan şeklen büyük iyonlar daha önce analiz edilen iyonlardır ve daha büyük etkin çarpışma kesiti değerine sahiptirler. Molekülün üç boyutlu yapısı hakkında bilgi edinilebilmesi amacıyla etkin çarpışma kesiti değerlerine bakılmalıdır.

Kompleks oluşumu hem DNA'da hem de ligandlarda değişen derecelerde konformasyonel değişikliklerle sonuçlanmaktadır [54]. Aynı molekül kütlesine sahip farklı dizilimdeki ON-7 ve ON-8 kodlu oligonükleotitlerin konformasyonel olarak farklılıklarının ve bu oligonükleotitlerin eşleşmesi ile oluşan DS-4 kodlu çift iplik DNA ile PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin konformasyonel olarak incelenmesi amacıyla TIMS-TOF-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. 100 pmol/μl oligonükleotit stok çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 5 pmol/μl derişimde ON-7 ve ON-8 kodlu oligonükleotitler, ON-7 ve ON-8 kodlu birbirleriyle eşlenik olan oligonükleotitlerin tavlanması sonucunda elde edilen 5 pmol/μl derişimde DS-4 kodlu çift iplik DNA hazırlanmıştır. 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan stok PT-5 boya çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl

varlığında pH 7’de) ile seyreltilerek 5 pmol/μl derişimde boya çözeltilisi hazırlanmıştır. Daha sonra hacimce 1:1 olacak şekilde hazırlanan oligonükleotit:boya örnekleri 37°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında Bruker Daltonics (Almanya) firmasının Trapped Ion Mobility Spectrometry-Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (TIMS-QTOF-MS) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. ESI-IM-TOF-MS analizleri için örnek çözeltileri 3,0 μl/dk. akış hızında direkt enjeksiyon yöntemiyle ESI kaynağına gönderilmiş ve 2 dakika boyunca veriler kayıt altına alınmıştır. Analizler öncesinde, tuzaklamalı iyon hareketliliği (TIMS) ve kütle analizör (TOF) ölçümlerinin her ikisinin de kalibrasyonu sağlanmıştır. Kütle spektrumları pozitif iyon modunda kayıt altına alınmıştır. Analizler için optimize edilen ESI-IM-TOF-MS parametreleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. Optimize edilen ESI-IM-TOF-MS parametreleri.

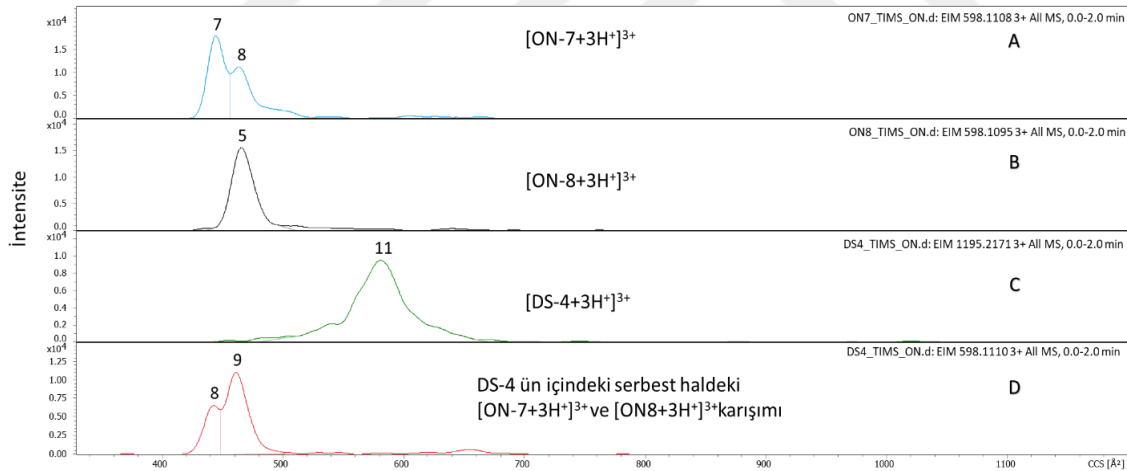
İyonlaşma modu	Pozitif
Gaz sıcaklığı	180 °C
Kurutucu gaz	5.0 L/min.
Nebulizör gaz	0.4 bar
Kapiler voltaj	4500 V
Tuzak hücresi çarpışma enerjisi	15.0 eV
Kütle aralığı	300-3000 m/z
Spektrum Hızı (spectra rate)	3.28 Hz
1/Ko aralığı (indirgenmiş iyon hareketliliği sabitinin tersi)	0.54-1.94 V.s/cm ²
Tuzaklama zamanı	300.0 ms

Kütle spektrumunda gözlenen her bir iyondan elde edilen ekstrakte edilmiş iyon mobilogramlarından (extracted ion mobilogram) yola çıkılarak etkin çarpışma kesiti-CCS değişimleri değerlendirilmiştir. Çizelge 4.13’te oligonükleotit ve çift iplik DNA’ya ait kütle/yük değeri, konformer sayısı, etkin çarpışma kesiti değerleri topluca verilmiştir.

Şekil 4.29’da yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A’da ON7 kodlu oligonükleotitin m/z değeri 598,11 olan +3 yüklü iyonu 2 farklı konformer içermekte olup bunlar baskın olan 7 numaralı kompakt konformer ve 8 numaralı geniş konformerlerdir. B’de ON8 kodlu oligonükleotitin m/z değeri 598,11 olan +3 yüklü iyonu 5 kodlu kompakt tek konformer içermektedir. C’de m/z değeri 1195,22 olan DS-4’e ait +3 yüklü iyonun ise tek kompakt konformeri olduğu görülmektedir. D’de m/z değeri 598,11 olan +3 yüklü iyonun 2 farklı konformer içerdiği ve bu konformerlerin DS-4 çift iplik DNA’nın içerisinde bulunan serbest haldeki oligonükleotit karışımına ait olduğu belirlenmiştir. Ortamda ON8’deki kompakt tek konformerin baskın olduğu ve ON7’deki geniş

konformer ile karışım halinde bulunduğu ve karışım halindeki 9 numaralı bu konformerin ON7'deki 7 numaralı kompakt konformerden daha yoğun olduğu görülmüştür.

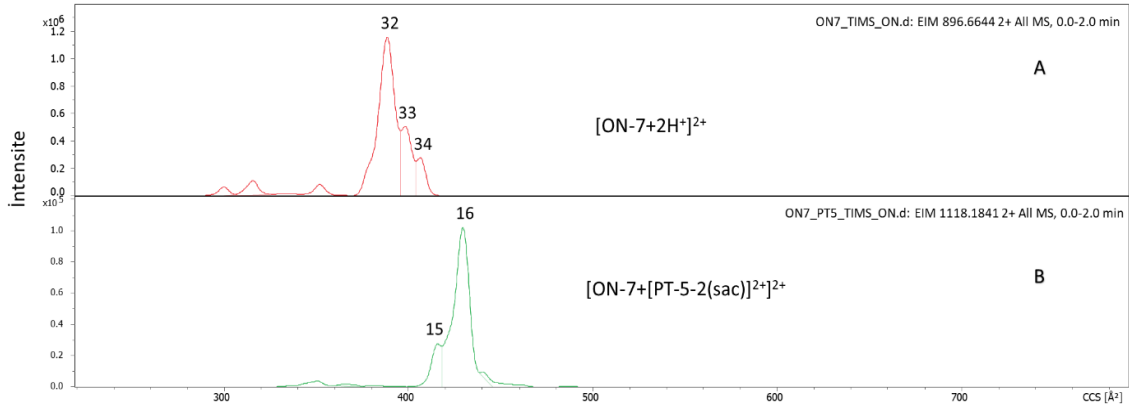
DS-4'ü oluşturan baz dizilimleri incelendiğinde 6 baz çiftinden oluşan çift sarmalın 4 baz çiftinin guanin-sitozinden oluştuğu görülmektedir. Burada G-C baz çiftleri arasındaki 3 hidrojen bağı ve A-T baz çiftleri arasında oluşan 2 hidrojen bağı ile molekül içi etkileşimlerin kuvvetlenmesinin etkisiyle yapı daha dar bir alanı kaplayan bir adet kompakt yapıda konformer oluşturmuş olabileceği düşünülmüştür. Etkin çarpışma kesiti değerleri de bu yorumu desteklemektedir. DS-4'ü oluşturan ON7 kodlu oligonükleotitin 2 konformerinin etkin çarpışma değerleri sırasıyla 445,00 Å² ve 464,00 Å² ve ON8 kodlu oligonükleotitin tek konformerinin etkin çarpışma değeri 466,20 Å²'dur. Bu iki oligonükleotit düzlemsel şekilde birbirleriyle birleşmiş olsalardı DS-4 için etkin çarpışma kesiti değerinin 911,20-930,20 Å² aralığında olması beklenirdi ancak, DS-4 için oluşan tek konformerin etkin çarpışma kesiti değeri 581,40 Å² bulunmuştur. 581,40 Å² olan etkin çarpışma kesiti değeri oligonükleotitlerin birbirleriyle etkileşime girerek yapıyı küçültüp çift sarmal haline getirdiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4. 29. A)ON7 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun, B)ON8 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun, C)DS-4 kodlu çift iplik DNA'ya ait +3 yüklü iyonun ve D) DS-4 kodlu çift iplik DNA'nın içindeki serbest haldeki +3 yüklü ON7 ve +3 yüklü ON8 kodlu oligonükleotit iyonlarının karışımına ait etkin çarpışma kesiti grafikleri.

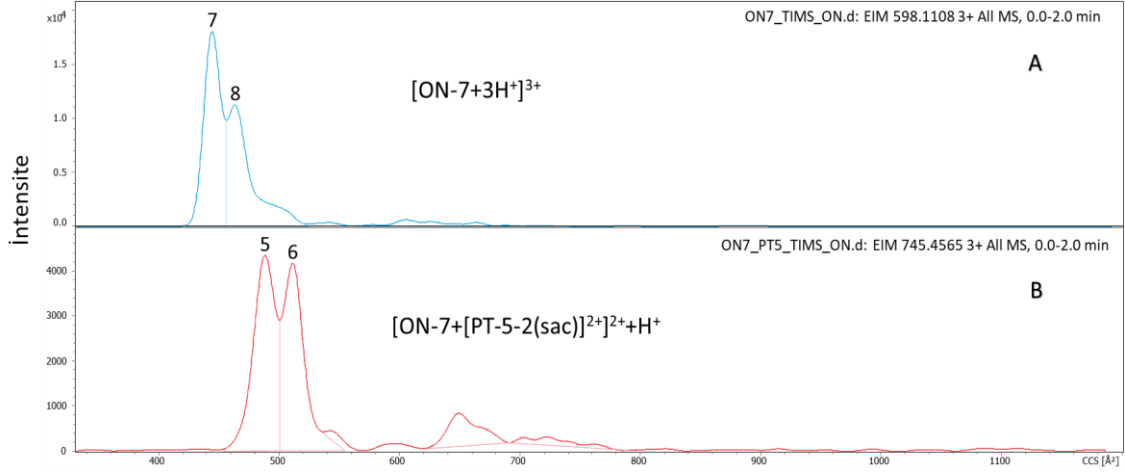
Şekil 4.30'da yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A'da [ON-7+2H⁺]²⁺ iyonunun yaklaşık 3 konformere sahip olduğu görülürken B'de ON-7 ile boya etkileşmesiyle meydana gelen kompleks oluşumuyla birlikte yapıda bir büyüme gerçekleşmekte, CCS değeri artmakta, yapı 2 konformere indirgenmekte olup yapıda bu

konformerlerden geniş konformerin daha baskın olduğu gözlenmektedir. Çizelge 4.13'teki etkin çarpışma kesiti değerlerindeki artış da bu yorumu desteklemektedir.



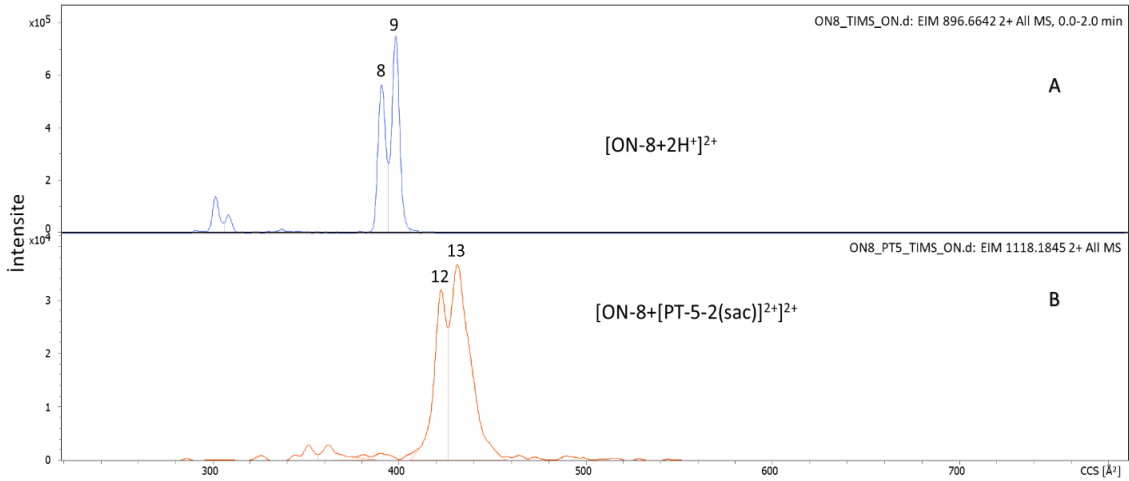
Şekil 4. 30. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-5-2(sac)]²⁺]²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

Şekil 4.31'de yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; B'de ON-7 kodlu oligonükleotit ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimi sonrası ON-7'ye bir adet boya katılmasıyla oluşan +3 yüklü [ON-7+[PT-5-2(sac)]²⁺]²⁺+H⁺ iyonuna ait grafikte 2 farklı konformerin olduğu ve her iki konformerin de bağıl olarak benzer bolluklarda olduğu görülmektedir. Yapıya bir adet boya katılmasıyla A'da yer alan ON-7 kodlu oligonükleotitin m/z değeri 598,11 olan +3 yüklü iyonuna ait 8 numaralı geniş konformere denk gelen B'deki 6 numaralı geniş konformerin etkileşimle birlikte ortamdaki bolluğunun arttığı görülmektedir. ON-7 ile boya etkileşmesiyle birlikte yapıda bir büyüme gerçekleşmekte ve daha baskın olan kompakt konformer yerine etkileşimde geniş konformenin bağıl olarak bolluğunun artarak kompakt konformer ile benzer bolluğa eriştiği görülmüştür.



Şekil 4. 31. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-5-2(sac)]²⁺]+H⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

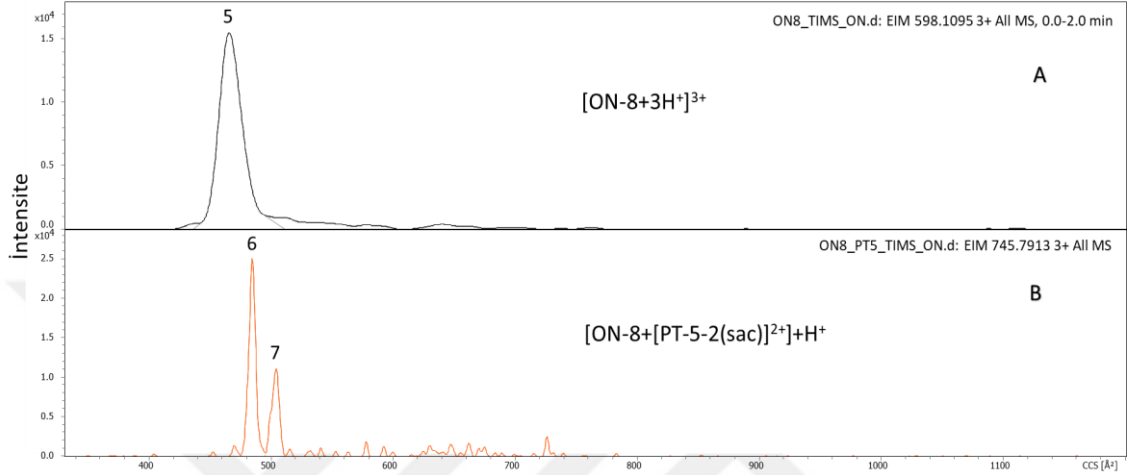
Şekil 4.32’de yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A’da $[ON-8+2H^+]^{2+}$ iyonunun 2 konformere sahip olduğu görülürken B’de ON-8 kodlu oligonükleotit ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimi sonrası ON-8’e bir adet boya katılmasıyla oluşan +2 yüklü $[ON-8+[PT-5-2(sac)]^{2+}]^{2+}$ iyonuna ait grafikte kompleks oluşumuyla birlikte yapının daha büyük etkin çarpışma kesiti değerine kaydığı yani yapının büyüdüğü ve genişlediği, her iki konformerin de bağıl olarak benzer bolluğa eriştiği gözlenmiştir.



Şekil 4. 32. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-8+[PT-5-2(sac)]²⁺]²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

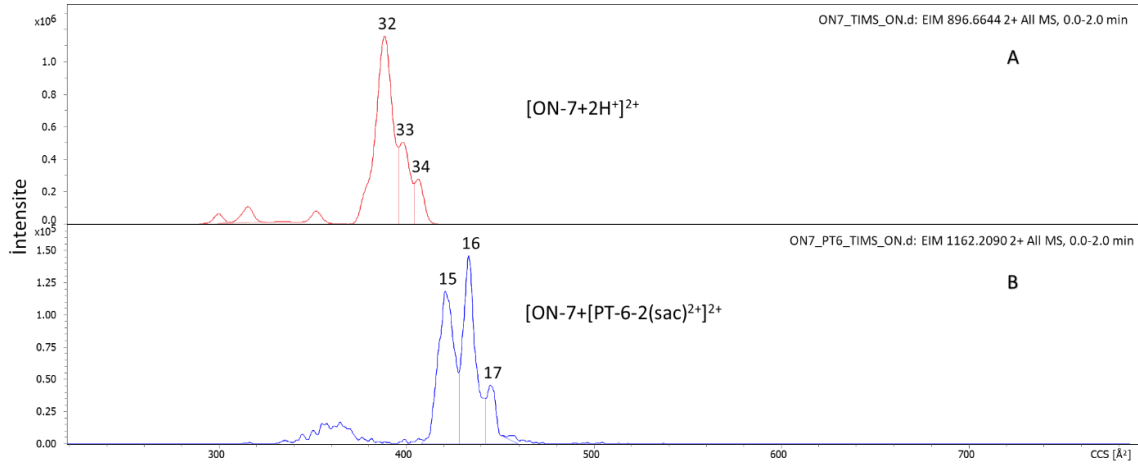
Şekil 4.33’te yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A’da $[ON-8+3H^+]^{3+}$ iyonunun baskın tek konformere sahip olduğu görülürken B’de ON-8 kodlu oligonükleotit ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimi sonrası ON-8’e bir adet boya

katılmasıyla oluşan +3 yüklü $[\text{ON-8} + [\text{PT-5-2}(\text{sac})]^{2+}]^{2+} + \text{H}^+$ iyonuna ait grafikte kompleks oluşumuyla birlikte yapıda iki konformer olduğu gözlenmiştir. Oluşan bu iki konformerden kompakt olanın daha baskın olduğu görülmüştür. Bu sonuçla birlikte oligonükleotide boya katılmasıyla birlikte yapının daralarak daha kompakt şekilde büyüdüğü yorumu yapılmıştır.



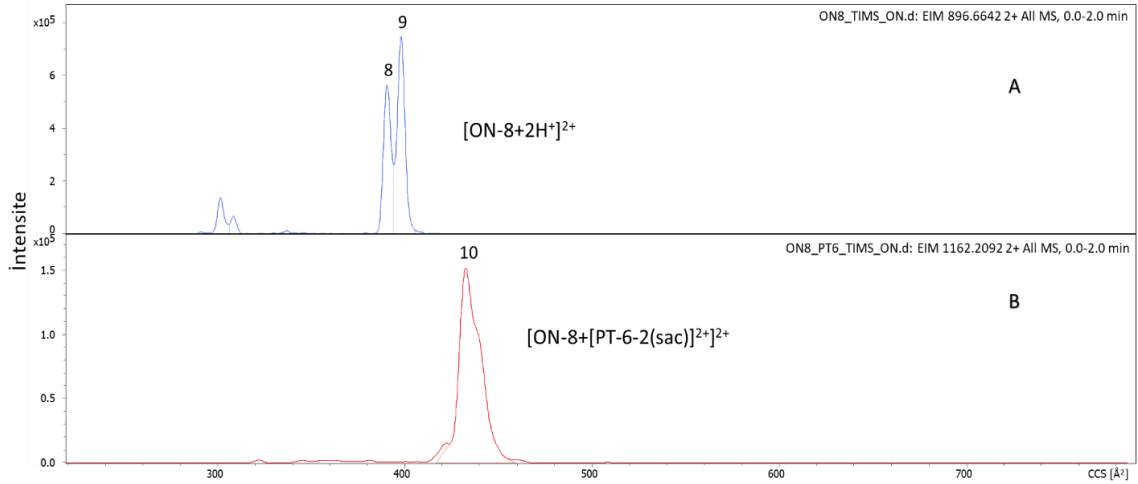
Şekil 4. 33. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +3 yüklü iyonun ve B)[ON-8+[PT-5-2(sac)]²⁺]²⁺+H⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

Şekil 4.34'te yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A'da $[\text{ON-7} + 2\text{H}^+]^{2+}$ iyonunun yaklaşık 3 konformere sahip olduğu görülürken B'de ON-7 ile boya etkileşmesiyle meydana gelen kompleks oluşumuyla birlikte yine 3 konformer olduğu gözlenmiştir. Oligonükleotide bir adet boya katılması olduğunda kompakt konformere kıyasla orta konformerin daha baskın olduğu ve konformer bolluklarının değiştiği yorumu yapılmıştır.



Şekil 4. 34. A)ON-7 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B)[ON-7+[PT-6-2(sac)]²⁺]²⁺ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

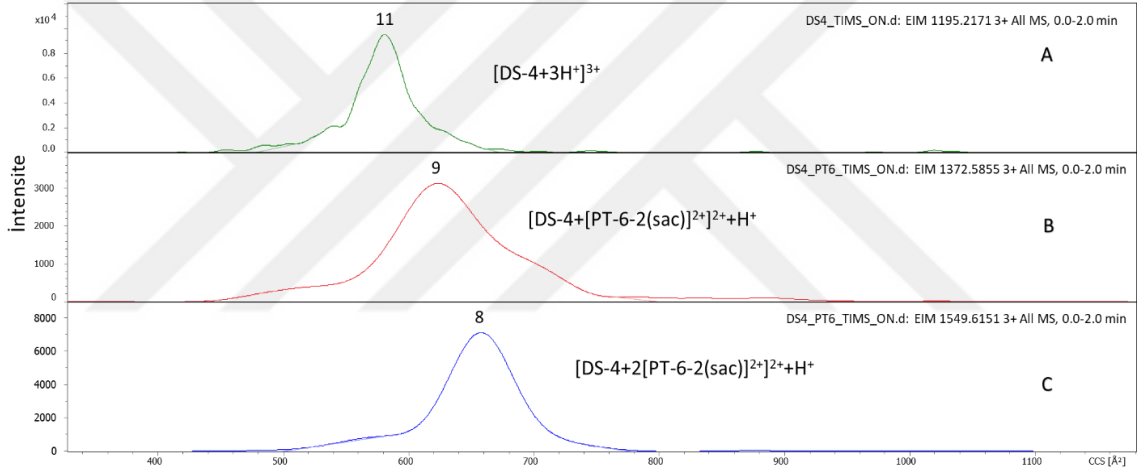
Şekil 4.35'te yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A'da $[ON-8+2H^+]^{2+}$ iyonunun 2 konformere sahip olduğu görülürken B'de ON-8 kodlu oligonükleotit ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimi sonrası ON-8'e bir adet boya katılmasıyla oluşan yapının baskın olan tek bir konformere indirgendiği gözlenmektedir. Oligonükleotide bir adet boya katılmasıyla oluşan kompakt konformerin bolluğunun değiştiği yorumu yapılmıştır.



Şekil 4. 35. A)ON-8 kodlu oligonükleotide ait +2 yüklü iyonun ve B) $[ON-8+[PT-6-2(sac)]^{2+}]^{2+}$ iyonun etkin çarpışma kesiti grafikleri.

Şekil 4.36'da yer alan etkin çarpışma kesiti grafikleri incelendiğinde; A'da $[DS-4+3H^+]^{3+}$ iyonuna ait tek bir konformerin (CCS=581,40 Å²) olduğu, B'de DS-4 kodlu çift iplik DNA ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimi sonrası oluşan +3 yüklü $[DS-4+[PT-6-2(sac)]^{2+}]^{2+}+H^+$ iyonuna ait grafikte DNA'ya bir adet boya katılmasıyla yapının daha

geniş tek bir konformere ($CCS=624,10 \text{ \AA}^2$) dönüştüğü gözlenmiştir. C’de ise DS-4’e 2 adet boya katılmasıyla oluşan $[DS-4+2[PT-6-2(sac)]^{2+}]^{2+}-H^+$ iyonuna ait tek bir konformer ($CCS=661,30 \text{ \AA}^2$) olduğu ancak bu konformerin B’deki tek boya katılmasıyla oluşan konformer kadar geniş olmadığı görülmüştür. Etkin çarpışma kesiti değerlerinden de görüleceği üzere ikinci boya katılmasıyla birlikte çok önemli bir büyüme olmadığı, yapının daha az büyüdüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak birinci boya katılmasının elektrostatik etkileşimle DS-4’ün dış yüzeyine bağlanmış olduğu ve böylelikle geniş bir konformer elde edilmiş olduğu, ikinci boya katılmasının ise DS-4 çift zincirine girerek etkileşim oluşturduğu ve sarmal yapısını genişletmiş olduğu ancak birinci boya katılmasına nazaran yapıda daha az büyümeye yol açtığı yorumuna varılmıştır.



Şekil 4. 36. A) $[DS-4+3H^+]^{3+}$ iyonun, B) $[DS-4+[PT-6-2(sac)]^{2+}]^{2+}+H^+$ iyonun ve C) $[DS-4+2[PT-6-2(sac)]^{2+}]^{2+}+H^+$ etkin çarpışma kesiti grafikleri.

Bu bölümde iyon hareketliliği kütle spektrometrisi yöntemiyle yapılan analizler sonucunda; yapıların farklı yüklerde farklı konformerlere sahip olabildiği ve bunların da farklı konformasyonel özellikler gösterdiği gözlenmiştir. Aynı molekül kütlesine sahip ancak farklı dizilimdeki oligonükleotitlerin farklı konformasyonel özelliklere sahip oldukları, birbirleriyle eşlenik olan bu oligonükleotitlerin çift iplik DNA yapısına farklı katkılarının bulunduğu, bunların boyalarla etkileşimlerinde baz dizilimi seçiciliğiyle birlikte etkileşimlere ait kompleks yapılarda farklı konformasyonel özelliklerin olduğu, DNA ile birden fazla boya etkileşiminde her bir boya için eşit konformasyonel katkının olmadığı şeklinde bulgular elde edilmiştir.

MALDI-MS ve ESI-MS spektrumlarında etkileşim iyonlarına ait sinyallerin şiddeti düşük bulunmuştu ancak aynı yapılara ait iyon hareketliliği kütle spektrometresi ile alınan sonuçlar değerlendirildiğinde nükleik asit:boya etkileşimleri sonucunda daha büyük etkin çarpışma kesiti (CCS) değerine sahip farklı konformerlerin oluştuğu ve ayrıca çoklu stokiyometride etkileşimlerin farklı konformer ve CCS değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu tespitten yola çıkılarak her ne kadar kütle spektrumlarındaki etkileşim iyonlarına ait sinyal şiddetleri düşük olsa da iyon hareketliliği kütle spektrumlarındaki etkileşimlere ait her bir iyondan ekstrakte edilmiş iyon mobilogramlarından türetilen etkin çarpışma kesiti grafikleri okunarak etkileşimler sonucunda farklı konformerler oluştuğu ve daha büyük CCS değerleri elde edildiği bulguları nükleik asitler ile boyaların etkileşime girdiklerini desteklemektedir. Böylelikle nükleik asitlerle küçük moleküllerin etkileşimlerinin iyon hareketliliği kütle spektrometresi yöntemiyle rahatlıkla tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4. 13. Oligonükleotit ve çift iplik DNA'ya ait kütle/yük değeri, konformer sayısı, etkin çarpışma kesiti değerleri.

Tek iplik oligonükleotit & Çift iplik DNA kodu	Yük	Kütle/Yük (m/z)	Konformer sayısı	Etkin Çarpışma Kesiti değeri (CCS, Å ²)
ON-7	3	598,11	2 (7 ve 8 numaralı)	445,00 (7 numaralı)
		[ON-7+3H ⁺] ³⁺		464,00 (8 numaralı)
	2	896,66	3 (32, 33 ve 34 numaralı)	388,80 (32 numaralı)
		[ON-7+2H ⁺] ²⁺		398,50 (33 numaralı)
ON-8	3	598,11	1 (5 numaralı)	406,70 (34 numaralı)
		[ON-8+3H ⁺] ³⁺		466,20 (5 numaralı)
	2	896,66	2 (8 ve 9 numaralı)	390,90 (8 numaralı)
		[ON-8+2H ⁺] ²⁺		398,50 (9 numaralı)
DS-4	3	1195,22	1 (11 numaralı)	581,40 (11 numaralı)
DS-4'ün içindeki serbest haldeki ON-7 ve ON-8 kodlu oligonükleotitler	3	598,11	2 (8 ve 9 numaralı)	443,10 (8 numaralı)
		[ON-7+3H ⁺] ³⁺ ve [ON-8+3H ⁺] ³⁺		461,70 (9 numaralı)
ON-7-PT-5	2	1118,18	4 (15 ve 16 numaralı)	416,10 (15 numaralı)
		[ON-7+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺		429,80 (16 numaralı)
	3	745,46	2 (5 ve 6 numaralı)	488,90 (5 numaralı)
		[ON-7+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺		511,90 (6 numaralı)

Çizelge 4.13. Oligonükleotit ve çift iplik DNA'ya ait kütle/yük değeri, konformer sayısı, etkin çarpışma kesiti değerleri (devam ediyor).

Tek iplik oligonükleotit & Çift iplik DNA kodu	Yük	Kütle/Yük (m/z)	Konformer sayısı	Etkin Çarpışma Kesiti değeri (CCS, Å ²)
ON-8-PT-5	2	1118,18 [ON-8+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺	2 (12 ve 13 numaralı)	422,80 (12 numaralı)
				431,50 (13 numaralı)
	3	745,79 [ON-8+[PT-5-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺	2 (6 ve 7 numaralı)	485,40 (6 numaralı)
				504,80 (7 numaralı)
ON-7-PT-6	2	1162,71 [ON-7+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺	3 (3,4 ve 5 numaralı)	421,80 (3 numaralı)
				433,50 (4 numaralı)
				445,90 (5 numaralı)
ON-8-PT-6	2	1162,21 [ON-8+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺	1 (10 numaralı)	432,90 (1 numaralı)
DS-4-PT-6	3	1372,59 [DS-4+[PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺	1 (9 numaralı)	624,10 (5 numaralı)
DS-4-2PT-6	3	1549,62 [DS-4+2 [PT-6-2(sac)] ²⁺] ²⁺ +H ⁺	1 (8 numaralı)	658,30 (3 numaralı)

4.2.1.3. Aptamerler ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin kütle spektrometrik analizleri

Aptamerler, yapay olarak sentezlenen tek iplikli DNA veya RNA oligonükleotitlerinden oluşan kısa dizilerdir. Hedef molekül ile yüksek seçicilikte ve özgün olarak etkileşime girerek van der Waals etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, baz çifti etkileşimleri, aromatik halka istifelenmesi gibi etkileşimlerle kararlılıklarını sağlamaktadır [172],[173]. Oligonükleotitler termal olarak yüksek kararlılıkta yapılardır. Nükleik asit yapılı aptamerler; yüksek kararlılıkları, özgünlükleri, yüksek bağlanma ilgileri gibi özellikleriyle tıpta teşhis, tanı, ilaç geliştirme, ilaç salınım sistemlerinde birçok alanda kullanılmaktadır [174].

4.2.1.3.1. APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri

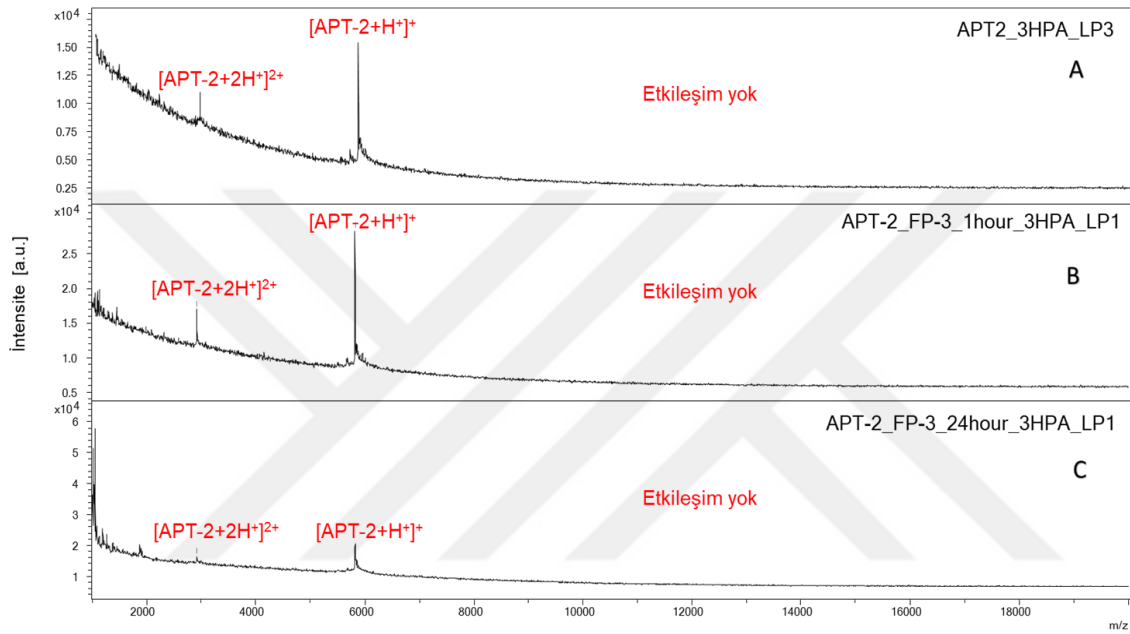
Eşit derişimde ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-2 kodlu aptamer ile boyaların etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla; 7 pmol/µl derişimdeki APT-2 stok çözeltisi ile daha önce 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan stok boya çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 7 pmol/µl derişimde hazırlanan boyalar hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 1 ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanış prosedürü daha önce detaylı olarak anlatılan 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Rapiflex MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve reflektör pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

APT-2 kodlu aptamer ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.37'deki spektrumlar incelendiğinde;

-A'da yer alan APT-2 karakterizasyonuna ait spektrumda; $[APT-2+H^+]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B’de yer alan APT-2-FP-3 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.

-C’de yer alan APT-2-FP-3 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.



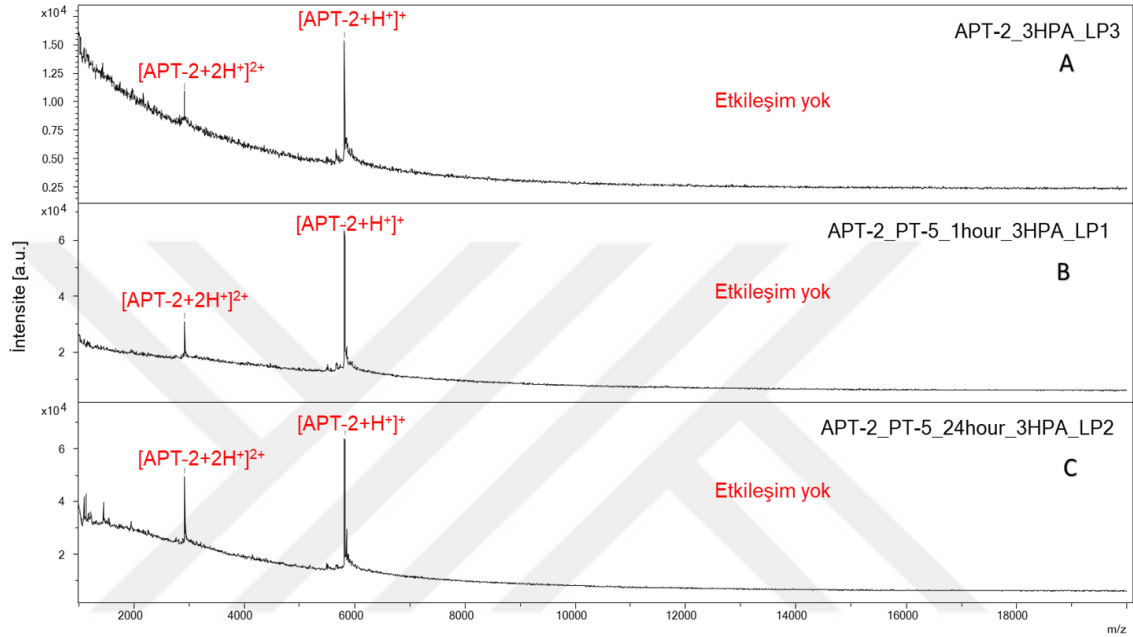
Şekil 4. 37. A) APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-FP-3’ün 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-FP-3’ün 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

APT-2 kodlu aptamer ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.38’deki spektrumlar incelendiğinde;

-A’da yer alan APT-2 karakterizasyonuna ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B’de yer alan APT-2-PT-5 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.

-C’de yer alan APT-2-PT-5 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.



Şekil 4. 38. A) APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-PT-5’in 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-PT-5’in 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

APT-2 kodlu aptamer ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.39’daki spektrumlar incelendiğinde;

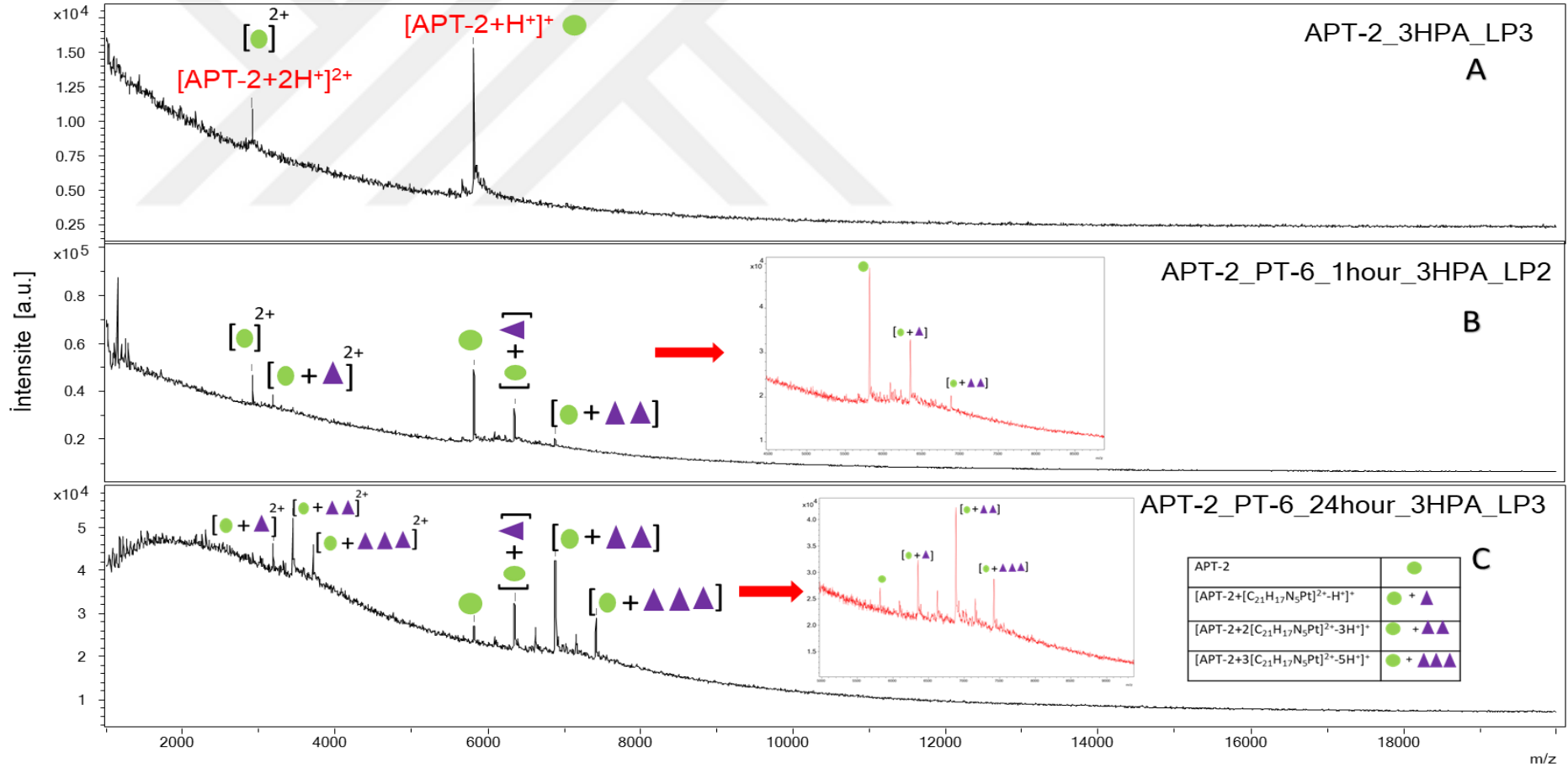
-A’da yer alan APT-2 karakterizasyonuna ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B’de yer alan APT-2-PT-6 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$ ve $[APT-2+2H^+]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüştür. PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapının aptamere bağlanarak

bir proton kaybetmesiyle oluşan $[APT-2+[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-H^+]^+$ yapısına ait sinyal ve bu yapının çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür. PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapıdan 2 tanesinin aptamere bağlandığı ve 3 adet proton ayrılmasıyla oluşan $[APT-2+2[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-3H^+]^+$ yapısına ait iyon tespit edilmiştir.

-C’de yer alan APT-2-PT-6 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-2+H^+]^+$, $[APT-2+[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-H^+]^+$ ve $[APT-2+2[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-3H^+]^+$ iyonlarına ait sinyaller ve bunların çift yüklü iyonlarına ait sinyaller tespit edilmiştir. Ayrıca PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapıdan 3 tanesinin aptamere bağlandığı ve 5 adet H^+ iyonu ayrılmasıyla oluşan $[APT-2+3[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-5H^+]^+$ yapısına ait sinyal görülmüştür.





Şekil 4. 39. A) APT-2 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

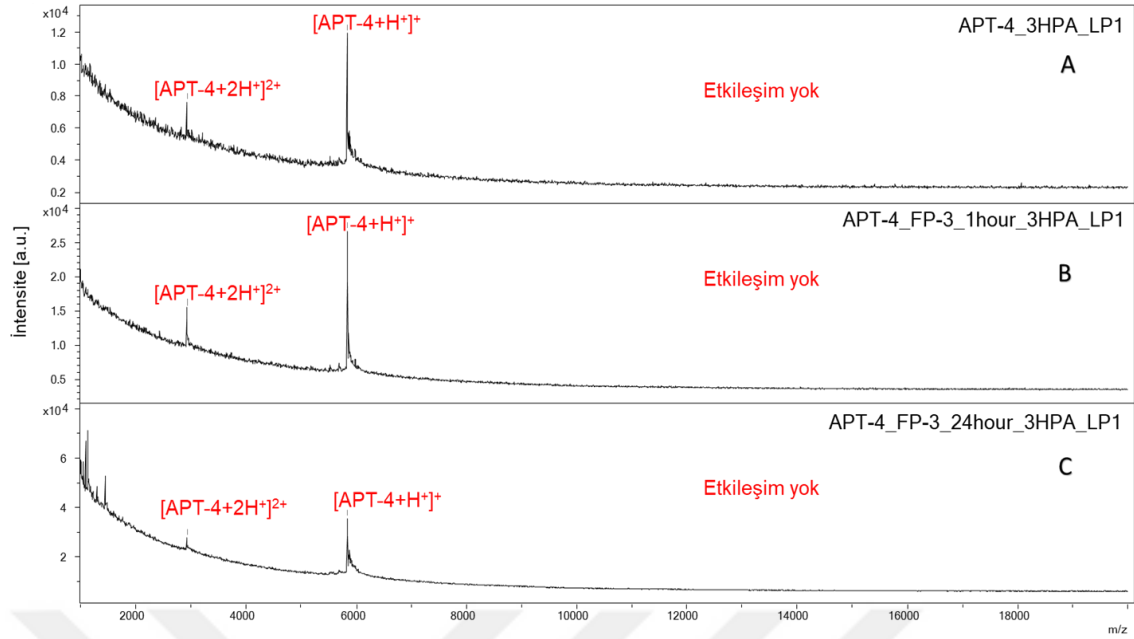
Eşit derişimde ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-4 kodlu aptamer ile boyaların etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla; 7 pmol/μl derişimdeki APT-4 stok çözeltisi ile daha önce 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan stok boya çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 7 pmol/μl derişimde hazırlanan boyalar hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 1 ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanış prosedürü daha önce detaylı olarak anlatılan 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI TissueTyper™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değiştirilerek lineer ve reflektör pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

APT-4 kodlu aptamer ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.40'taki spektrumlar incelendiğinde;

-A'da yer alan APT-4 karakterizasyonuna ait spektrumda; $[APT-4+H]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-4+2H]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B'de yer alan APT-4-FP-3 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-4+H]^+$ ve $[APT-4+2H]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.

-C'de yer alan APT-4-FP-3 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda $[APT-4+H]^+$ ve $[APT-4+2H]^{2+}$ iyonuna ait sinyal görülmüş olup etkileşime ait sinyal görülmemiştir.



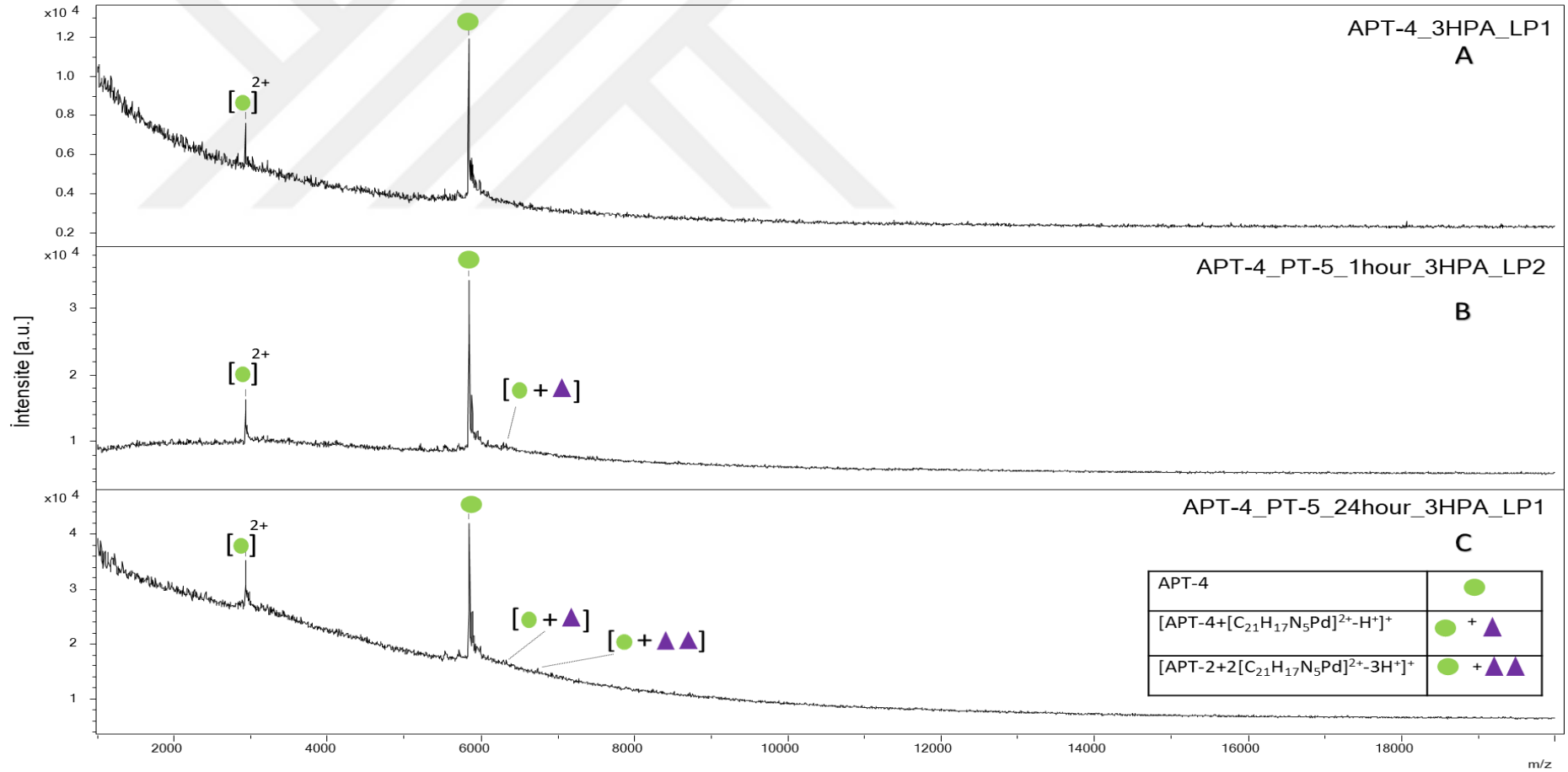
Şekil 4. 40. A) APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-FP-3'ün 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

APT-4 kodlu aptamer ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.41'deki spektrumlar incelendiğinde;

-A'da yer alan APT-4 karakterizasyonuna ait spektrumda; $[APT-4+H^+]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-4+2H^+]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B'de yer alan APT-4-PT-5 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; $[APT-4+H^+]^+$ ve $[APT-4+2H^+]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller ile PT-5 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapının aptamere bağlanarak bir proton kaybetmesiyle oluşan $[APT-4+[C_{21}H_{17}N_5Pd]^{2+}-H^+]^+$ yapısına ait sinyal görülmüştür.

-C'de yer alan APT-4-PT-5 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; $[APT-2+H^+]^+$, $[APT-2+[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-H^+]^+$ ve PT-5 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapıdan 2 tanesinin aptamere bağlandığı ve 3 adet proton ayrılmasıyla oluşan $[APT-4+2[C_{21}H_{17}N_5Pd]^{2+}-3H^+]^+$ yapısına ait iyon tespit edilmiştir.



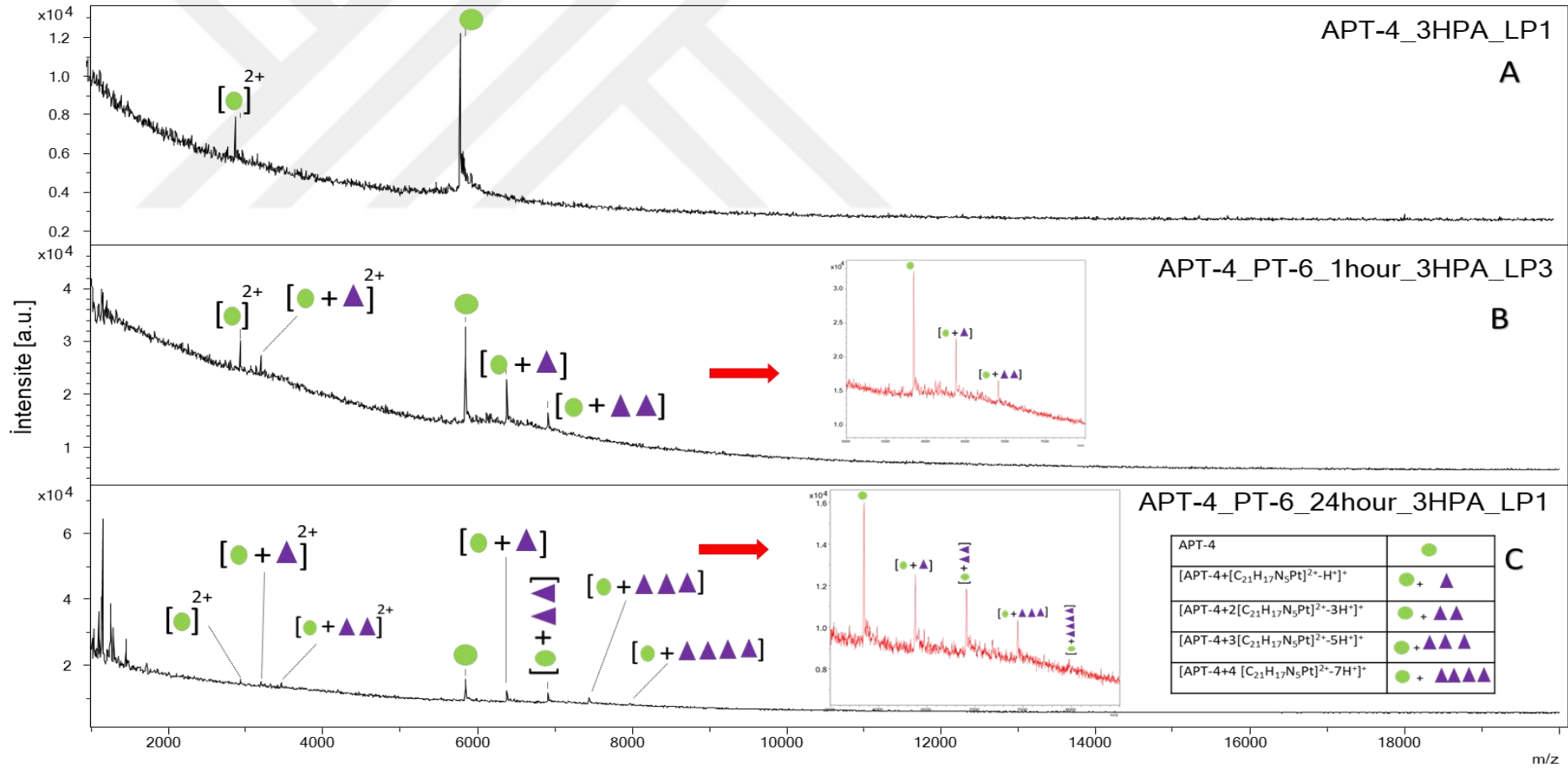
Şekil 4. 41. A) APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-PT-5'in 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

APT-4 kodlu aptamer ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.42'deki spektrumlar incelendiğinde;

-A'da yer alan APT-4 karakterizasyonuna ait spektrumda; $[APT-4+H^+]^+$ aptamerin protone olmuş moleküler iyon piki ve $[APT-4+2H^+]^{2+}$ çift yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür.

-B'de yer alan APT-4-PT-6 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; $[APT-4+H^+]^+$ ve $[APT-4+2H^+]^{2+}$ iyonlarına ait sinyaller ile PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapının aptamere bağlanarak bir proton kaybetmesiyle oluşan $[APT-4+[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-H^+]^+$ yapısına ait sinyal ile bu yapının +2 yüklü iyonuna ait sinyal görülmüştür. Ayrıca, PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapıdan 2 tanesinin aptamere bağlandığı ve 3 adet proton ayrılmasıyla oluşan $[APT-4+2[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-3H^+]^+$ yapısına ait iyon da tespit edilmiştir.

-C'de yer alan APT-4-PT-6 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; $[APT-4+H^+]^+$, $[APT-4+2H^+]^{2+}$, $[APT-4+[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-H^+]^+$, $[APT-4+2[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-3H^+]^+$ ve PT-6 kodlu boyadan 2 adet sakkarinat iyonu ayrılmasıyla oluşan yapının aptamere bağlanarak 7 proton kaybetmesiyle oluşan $[APT-4+4[C_{21}H_{17}N_5Pt]^{2+}-7H^+]^+$ yapısına ait sinyal tespit edilmiştir.



Şekil 4. 42. A) APT-4 karakterizasyonuna ait MALDI kütle spektrumu, B) APT-4-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 1 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve C) APT-4-PT-6'nın 1:1 etkileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.

Eşit derişimde ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların kovalent olmayan etkileşimlerinin incelendiğı MALDI kütle spektrometrisi analizleri sonucunda;

-FP-3 kodlu boyanın aptamerler ile etkileşime girmediğı görölmüştür.

-PT-5 kodlu boyanın APT-2 ile etkileşime girmediğı, APT-4 ile 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1:1 (aptamer:boya) stokiyometride, 24 saatlik etkileşim sonrasında hem 1:1 hem de 1:2 (aptamer:boya) stokiyometride etkileşime girdiğı görölmüştür.

-PT-6 kodlu boyanın APT-2 ile 1 saatlik inkübasyon sonrasında 1:1 ve 1:2 (aptamer:boya) stokiyometride, 24 saatlik etkileşim sonrasında 1:1, 1:2 ve 1:3 (aptamer:boya) stokiyometride etkileşime girdiğı görölmüştür. APT-4 ile 1 saatlik inkübasyon sonrasında 1:1 ve 1:2 (aptamer:boya) stokiyometride, 24 saatlik etkileşim sonrasında 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 (aptamer:boya) stokiyometride etkileşime girdiğı görölmüştür.

Platin komplekslerinin, nükleik asitlerin guanin bazlarının N7 atomunun Pt(II) merkezine bağlanması ve bu bağlanmanın daha sonra DNA'daki komşu pürin bazları (%60-65 oranında 1,2-GG veya % 20-25 oranında 1,2-AG) arasında yaklaşık %90 oranında iplik içi veya iplikler arası çapraz bağlar oluşturmaları ile oluştuğı ayrıca, nadiren de olsa adenin ve sitozinin de N atomları aracılığıyla da platinin bağlandığı bilinmektedir. Paladyum bileşiklerinin yüksek reaktivitelerinin, yapısal bütünlüklerini DNA'ya ulaşacak kadar uzun süre korumalarına izin vermemeleri nedeniyle kararlı etkileşimler oluşturup antikanser ajanları olarak kullanımları zordur.

Aptamerlerin dizilimleri incelendiğinde APT-2'de (5' [AmC6T] TTTGGTTGGTGTGGTTGG 3') yan yana 4 adet GG bazları ile iki adet GXG dizilimi bulunduğı görölmekle birlikte APT-4'te (5' [AmC6T] AAAGGTTGGTGTGGTTGG 3') ise ardışık 4 adet GG baz diziliminin yanı sıra AAA baz dizilimi ile iki adet GXG dizilimi de bulunmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmada; paladyum (II) içeren PT-5 ve platin (II) içeren PT-6 kodlu boyaların APT-4 ile etkileşimleri APT-2'ye kıyasla stokiyometrik olarak daha fazladır. Bu durumda PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların APT-2 ve APT-4 ile etkileşimlerinin literatürle uyumlu olarak baz dizilimine bağımlı şekilde gerçekleştiğı yorumu yapılabilmektedir.

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlara göre paladyum (II) içeren PT-5 kodlu boya ile aptamer etkileşimlerinin, platin (II) içeren PT-6 kodlu boya etkileşimlerine göre daha kararsız olduğu görölmüştür. Paladyum (II) metalinin ligand değişim kinetiğinin çok

hızlı olması nedeniyle yapısal bütünlüğünü uzun süre koruyamaması sonucunda etkileşim ortamında daha kararsız yapıda bulunması sebebiyle literatür ile uyumlu olarak nükleik asitler ile daha kararsız etkileşime girdiği sonucuna ulaşılmıştır.

4.2.1.3.2. APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimlerinin ESI-QTOF-MS ile analizleri

Bağlanma seçiciliği ile potansiyelinin değerlendirilmesi ve daha önce yapılmış olan MALDI-TOF-MS analizleri sonuçlarının karşılaştırılması amacıyla APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimleri ESI-QTOF kütle spektrometresi ile de incelenmiştir.

7 pmol/μl derişimde hazırlanan aptamerler ile 7 pmol/μl derişimde hazırlanan FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılmış olan ve 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonrası etkileşimlerinin elektrosprey iyonlaşmalı kütle spektrometrisi analizleri Bruker Daltonics (Almanya) firmasının Trapped Ion Mobility Spectrometry-Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (tims-QTOF-MS) cihazı kullanılarak pozitif ve negatif iyon modlarında gerçekleştirilmiştir. Pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir.

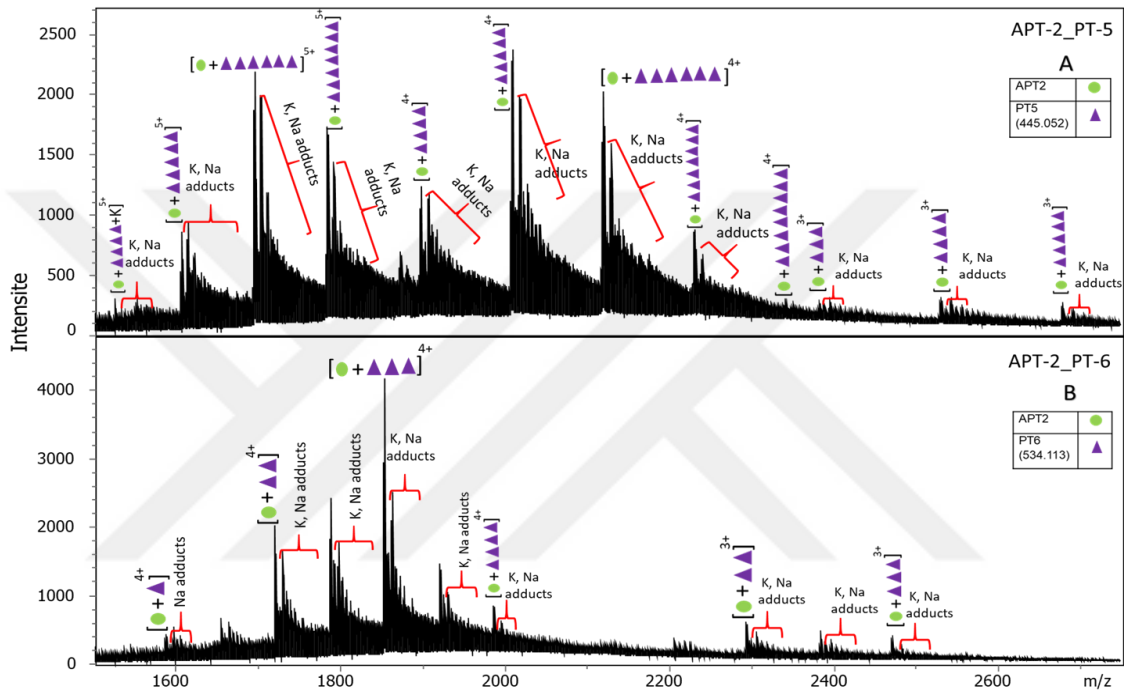
Spektrumlarda PT-5 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pd]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 445,05 Da) PT-5 olarak anılmaktadır. PT-6 kodlu boyadan 2 sakkarinat anyonu ayrılmasıyla oluşan yapı olan $[C_{21}N_5H_{17}Pt]^{2+}$ yapısı (Monoizotopik kütlesi: 534,11 Da) PT-6 olarak anılmaktadır. İyonlaşma şekillerinden bağımsız olarak aptamer-boya etkileşimleri değerlendirilmiştir.

APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile FP-3 kodlu boya etkileşimi için pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda; FP-3 kodlu boyanın her iki aptamer ile etkileşime girmediği tespit edilmiş olup bu tespit MALDI-TOF-MS sonuçlarına ilaveten ESI-QTOF-MS analizleri sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Aptamer-FP3 karışımlarına ait spektrumlara tez metni kapsamında yer verilmemiştir.

APT-2 kodlu aptamer ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.43.A’daki spektrum incelendiğinde; 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 ve 1:8 stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu ve

bunların çoklu yüklenmeleri (+3, +4 ve +5) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.

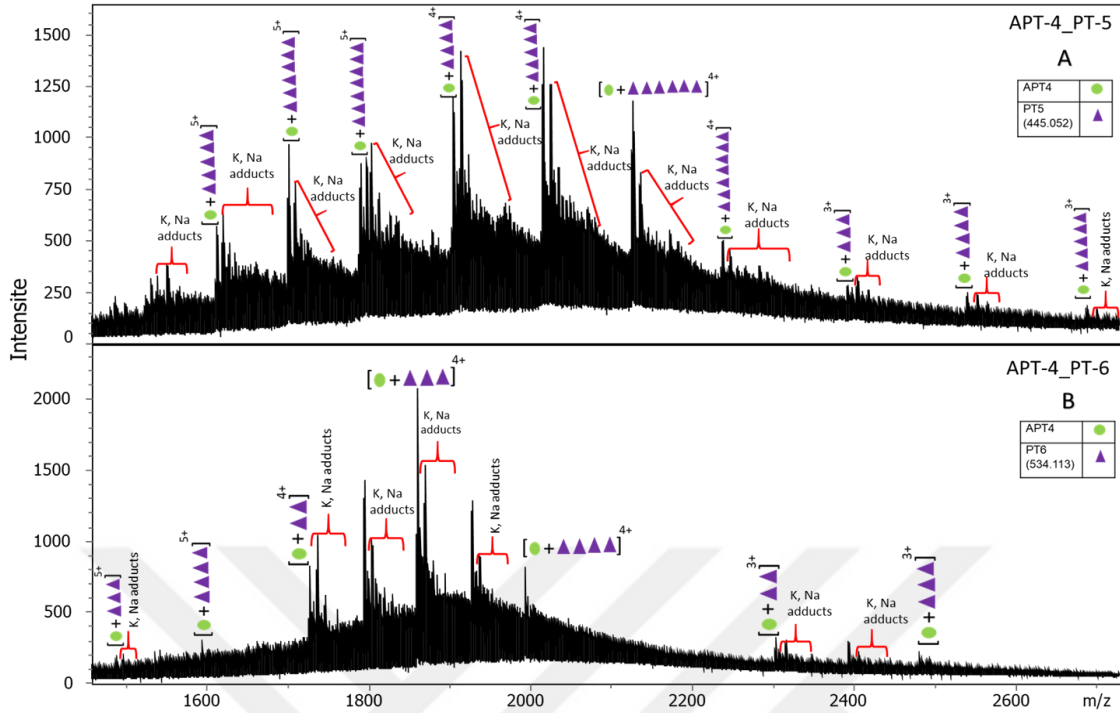
APT-2 kodlu aptamer ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.43.B'deki spektrum incelendiğinde; 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu ve bunların çoklu yüklenmeleri (+3 ve +4) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 43. A) APT-2-PT-5 ve B) APT-2-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası ESI kütle spektrumu.

APT-4 kodlu aptamer ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.44.A'daki spektrum incelendiğinde; 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 ve 1:7 stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu ve bunların çoklu yüklenmeleri (+3, +4 ve +5) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.

APT-4 kodlu aptamer ile PT-6 kodlu boyanın etkileşimleri sonucunda pozitif iyon modunda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.44.B'deki spektrum incelendiğinde; 1:2, 1:3 ve 1:4 stokiyometrilere etkileşimlerin olduğu ve bunların çoklu yüklenmeleri (+3, +4 ve +5) ait iyonların ve bunların potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 44. A) APT-4-PT-5 ve B) APT-2-4-PT-6'nın 1:1 etkileşimlerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası ESI kütle spektrumu.

Eşit derişimde ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların kovalent olmayan etkileşimlerinin incelendiği ESI-kütle spektrometrisi analizleri sonucunda;

-FP-3 kodlu boyanın aptamerler ile etkileşime girmediği görülmüştür.

-PT-5 kodlu boyanın APT-2 ve APT4 ile çoklu stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür.

-PT-6 kodlu boyanın da APT-2 ve APT-4 ile çoklu stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür.

Aptamerlerin dizilimlerine göre; APT-2'de bulunan ardışık 4 adet GG bazları ile iki adet GXG dizilimi ve APT-4'te ise bitişik 4 adet GG baz diziliminin yanı sıra AAA baz dizilimi ile iki adet GXG dizilimi de bulunmaktadır. Bu çalışmada PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların APT-2 ve APT-4 ile etkileşimlerinin literatürle uyumlu olarak baz dizilimine bağımlı şekilde gerçekleştiği yorumu yapılabilmektedir.

MALDI-MS analizleri sonucunda paladyum (II) içeren PT-5 ve platin (II) içeren PT-6 kodlu boyaların APT-4 ile etkileşimleri APT-2'ye kıyasla stokiyometrik olarak daha fazla

olduğu tespit edilmiştir. Ancak ESI-MS analizleri sonucunda MALDI'den farklı olarak her iki aptamerler de benzer stokiyometrilere etkileşim gerçekleşmiş olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan MALDI-MS analizlerine zıt bir şekilde paladyum içeren PT-5 yapısının aptamerlerle platin içeren PT-6 yapısına kıyasla daha fazla stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür. Ancak etkileşimlere ait sinyal şiddetleri incelendiğinde platin bağlı iyonlara ait sinyal şiddetlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda platin etkileşimlerinin paladyum etkileşimlerine oranla daha kararlı olduğu yorumu yapılabilmektedir. Ancak her iki metal ile olan kompleksler için potasyum ve sodyum katılmalarına ait iyonların da olması sinyal şiddetlerini göreceli olarak düşürmüştür.

MALDI-TOF-MS ve ESI-QTOF-MS analizleri sonucunda her iki yöntemle de aptamer-boya etkileşimlerinin tayin edilebildiği görülmüştür. Ayrıca, MALDI-MS analizlerinde tespit edilemeyen etkileşime ait sinyallerin (APT-2-PT-5 etkileşimi) ESI-MS'te gözlemlendiği görülmüştür. MALDI'deki gaz fazı kararsızlığı ve ESI'nın daha yumuşak iyonlaştırma tekniği olması nedeniyle kovalent olmayan etkileşimlerin bozulmadan gaz fazına geçişinin sağlanabilmesi ile daha önce görülmeyen etkileşim sinyallerinin elektrosprey iyonlaştırma ile görülebildiği düşünülmüştür. Ancak etkileşim stokiyometrilere ve sinyal şiddetleri her iki yöntemde farklı bulunmuştur. Etkileşim tayinindeki bu farklılıkların nedenleri; her iki yöntem için iyonlaşma mekanizmalarındaki farklılık, tekli ve çoklu yüklenme özellikleri, ESI'da çoklu yüklenmenin sonucu olarak sinyal şiddetinde azalma, MALDI'de gaz fazında kompleks oluşumu, ESI'da çözelti fazında kompleks oluşumu olarak sayılabilir.

4.2.1.3.3. APT-2, APT-3, APT-4 ve APT-7 kodlu aptamerler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri

Eşit derişimde ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-2 kodlu aptamer ile boyaların etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla; 7 pmol/μl derişimdeki APT-2 stok çözeltisi ile daha önce 1,0 mg/ml derişimde hazırlanan stok boya çözeltilerinden 10 mM amonyum asetat tamponu (10 mM NaCl varlığında pH 7'de) ile seyreltilerek 7 pmol/μl derişimde hazırlanan boyalar hacimce eşit oranda (1:1) karıştırılarak 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.1.3.1. ve 4.2.1.3.2. bölümlerde eşit derişimde (7 pmol/μl) ve hacimce 1:1 oranında hazırlanan APT-2 ve APT-4 kodlu aptamerler ile boyaların etkileşimleri incelenmiş ve

FP-3 kodlu boya ile hiç etkileşim olmadığı görülmüştü. Bu çalışmada FP-3 kodlu boya etkileşimleri tekrar incelenmek üzere derişim ve hacim oranları değıştirilerek aptamerler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla; 7 pmol/μl derişimdeki aptamer stok çözeltileri ile çözücü olarak asetonitril kullanılarak 1,0 μg/ml (1,07 pmol/μl) derişimde hazırlanan FP-3 boya çözeltisi hacimce 1:12 oranında (aptamer:boya) karıştırılarak 15 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanış prosedürü daha önce detaylı olarak anlatılan 3-HPA matriksi ile analit:matriks oranı hacimce 1:1 (on spot) olacak şekilde hazırlanan örnekler MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker RapifleX MALDI Tissue typer™, Almanya) kütle spektrometresi ile lazer enerjisi değıştirilerek lineer ve refletron pozitif/negatif iyon modlarında ortalama 6000 lazer vuruşu toplanarak analiz edilmiştir. Lineer pozitif modda alınan kütle spektrumları daha iyi olduğu için bu sonuçlara yer verilmiştir. Lineer pozitif modda yapılan analizlerde yaklaşık 10 Da'luk kütle kayması görülmüştür. Spektrumlarda aptamerlere, FP-3 kodlu boyaya ve bunların etkileşimlerine ait sinyaller, iyonlaşma şekline bakılmaksızın spektrumlarda verilen sembol tablolarında belirtilen simgelerle ifade edilmiştir.

Farklı dizilimdeki aptamerler ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimi sonucunda lineer pozitif modda yapılan analizler sonucunda elde edilen Şekil 4.45'teki spektrumlar incelendiğinde;

-A'da yer alan APT-2-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; APT-2 kodlu aptamere 1 amonyum iyonu ve asetonitril katılmasıyla oluşan $[APT-2+NH_4^+-ACN]^+$ yapısına ait sinyal ile FP-3 kodlu boyaya 1 proton katılmasıyla oluşan $[FP-3+H^+]^+$ iyonla ait sinyal gözlenmiştir. Ayrıca APT-2 ile FP-3'ün etkileşimine ait $[APT-2+NH_4^+-ACN]+(FP-3+H^+)-H^+]^+$ iyon sinyali gözlenmiştir.

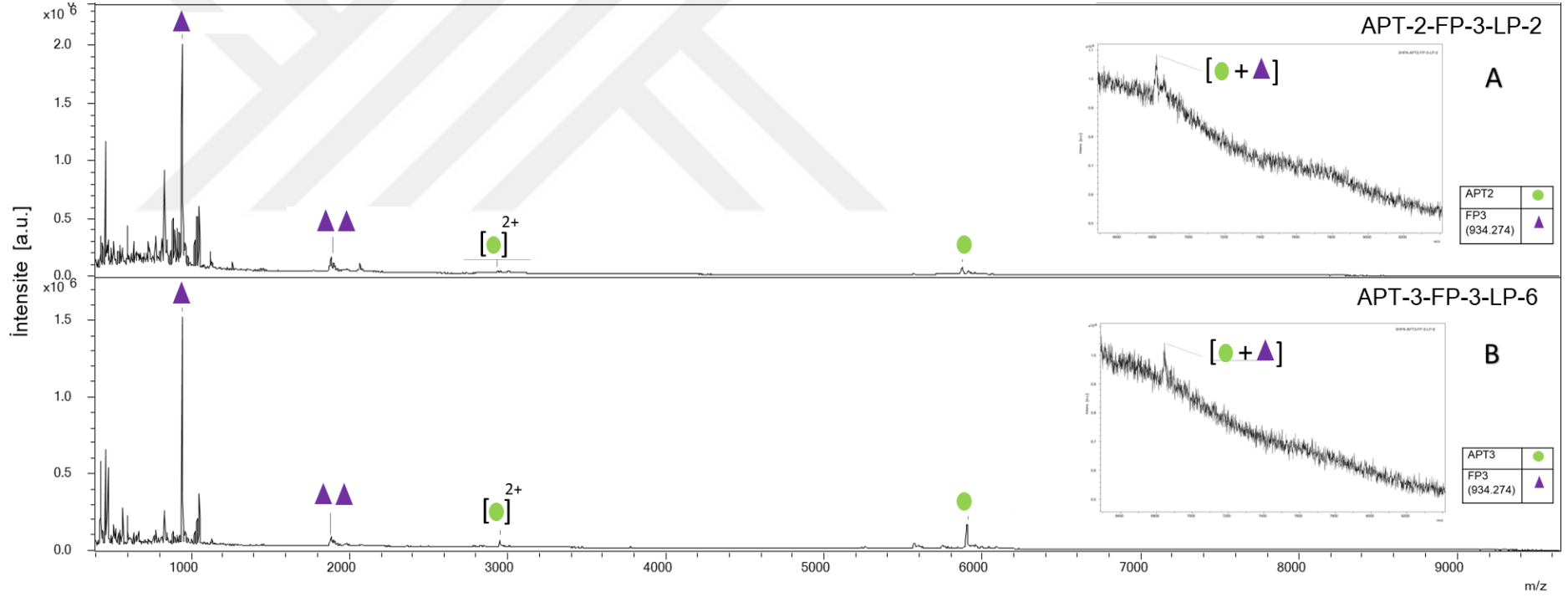
-B'de yer alan APT-3-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; APT-3 kodlu aptamere 3 amonyum iyonu ve 3 asetonitril katılmasıyla ve 2 proton ayrılmasıyla oluşan $[APT-3+3(NH_4^+-ACN)-2H^+]^+$ yapısına ait sinyal ile $[FP-3+H^+]^+$ iyonla ait sinyal gözlenmiştir. Ayrıca APT-3 ile FP-3'ün etkileşimine ait $[APT-3+3(NH_4^+-ACN)-2H^+]+(FP-3+H^+)-H^+]^+$ iyon sinyali gözlenmiştir.

-C'de yer alan APT-4-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; APT-4 kodlu aptamere 1 amonyum ve 1 potasyum iyonu

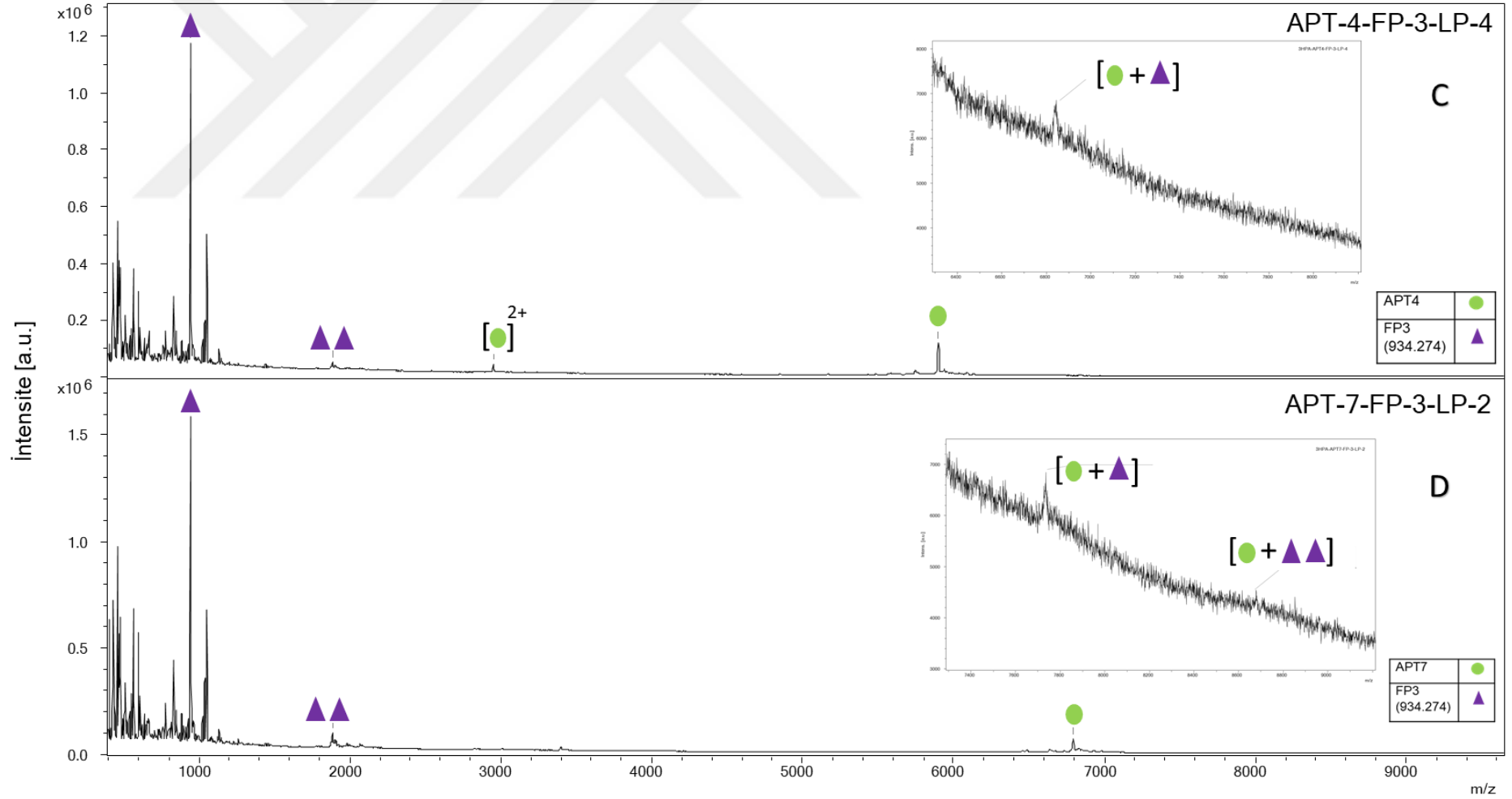
katılması ve 1 proton ayrılmasıyla oluşan $[APT-4+(NH_4^++K^+)-H^+]^+$ iyonuna ait sinyal ile $[FP-3+H^+]^+$ iyonuna ait sinyal gözlenmiştir. Ayrıca APT-4 ile FP-3'ün etkileşimine ait $[APT-4+(NH_4^++K^+)-H^+]+(FP-3+H^+)-H^+]^+$ iyon sinyali gözlenmiştir.

-D'de yer alan APT-7-FP-3 etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki analizine ait spektrumda; APT-7 kodlu aptamere 1 amonyum ve 1 asetonitril katılmasıyla oluşan $[APT-7+(NH_4^++ACN)]^+$ yapısına ait sinyal ile $[FP-3+H^+]^+$ iyonuna ait sinyal gözlenmiştir. Ayrıca APT-7 ile FP-3'ün etkileşimine ait $[APT-7+(NH_4^++ACN)]+(FP-3+H^+)-H^+]^+$ ve $[APT-7+(NH_4^++ACN))+2(FP-3+H^+)-3H^+]^+$ iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir.





Şekil 4. 45. A) APT-2-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve B) APT-3-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu.



Şekil 4. 45. C) APT-4-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu ve D) APT-7-FP-3 (1:12, v:v) etkileşiminin 15 dakikalık inkübasyon sonrası lineer mod MALDI kütle spektrumu (devam ediyor).

Bağlanma seçiciliğinin değerlendirilmesi amacıyla dizilimleri birbirinden farklı APT-2 kodlu (5' [AmC6T] TTTGGTTGGTGTGGTTGG 3'), APT-3 kodlu (5' AAAGGTTGGTGTGGTTGG [AmC6T] 3'), APT-4 kodlu (5' [AmC6T] AAAGGTTGGTGTGGTTGG 3') ve APT-7 kodlu (5' TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG [AmC6T] 3' kodlu aptamerler ile FP-3 kodlu perilen diimit türevi boyanın etkileşimleri incelenmiştir. Çözünürlüğü düşük olan bu boyanın aptamer ile etkileşim çözeltilerinde çökmelerin olmaması amacıyla aptamerler ile boyanın karıştırılmasından hemen önce FP-3 çözeltisi dikkatlice vortekslenmiştir.

FP-3 yapısının sulu çözeltide hem monomer hem de agregat şeklinde olgusu bilinmektedir. Şekil 4.45'teki aptamer-boya etkileşim spektrumları incelendiğinde serbest halde bulunan perilen diimit türevi olan boyanın monomerleri veya agregatlarının yüksek şiddette sinyal vermekte oldukları görülmüştür ($\sim 1,2-2,0 \times 10^6$ mertebesinde sinyal şiddeti). Etkileşimlere ait sinyallerin ise göreceli olarak daha düşük şiddette oldukları ($\sim 0,4-1,1 \times 10^5$ mertebesinde sinyal şiddeti) tespiti yapılmıştır. İyonlaşma verimi yüksek olan moleküllerin etkileşim sinyallerini baskılamış olabileceği düşünülmektedir.

FP-3 kodlu boyanın 15 dakikalık inkübasyon süresi sonunda APT-2, APT-3 ve APT-4 ile 1:1 (aptamer:boya) stokiyometride etkileşime girdiği, APT-7 ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride (aptamer:boya) etkileşime görülmüştür. Ancak etkileşim şiddetleri oldukça düşüktür. Dizilimler ve spektrumlar karşılaştırıldığında FP-3 boyasının bağlanma stokiyometrisinde kayda değer baz çifti seçiciliği göstermediği yorumu yapılmıştır. FP-3 boyasının protonlanmış halinin aptamerler ile baz diziliminden bağımsız, seçimsiz olarak elektrostatik etkileşime girmiş olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan perilen diimit türevi boyanın çözelti ortamında kendi kendine birleşmesinden (self-association) kaynaklı olarak çoklu stokiyometride nükleik asitlere bağlanması da olasıdır. Bu durum da APT-7 kodlu aptamer ile boyanın 1:2 stokiyometride etkileşime girmesi ile uyumludur. Mazzitelli ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, Tel01 ve PIPER kodlu perilen diimit analoglarının çözelti içinde kümelenmeye maruz kaldıkları ve G-dörtlü DNA ile her iki ligand için yüksek bağlanma stokiyometrilerinin gözlenmiş olup buna neden olarak da iyonlaşma sırasında ligandın kendi kendine birleşmesi gösterilmiştir [29].

Öte yandan daha önce hacimce ve derişimce 1:1 oranındaki etkileşime ait deneysel çalışmalar yürülmüştü bu çalışmada ise hacimce 1:12 (1:2, $\sim$ derişimce) oranındaki

etkileşimlere ait analizler yapılmıştır. Ortamda bulunan FP-3 miktarının artmasıyla birlikte aptamer:FP-3 etkileşimleri gözlenmiştir.

Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda FP-3'ün kısa zincirli oligonükleotit dizileri (6-12 mer) ile etkileşime girmediği tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada FP-3 yapısının uzun zincirli (18-21 mer) nükleik asit yapıları ile etkileşime girdiği gözlenmiştir. DNA'nın her dönüşünün 10.4 nükleotit çiftinden oluştuğu bilinmektedir. FP-3 yapısının uzun oligonükleotit yapılarıyla etkileşime girmesinin nedeninin uzun zincirin kendi içinde rotasyon yaparak veya iplik içi baz eşleşmeleri ile FP-3 için interkalasyon yapabileceği bir alan oluşturmuş olabileceği düşünülmüştür. 18 mer uzunluktaki APT-2, APT-3, APT-4 ile 1:1 stokiyometride (aptamer:boya) etkileşim olmasına rağmen 21 mer uzunluktaki APT-7 ile 1:1 ve 1:2 (aptamer:boya) stokiyometride etkileşim oluşması APT-7 yapısının rotasyon veya iplik içi baz eşleşmesi ile FP-3 yapısı için interkalasyon yapabileceği bölge oluşturmuş olabileceği yorumu ile uyumludur. Gabelica ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kendi kendini tamamlamayan 12 mer uzunluktaki dizilerle minör yarık bağlayıcılarının dizilime özgü şekilde bağlandıklarını ancak interkalatörler ile dizilim seçiciliğinden bağımsız şekilde etkileştiklerini rapor edilmiştir [100]. Ancak büyük hacimli süstitüentlerin varlığında tam interkalasyon engellenebilir, bu durumda kısmi interkalasyon meydana gelebilir [56]. Bu durumda büyük hacimli bir yapı olan FP-3 yapısının interkalasyondan ziyade kısmi interkalasyon yapmış olabileceği yorumu daha baskın gelmektedir.

Yukarıda bahsedilen tüm yorumlamalar dikkate alındığında FP-3 yapısının aptamerler ile etkileşim yolu olarak elektrostatik, interkalasyon veya kısmi interkalasyon yollarından hangisini seçtiği hakkında kesin sonuca varmak mümkün olmamıştır. Ancak bilinmektedir ki, interkalasyon komplekslerinin kararlılığı; van der Waals, hidrofobik ve elektrostatik kuvvetler tarafından sağlanmaktadır. Ayrıca tek bir bileşiğin, birden fazla DNA bağlama modu kullanabildiği sonucuna varılan çalışmalar da bulunmaktadır [58]. FP-3 yapısının aptamerlerle olan temel etkileşim yolu ne olursa olsun yukarıda bahsi geçen diğer etkileşim mekanizmalarıyla kompleksin kararlılığını artırma yönünde bir eğilim gösterdikleri yorumuna varılmıştır.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların nükleik asitler ile etkileşim mekanizmalarının kesin olarak aydınlatılabilmesi için spektroskopik ve elektroforetik yöntemlerle analizlerinin gerçekleştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür.



4.2.2. Spektroskopik Analizler

4.2.2.1. Çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ile analizleri

Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimini tespit etmede basit, sıklıkla kullanılan ve en etkili yöntemlerden biri olan UV-görünür absorpsiyon spektroskopisi ile DNA-küçük molekül etkileşim kararlılığı absorpsiyon ölçümü ile kolaylıkla incelenebilmektedir. Etkileşim ile oluşan yeni kompleks, DNA'nın ve küçük moleküllerin UV-görünür spektrumlarında değişikliklere yol açmaktadır.

Artan DNA derişiminde küçük molekülün absorpsiyon spektrumları incelenmekte ve absorpsiyon bandındaki herhangi bir değişikliğin bir kompleks oluşumundan kaynaklandığı kabul edilmektedir. DNA'nın sabit derişimine karşılık artan miktarda küçük molekül eklenmesi sonucunda kompleks oluşumuyla birlikte DNA'nın absorpsiyon spektrumundaki değişiklik ve pikin pozisyonundaki kayma incelenerek etkileşim yorumlanması ise DNA-küçük molekül etkileşimlerini belirlemede sıklıkla kullanılan diğer bir yöntemdir.

Nükleik asitler ve boyaların etkileşimlerinin bağlanma bölgeleri ve etkileşim mekanizmaları tez kapsamında yapılan kütle spektrometrik analizler ile incelenmiştir. Bu bölümde ise çift iplik DNA'lar ile FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin spektroskopik yöntemlerle incelenerek bağlanma türlerinin belirlenmesi, bağlanmanın uygun olduğu DNA etkileşimlerinin floresans verimlerinin de florometrik yöntemlerle incelenmesi ve görüntüleme amacı ile kullanıp kullanılamayacağının araştırılması çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında çalışılan tüm kısa zincirli DNA'lar ile absorpsiyon ve floresans spektroskopisi deneyleri yapılmış olup burada yalnızca etkileşim görülen yapılara yer verilmiştir. Kısa zincirli DNA'lar ile etkileşim olmamasının sebebi olarak DNA oluşma veriminin düşük olması DNA'nın yapısının kararsız olması nedeniyle iplik açılmalarının olduğu düşünülmüştür.

4.2.2.1.1. DS-3 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması

Boyanın sabit derişimine karşı artan DNA derişimi ile 1:1, 1:1,2, 1:1,4, 1:1,6 ve 1:1,8 (boya:DNA) stokiyometrideki etkileşimlere ait absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler incelenmiştir. 50 pmol/μl derişimde hazırlanan FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyalar ile 50, 60, 70, 80 ve 90 pmol/μl derişimde hazırlanan DS3 kodlu çift iplik DNA'ların eşit hacimdeki (1:1) karışımları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda absorpsiyon spektrumları BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

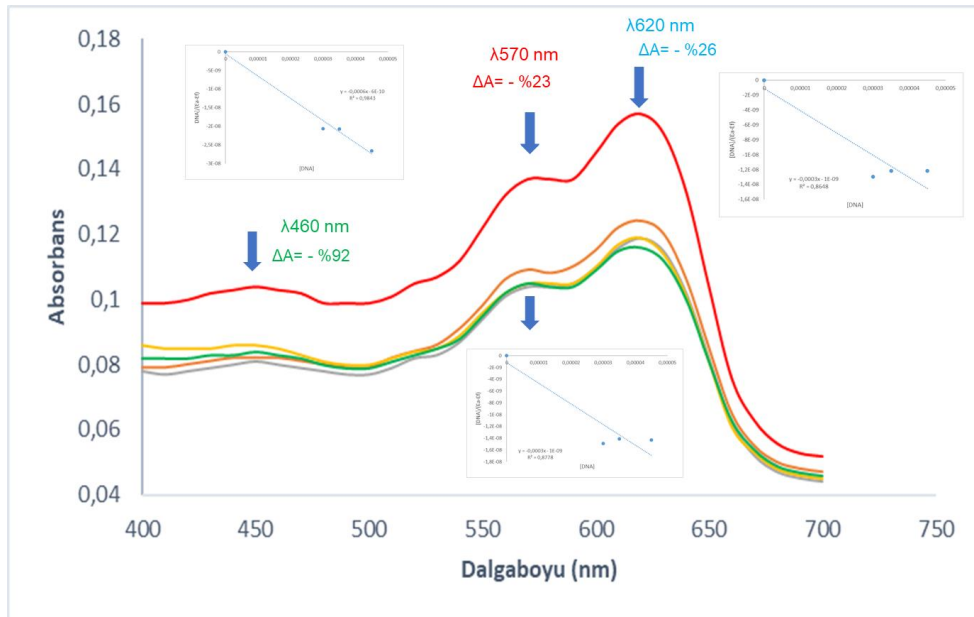
DNA spektrumunda çift sarmal yapısındaki bir değişiklik nedeniyle hiperkromik veya hipokromik etki meydana gelmektedir. Küçük moleküllerle etkileşimde DNA'nın konformasyonunda ve yapısında oluşan herhangi bir değişiklik ile spektral davranışında değişiklik görülmektedir. Bu etkileşimlerde DNA'nın ikincil yapısında meydana gelen kararsızlık sonucunda hiperkromizm oluşurken elektrostatik etkiler veya interkalasyon ile DNA'nın ikincil yapısının kararlılığının artması hipokromizme yol açmaktadır.

Küçük moleküllerin DNA çift sarmalına interkalasyonlarıyla hipokromik etki ile birlikte absorpsiyon şiddetinde azalma, absorpsiyon spektrumlarında batokromik kayma (kırmızıya kayma) meydana gelmektedir. Nükleik asitlerin UV-Vis Spektroskopisinde baz absorpsiyonları baskın olup nükleobazların pirimidin ve pürin halka sistemlerinin π - π istiflenmesiyle interkalasyon yapan molekülün elektron dağılımı bozulmakta, bu durum π - π^* geçişlerini etkileyerek geçiş enerjisini azaltmakta (HOMO ve LUMO enerji seviyeleri arasındaki fark azalmakta) ve batokromik etkiye sebep olmaktadır. İnterkalatörün π^* orbitali, baz çiftlerinin π orbitalleri ile eşleştiğinde ve eşleşen π^* orbitali kısmen elektronlarla dolduğunda, geçiş olasılığı azalmakta ve bu durum interkalatörün UV/Vis bandının hipokromizmiyle sonuçlanmaktadır. Bağlanmanın kararlılığı ve gücü hipokromizm ve kırmızıya kaymanın boyutu ile değerlendirilmektedir. DNA interkalatörleri için tipik olarak %30-40 oranındaki absorbans azalması (hipokromizm) ve 10 nm'den küçük kırmızıya kayma gerçekleşmektedir. Küçük molekül ile DNA'nın elektrostatik veya kısmi interkalasyon şeklinde etkileşime girmesiyle birlikte absorbans şiddetinde artma (hiperkromizm) gözlenmektedir.

Her bir analiz öncesinde etkileşime ait absorpsiyon spektrumlarının, DNA'nın absorpsiyon spektrumu veya küçük molekül spektrumundan etkilenmesini engellemek için etkileşimdeki derişimleri baz alınarak DNA ve boyalar için absorpsiyon spektrumları alınarak temel çizgi düzeltmesi (base line correction) yapılmıştır.

PBI'ların biyomolekülleri, özellikle DNA'yı ve bunların değişen absorpsiyon özellikleri, floresans sinyalleri veya elektronik özellikler temelinde fizyolojik fonksiyonlarını inceleme potansiyeli vurgulanmıştır. Prensip olarak, PBI'ların DNA ile etkileşime girebilmesi için iki farklı olasılık bulunmaktadır. Bunların biri, kromofor olan bu PBİlar, oligonükleotitlere kovalent olarak bağlandıklarında DNA-PBI konjugatlarının bir parçası olabilirler ve diğeri ise, kovalent olmayan $\pi - \pi$ istiflenme etkileşimleri yoluyla (interkalasyon üzerine) DNA bazları ile etkileşime girebilirler [32].

Perilen dimit türevlerinin karakteristik absorpsiyon pikleri genellikle 458, 490 ve 526 nm'lerde görülmektedir [175]. Şekil 4.46'da DS3-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS3 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 460 nm'de %92'lik, 570 nm'de %23'lük ve 620 nm'de %26'lık bir azalma meydana gelmiştir. Bu spektral özellikler, interkalatör aromatik bir kromofor ile DNA'nın baz çiftleri arasındaki güçlü π istiflenmesine atfedilen $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinde enerjide bir azalma meydana getirmektedir [22].



Şekil 4. 46. DS3-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

Hipokromik etki ile birlikte absorpsiyon şiddetlerinde görülen azalma FP-3 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir.

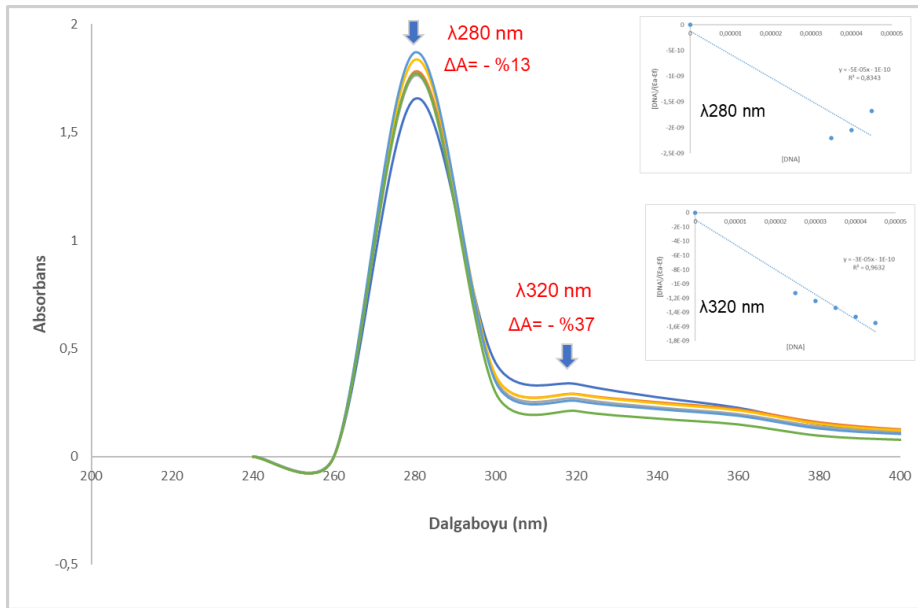
Bölüm 2.5.3'te detaylıca anlatıldığı üzere DNA'ya bağlanma ile birlikte maksimum absorpsiyon ve/veya pik sönüm katsayısındaki değişikliğin konsantrasyon bağımlılığına dayalı olarak denge bağlanma sabiti belirlenebilir [27],[56]. Eşitlik 2.2'de yer alan denklem ile DNA-boya etkileşimleri için bağlanma sabiti K_b hesaplanmıştır.

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad \text{Eşitlik 2.2}$$

$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ ile $[DNA]$ karşılaştırması düz bir çizgi vermektedir. K_b , eğim ve y eksenini kesme noktasının birbirine oranıdır [56].

Eşitlik 2.2 kullanılarak DNA-boya etkileşimleri için bağlanma sabiti hesaplaması yapılmıştır. DS3-FP-3 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(460\text{ nm})} = 1,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_{b(570\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(620\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

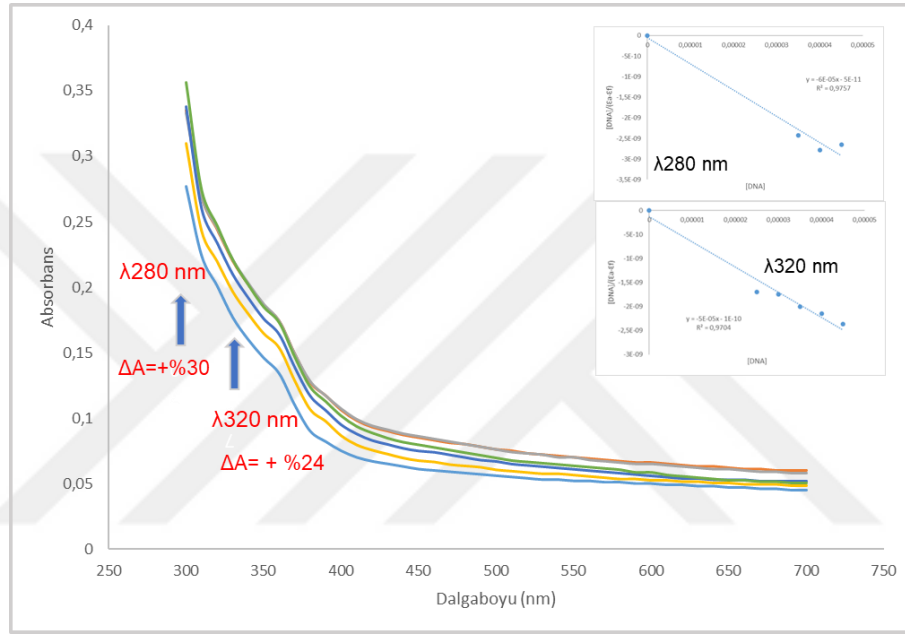
Şekil 4.47'de DS3-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS3 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 280 nm'de %13'lük ve 320 nm'de %37'lik bir azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4. 47. DS3-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

Absorpsiyon şiddetinde görülen azalma (hipokromik etki) PT-5 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DS3-PT-5 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(280\text{ nm})} = 5,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(320\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.48’de DS3-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS3 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 280 nm’de %30’luk ve 320 nm’de %24’lük bir artma meydana gelmiştir.



Şekil 4. 48. DS3-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

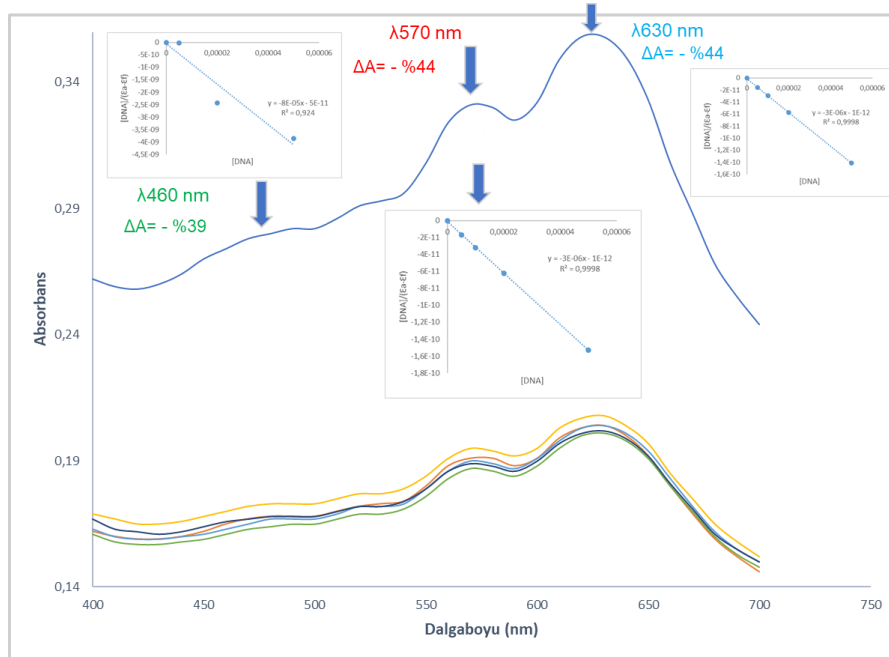
Absorbans şiddetinde artma (hiperkromik etki) DNA’nın ikincil yapısında meydana gelen kararsızlığa işaret etmekte olup PT-6 molekülünün DNA çift sarmalı ile elektrostatik etkileşime girdiği veya kısmi interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DS3-PT-6 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(280\text{ nm})} = 1,20 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(320\text{ nm})} = 5,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

DNA interkalatör etkileşimleri için K_b tipik olarak 10^5 - 10^{11} M^{-1} arasındadır. DNA ile iyi interkalasyon yapan EtBr molekülünün bağlanma sabiti $K_b = 1,40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olduğu bilinmektedir [86]. DS3 ile interkalasyon yoluyla etkileşime giren PT-5’in bağlanma sabitlerinin EtBr’ye göre daha düşük olduğu fakat FP-3’ün göreceli olarak EtBr’nin bağlanma sabitine yakın olduğu görülmüştür. Platin içeren PT-6 yapısının ise DS3 ile elektrostatik veya kısmi interkalasyon yaptığı tespit edilmiştir.

4.2.2.1.2. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması

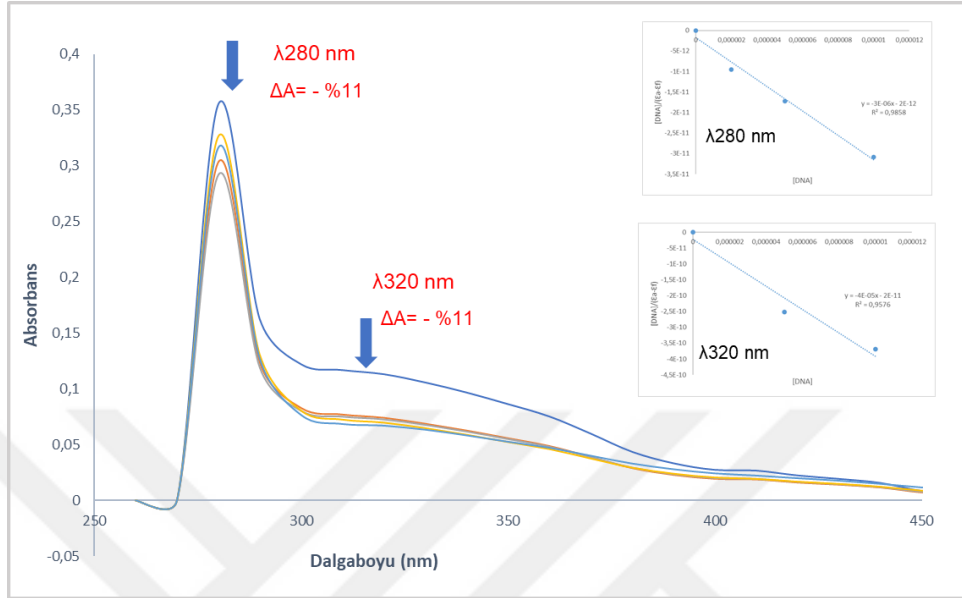
Boyanın sabit derişimine karşı artan DNA derişimi ile 1:0,04, 1:0,08, 1:0,2, 1:0,4, 1:0,8 ve 1:2 (boya:DNA) stokiyometrideki etkileşimlere ait absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler incelenmiştir. 50 pmol/μl derişimde hazırlanan FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyalar ile 2, 4, 10, 20, 40 ve 100 pmol/μl derişimde hazırlanan DS5 kodlu çift iplik DNA'ların eşit hacimdeki (1:1) karışımları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda absorpsiyon spektrumları BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

Şekil 4.49'da DS5-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS5 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 460 nm'de %39'luk, 570 nm'de %44'lük ve 630 nm'de %44'lük bir azalma meydana gelmiştir. Hipokromik etki ile birlikte absorpsiyon şiddetlerinde görülen azalma FP-3 molekülünün DS5 kodlu çift sarmal DNA'ya interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DS5-FP-3 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(460\text{ nm})} = 1,60 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_{b(570\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(630\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 49. DS5-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

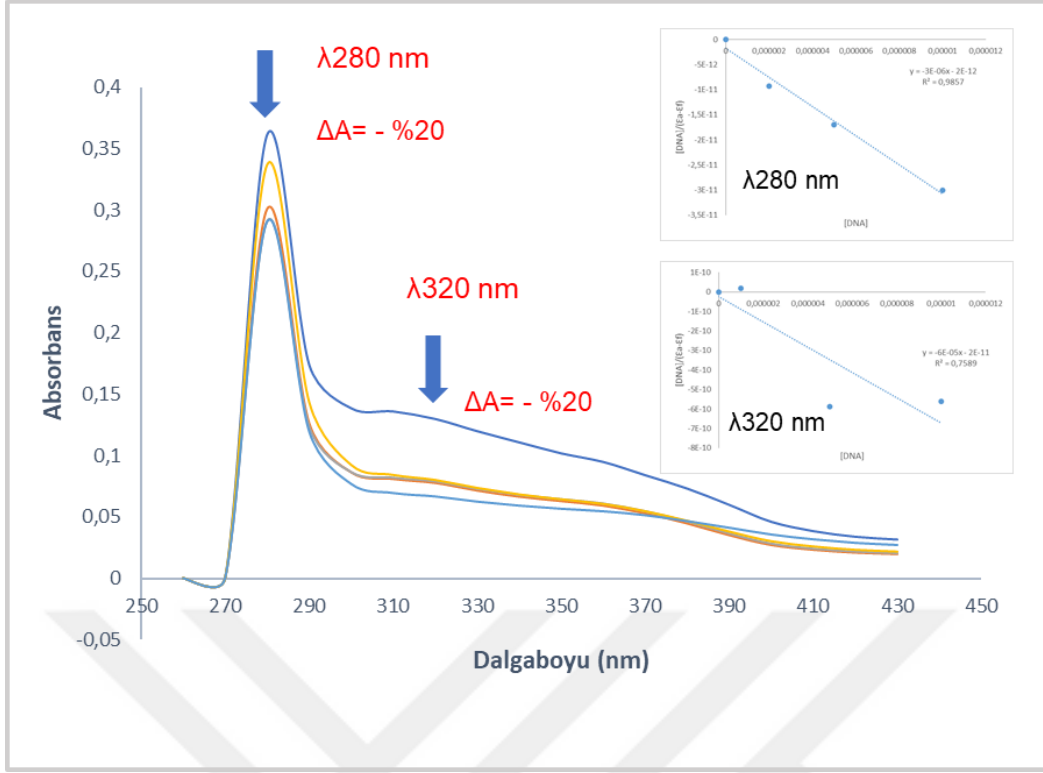
Şekil 4.50’de DS5-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS5 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 280 nm’de %11’lik ve 320 nm’de %11’lik bir azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4. 50. DS5-PT-5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

Absorpsiyon şiddetinde görülen azalma (hipokromik etki) PT-5 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DS5-PT-5 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(280\text{ nm})} = 1,50 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(320\text{ nm})} = 2,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.51’de DS5-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DS5 derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta 208 nm’de %20’lik ve 320 nm’de %20’lik bir azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4. 51. DS5-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

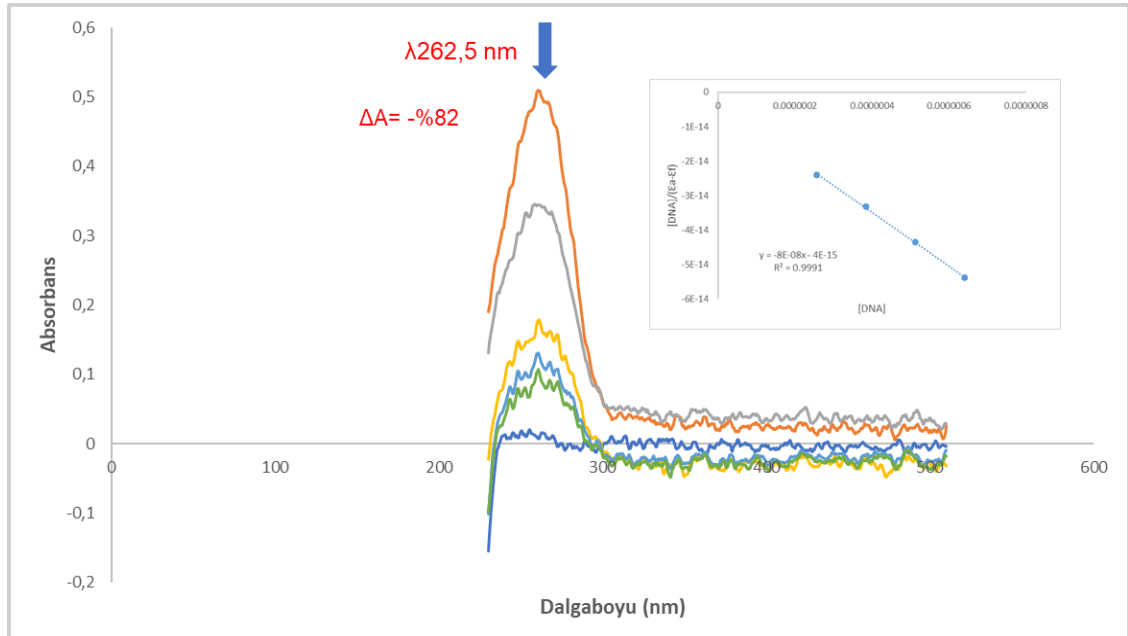
Absorpsiyon şiddetinde görülen azalma (hipokromik etki) PT-6 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DS5-PT-6 etkileşimine ait bağlanma sabitleri $K_{b(280\text{ nm})} = 1,50 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve $K_{b(320\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

DS5 ile etkileşime giren FP-3, PT-5 ve PT-6 moleküllerinin bağlanma sabitlerinin EtBr'ye göre daha yüksek olduğu görülmüş olup bu yapıların DS5 ile iyi interkalasyon yaptıkları tespit edilmiştir. Platin metalli PT-6'nın bağlanma sabitinin ise paladyum metalli PT-5'in bağlanma sabitine göre daha büyük olması platin komplekslerinin daha kararlı olduğu yorumuyla örtüşmektedir.

4.2.2.1.3. Buzağı timüs DNA'sı ile boyaların etkileşimlerinin UV-Vis Spektroskopisi ile analizleri ve etkileşimlerin bağlanma sabitlerinin hesaplanması

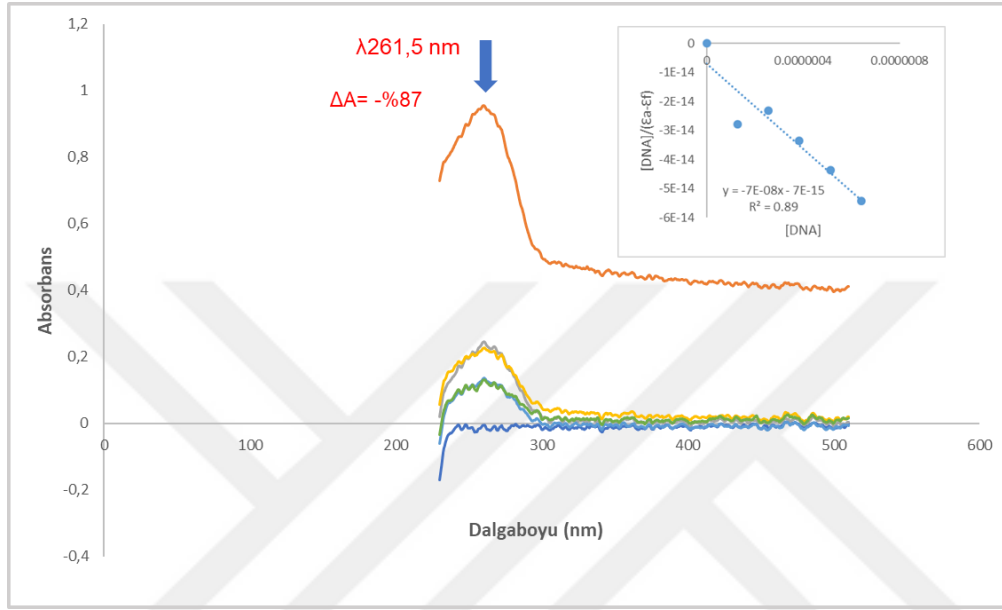
Eşit derişimdeki boya ve DNA'nın hacimce 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 (DNA:boya, hacimce) karıştırılarak hazırlanan etkileşimlerine ait absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler incelenmiştir. 0,128 pmol/μl ($1,28 \times 10^{-7}$ M) derişimde hazırlanan FP-3 ve PT-6 kodlu boyalar ile derişimi 0,128 pmol/μl ($1,28 \times 10^{-7}$ M) olarak hazırlanan DNA (3×10^5 Da kütlede) hacimce 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 (DNA:boya) olacak şekilde hazırlanan karışımları 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda absorpsiyon spektrumları NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

Şekil 4.52'de DNA-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DNA derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta %82'lik bir azalma meydana gelmiştir. Hipokromik etki ile birlikte absorpsiyon şiddetlerinde görülen azalma FP-3 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DNA-boya etkileşimleri için bağlanma sabiti hesaplaması yapılmıştır. DNA-FP-3 etkileşimine ait bağlanma sabiti $K_b = 2,00 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 52. DNA-FP-3 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

Şekil 4.53'te DNA-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu yer almakta olup DNA derişiminin artmasıyla birlikte absorbansta %87'lik bir azalma meydana gelmiştir. Absorpsiyon şiddetinde görülen azalma (hipokromik etki) PT-6 molekülünün DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir. Eşitlik 2.2 kullanılarak DNA-PT-6 etkileşimine ait bağlanma sabiti $K_b=1,00 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 53. DNA-PT-6 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumu.

Uzun zincirli DNA sarmalı ile olan bağlanma sabitlerinin 10^7 M^{-1} mertebesinde olduğu, kısa zincirli DNA'lara (DS3, DS5 gibi) kıyasla daha büyük olduğu görülmüştür. FP3 ve PT6 kodlu boyaların uzun zincirli DNA ile daha kararlı interkalasyon yaptığı söylenebilmektedir. Buna gerekçe olarak uzun zincirli DNA yapısının hem rotasyon yaparak sarmalda interkalasyon için alana oluşturması hem de molekül içi kuvvetlerle sarmal kararlılığını arttırması olarak düşünülmüştür. DS5 dizilimde ardışık GG bazları bulunmakta olup baz dizilimi üzerinde %60-65 oranında bağlanma olasılığı olduğu, DS3'te ise GAG dizilimi bulunmakta olup guaninle arasında farklı bir baz bulunan bu baz dizilimi ile %2 oranında bağlanma olasılığı olduğu bilinmektedir. DS3 ile DS5 kodlu DNA'lar ile oluşan etkileşimleri karşılaştırılacak olursak DS5 ile etkileşimlere ait bağlanma sabitlerinin daha büyük olduğu görülmüş olup DS5 ile oluşan etkileşimlerin daha kararlı olduğu yorumu yapılmıştır. Burada bağlanma bölgeleri ve bağlanma olasılıkları hakkındaki bilgi ile uyumlu bir sonuç elde edilmiştir.

Öte yandan FP-3 etkileşimleri için elde edilen absorbans değerlerinin PT-5 ve PT-6 için elde edilenlerden daha büyük olduğu görülmüş olmuştur. Beer-Lambert yasasından yola çıkarak FP-3:DNA etkileşimine ait molar absorpsiyon katsayısının diğer boyalarla olan etkileşimlerden daha büyük olduğu yani daha kararlı etkileşime girdiği yorumu yapılmıştır.

4.2.2.2. Çift iplik DNA ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri

Aromatik fonksiyonel gruplar içeren bileşikler yoğun floresan göstermektedir. Küçük moleküllerin DNA ile bağlanma modunu aydınlatmak için küçük molekülün çift sarmal DNA varlığında floresan titrasyonu yapılmasıyla (DNA'nın floresan özelliği ihmal edilebilir olduğundan) DNA'nın değişen derişiminden yola çıkılarak küçük moleküllerin içsel floresansındaki değişiklik incelenmektedir.

İnterkalasyon yapan moleküllerin çift sarmal DNA'ya yüksek bağlanma ilgisi vardır ve bağlanmayla birlikte floresans söndürme meydana gelmektedir. İnterkalasyon yapan bu yapılarının DNA çift sarmalına eklenmesi, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri ile karalılığı arttırmaktadır. Bir çift sarmal DNA'da iplik ayrılması meydana geldiğinde interkalasyon yapan küçük moleküller serbest kalarak DNA'nın söndürme özelliğinde bir azalmaya yol açmaktadır.

Metal bazlı birçok interkalatör ve yarık bağlayıcı floresan özellik göstermekte ve floresans emisyonları ise ortam duyarlıdır. Metal bazlı moleküller hidrofilik ortamda düşük floresan özellik göstermekte veya hiç gösterememektedirler. Yüksek polaritedeki (hidrofilik) bir ortamdan bir ortamdan düşük polaritedeki DNA ortamında geçişle birlikte uyarma ve emisyon bantlarının değişikliğine yol açar. DNA sarmalının içi aminli bazların kazandırdığı özellikten dolayı hidrofobik yapıda olup hidrofobik bu ortam molekülleri çevreleyen floresan söndürücü çözücünden uzak olduğu için interkalasyon yapan moleküllerin floresan özelliğinde değişikliğe yol açarak etkileşim kararlılığını arttırmaktadır.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan 10 mM NaCl varlığında 10 mM amonyum asetat tamponu (pH=7) kullanılmıştır. Fizyolojik ortam oluşturmanın yanı sıra kütle spektrometrik sistemlerde amonyum asetat tamponunun kullanım amacının katyon katılmalarının önüne geçilerek girişimleri engelleyerek özgün etkileşimlere ait

sinyal/gürültü oranı yüksek olan spektrumlar elde etmek olduğundan daha önce bahsedilmiştir. İyonik gücün DNA-küçük molekül etkileşimleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Floresans Spektroskopi çalışmalarında NaCl gibi güçlü elektrolitler kullanılmaktadır. DNA ile etkileşime girecek moleküle NaCl ilavesinin molekülün floresan verimini etkilememesi gerekmektedir. Ancak ortamda DNA'nın varlığıyla birlikte Na⁺ iyonlarının DNA'nın negatif fosfat omurgasıyla etkileşime girmesi ve negatif yükleri kısmen nötralize etmesiyle küçük molekül ile DNA yüzeyi arasındaki elektrostatik çekim azalmakta ve özgün olmayan etkileşimler minimize edilmektedir. Bu durum da göz önünde bulundurularak deneysel çalışmalarda NaCl varlığında tampon ortamı seçilmiştir.

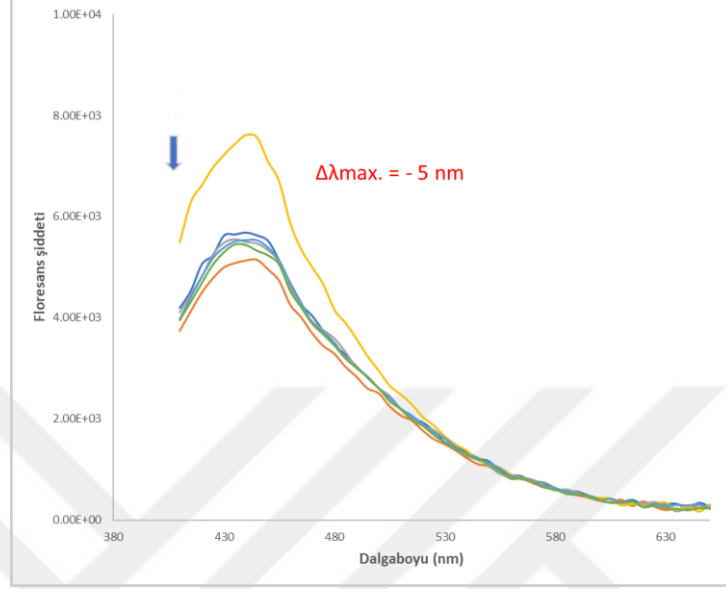
Florimetrik çalışmalarda, tez kapsamındaki diğer deneysel çalışmalarda olduğu gibi perilen diimit türevi olan FP-3 ile çalışılırken karşılaşılan çözünürlük ve gözle görülür çökme problemiyle yine karşılaşılmıştır. Her bir ölçüm öncesinde örnekler çalkalama işlemi uygulanmıştır. Perilen kromoforlarının kümelenmesi nedeniyle düşük çözünürlük ve düşük floresans gösterdiği bilinmekte olup perilen diimit türevleri sulu ortamda güçlü π - π istifleme göstererek floresans şiddetinde kendi kendine sönmeye etkisine neden olabilmektedir.

4.2.2.2.1. DS-5 kodlu çift iplik DNA ile boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri

Boyanın sabit derişimine karşı artan DNA derişimi ile 1:1, 1:1,2, 1:1,4, 1:1,6 ve 1:1,8 (boya:DNA) stokiyometrideki etkileşimlerin floresans verimleri incelenmiştir. 50 pmol/μl derişimde hazırlanan FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyalar ile 50, 60, 70, 80 ve 90 pmol/μl derişimde hazırlanan DS5 kodlu çift iplik DNA'ların eşit hacimdeki (1:1) karışımları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir boya için belirlenen uyarım dalga boylarında floresans spektrumları BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

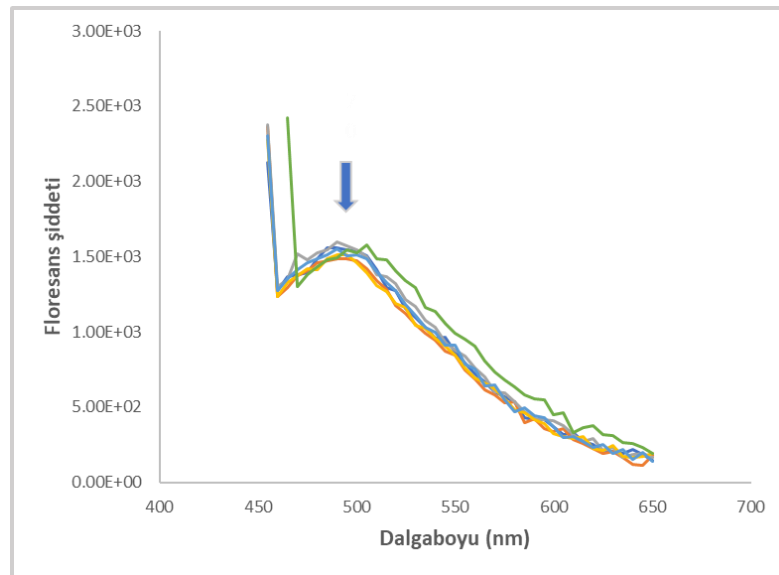
Şekil 4.54'te yer alan DS5 ile FP-3'ün etkileşimine ait floresans spektrumunda 445 nm de geniş bir pik elde edilmiştir. DS5 eklenmesiyle birlikte FP3'ün floresans şiddetinde giderek azalma meydana gelmiştir. Azalmaya birlikte floresans piklerine ait maksimum dalga boylarında 5 nm (445 nm'den 440 nm'ye) kadar maviye kayma (blue shift) elde edilmiştir. Floresanstaki bu değişiklikler çeşitli amin grupları içeren perilen diimit türevi DNA interkalatörlerinin buzağı timüs DNA'sı ile etkileşimleri [22] ve yine DNA

interkalatörü olan imit türevi naftalik asit (amonafide) ile buzağı timüs DNA'sı ile etkileşimleriyle ilgili literatürde rapor edilen optik özelliklerle uyum içerisinde bulunmuştur [21],[176].



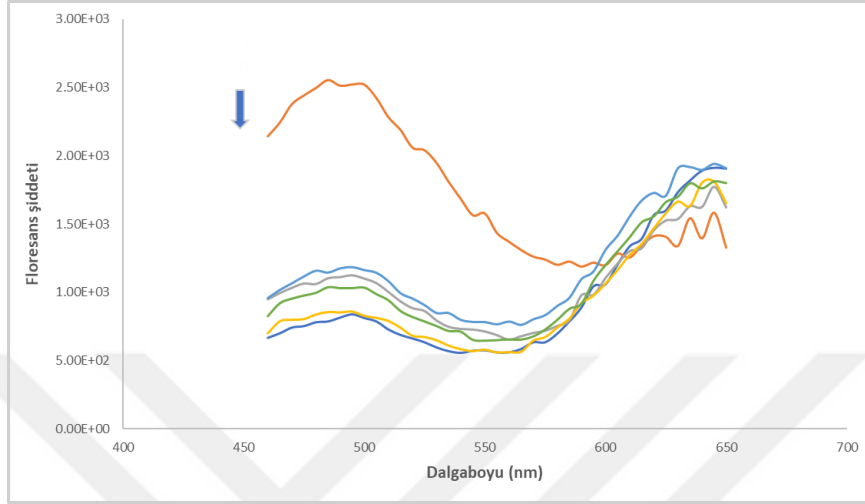
Şekil 4. 54. DS5-FP-3 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .380 nm).

Şekil 4.55'te yer alan DS5 ile PT-5'in etkileşimine ait floresans spektrumunda 490 nm de geniş bir pik elde edilmiştir. DS5 eklenmesiyle birlikte PT-5'in floresans şiddetinde çok fazla değişiklik meydana gelmemiş olup DNA etkileşim mekanizması hakkında bir sonuca varılamamıştır.



Şekil 4. 55. DS5-PT-5 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .427 nm).

Şekil 4.56’da yer alan DS5 ile PT-6’nın etkileşimine ait floresans spektrumunda 490 nm de geniş bir pik elde edilmiştir. DS5 eklenmesiyle birlikte PT-6’nın floresans şiddetinde giderek azalma meydana gelmiş olup bu durum DNA’ya interkalasyon yapıldığının göstergesidir.



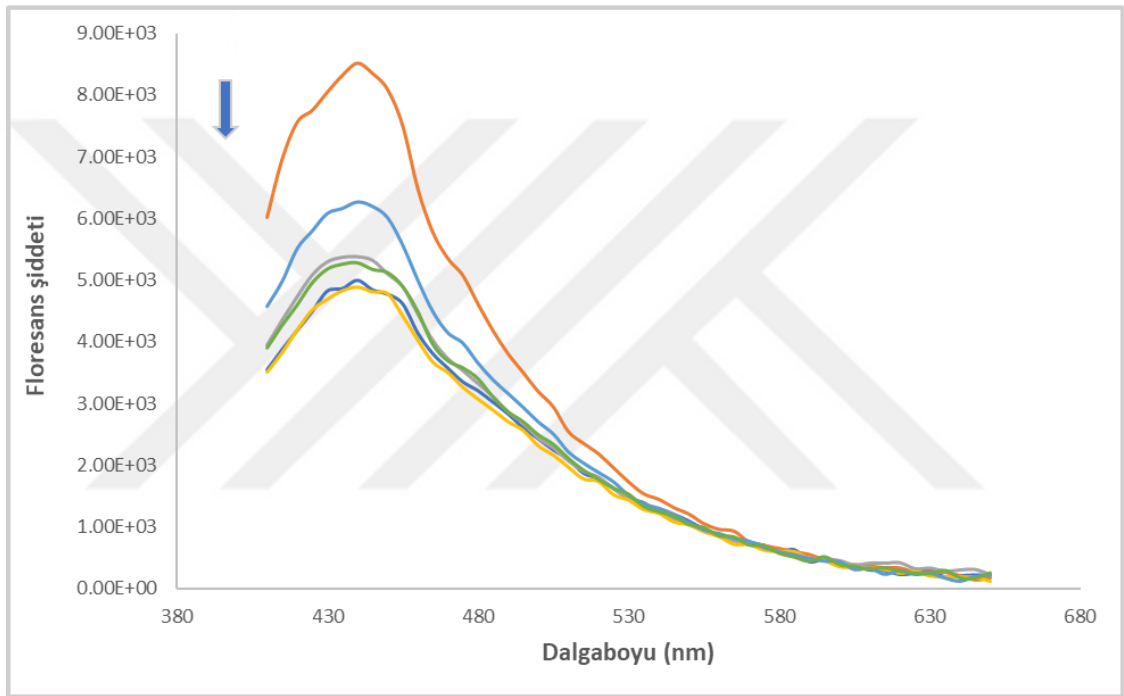
Şekil 4. 56. DS5-PT-6 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .427 nm).

DS kodlu DNA’dan sadece DS5 kodlu olan ile floresans spektrumları izlenebilmiştir. Diğer çift iplik DNA’lar ile etkileşime ait floresans spektrumları ile değerlendirme yapılamamıştır. FP-3 ve PT-6 kodlu boyaların DS5 ile interkalasyon yaptıkları, etkileşimle birlikte floresans şiddetlerinde sırasıyla %32 ve %66 azalma meydana geldiği tespit edilmiştir.

4.2.2.2.2. Buzağı timüs DNA’sı ile boyaların etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile analizleri

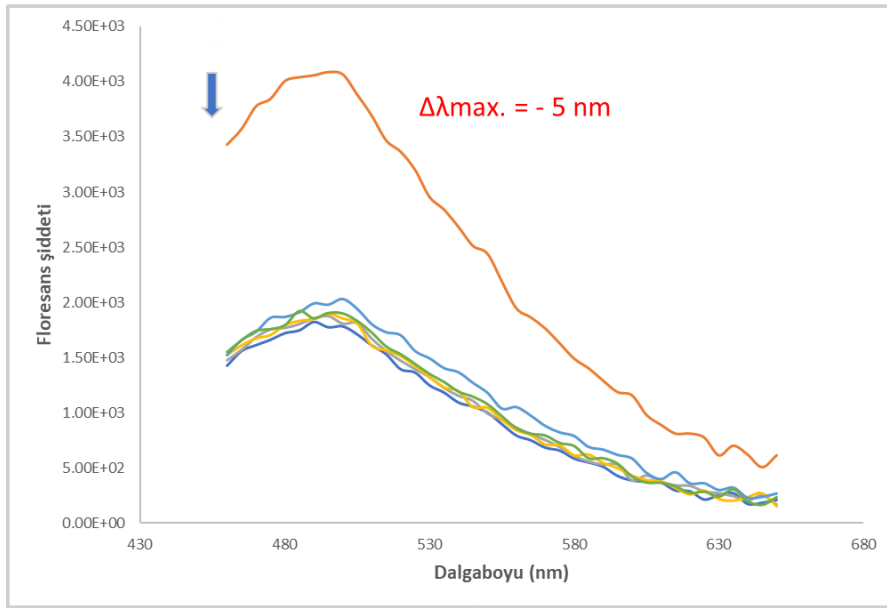
Eşit derişimdeki boya ve DNA’nın hacimce 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 (DNA:boya, hacimce) karıştırılarak hazırlanan etkileşimlerin floresans verimleri incelenmiştir. 0,128 pmol/µl ($1,28 \times 10^{-7}$ M) derişimde hazırlanan FP-3 ve PT-6 kodlu boyalar ile 0,128 pmol/µl ($1,28 \times 10^{-7}$ M) derişimde hazırlanan DNA (3×10^5 Da kütlede) hacimce 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 (DNA:boya) olacak şekilde hazırlanan karışımları 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir boya için belirlenen uyarım dalga boylarında floresans spektrumları BioTek Synergy H1 Hybrid Multimode Reader (Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaydedilmiştir.

Şekil 4.57’de yer alan DNA ile FP-3’ün etkileşimine ait floresans spektrumunda 440 nm de geniş bir pik elde edilmiştir. FP-3 yapısının sulu çözeltide hem monomer hem de agregat şeklinde olduğu bilinmektedir. Ortamda serbest boya monomerinin varlığından dolayı güçlü floresans saptanmıştır. DNA eklenmesiyle birlikte FP3’ün floresans şiddetinde giderek azalma meydana gelmiştir. Floresanstaki bu değişiklikler perilen diimit türevi DNA interkalatörleriyle buzağı timüs DNA’sının etkileşimleriyle ilgili literatürde rapor edilen optik özelliklerle uyum içerisinde bulunmuştur [21],[22],[111],[176],[177].



Şekil 4. 57. DNA-FP-3 etkileşimine ait floresans spektrumu (λ_{exc} .380 nm).

Şekil 4.58’te yer alan DNA ile PT-6’nın etkileşimine ait floresans spektrumunda 495 nm de geniş bir pik elde edilmiştir. DNA eklenmesiyle birlikte PT-6’nın floresans şiddetinde giderek azalma meydana gelmiştir. Azalmaya birlikte floresans piklerine ait maksimum dalga boylarında 5 nm (495 nm’den 490 nm’ye) kadar maviye kayma (blue shift) elde edilmiştir. Artan DNA miktarıyla birlikte floresans şiddetinin azalması ve maksimum dalgaboyunda maviye kayma (hipsokromik kayma) gerçekleşmesi DNA ile interkalasyon şeklinde etkileşime girildiğinin göstergesidir.



Şekil 4. 58. DNA-PT-6 etkileşimine ait floresans spektrumu ($\lambda_{exc.427nm}$).

4.2.3. Elektroforetik Analizler

DNA ile küçük moleküllerin arasındaki etkileşimleri incelemek için elektroforetik tabanlı teknikler kullanılmakta olup literatürde elektroforetik jellerdeki nükleik asitleri görselleştirmek için floresan boya ların yaygın olarak kullanıldığı birçok çalışma yer almaktadır. Fosfat omurgası kaynaklı olarak anyonik yapıda olan DNA, elektriksel alanda jel elektroforezi boyunca katottan anota doğru hareket etmektedir. DNA'nın jel boyunca hareketinin hızı, DNA'nın boyutuna ve konformasyon gibi özelliklerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

DNA yokluğunda düşük floresans özellikte olup DNA varlığında kovalent olmayan etkileşimlerle floresan özelliğinde artış olan moleküllerin jel elektroforetik yöntemlerde kullanımıyla biyolojik uygulamalarda küçük miktarlarda DNA tayini ve görüntülemesi açısından önemli bir gelişme olmuştur. Böylelikle bu moleküllerin sensör-boyar madde olarak kullanımıyla birlikte alternatif görüntüleme ajanlarının uygulamada yer alması sağlanmaktadır.

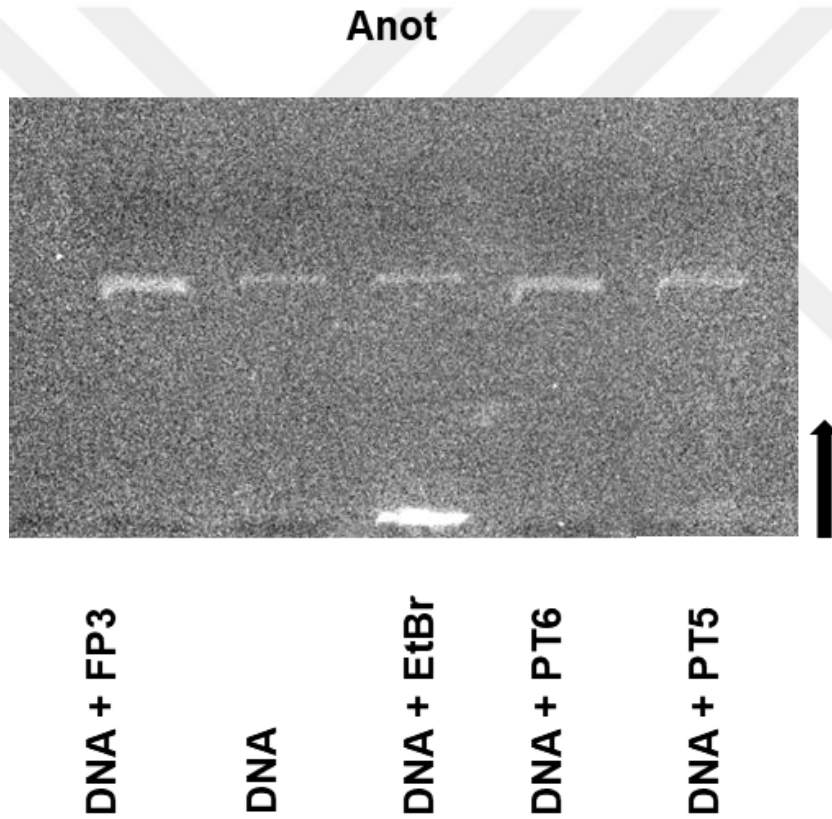
4.2.3.1 Buzağı timüs DNA'sı ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektrophorez ile analizleri

Tez çalışması kapsamında yapılan agaroz jel elektrophorezi yönteminde; 10xTBE tamponu 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. %4,5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. 10x BlueJuice yükleme boyası 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Daha önce hazırlanan boya stok çözeltilerinden 10^{-5} M derişimde olacak şekilde FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boya çözeltileri hazırlanmıştır. DNA ile iyi interkalasyon yaptığı bilinen floresan özellikteki EtBr kontrol amaçlı kullanılmak üzere 10^{-5} M derişimde hazırlanmıştır. Derişimi $1,3 \times 10^{-6}$ M olan DNA ile FP-3, PT-5, PT-6 kodlu boyaların ve EtBr'nin eşit hacimdeki (1:1) karışımları 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yükleme boyası ile DNA-boya etkileşim çözeltileri hacimce 1:5 oranında karıştırılarak 10 µl jel haciminde jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Daha sonra Fisherbrand™ multiSUB™ Midi Horizontal Gel System (ThermoFisher Scientific Inc, Amerika Birleşik Devletleri)'de 120 V'da 30 dakika boyunca örneklerin jelde yürütme işlemi yapılmıştır.

Deneyisel çalışmalarda klasik jel elektrophorez yöntemlerinde yapıldığı gibi boya çözeltilisi ile (DNA için genellikle EtBr kullanılıyor ancak yüksek oranda kanserojen) jel boyaması yapılmamıştır. Burada amaç tez çalışması kapsamında kullanılan FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların jel elektrophoretik sistemlerde EtBr'ye alternatif görüntüleme ajanı olarak kullanılıp kullanılamayacaklarını tespit etmektir. Bu amaçla floresan özelliği olan bu boyalar ile DNA'nın diğer analiz yöntemlerinde olduğu gibi inkübasyona bırakıldıktan sonra jel elektrophorez deneyleri gerçekleştirilmiştir.

EtBr floresans bir madde olup tek başına 301 nm dalga boyunda uyarma ve 603 nm dalga boyunda ise emisyon piki vermektedir. DNA ile interkalasyonunda ise 590 nm'de güçlü bir emisyon bandı vermektedir. Tek başına DNA'nın floresans özelliği ise ihmal edilebilir düzeydedir. Şekil 4.59'da soldan 1. hatta (line) DNA+FP-3 etkileşimi, 2. hatta serbest DNA, 3. hatta DNA+PT-6 etkileşimi ve 4. hatta DNA+PT-5 etkileşimine (1 saat 37°C'de inkübasyon) ait jel fotoğrafları yer almaktadır. Görüntüden görüleceği üzere 2. hatta bulunan serbest haldeki DNA çok düşük, ihmal edilebilir düzeyde floresans özellik göstermiştir. Kontrol amaçlı olarak 3. hatta yüklenen DNA+EtBr etkileşiminin en yüksek floresansı verdiği gözlenmiştir. İnterkalatör EtBr ile etkileşen DNA, anyonik omurgasından kaynaklı olarak anota doğru hareket etmiştir, pozitif yüklü olan EtBr'nin DNA ile etkileşmeyen ve çözeltide serbest halde bulunan fazla miktarının 3. hattın

başında görülen daha kuvvetli ışımaya sebep olduğu yorumu yapılmıştır. 1. hatta bulunan perilen diimit türevi interkalatör FP-3 boyası ile DNA'nın EtBr ile olduğu kadar olmasa da göreceli olarak kuvvetli bir floresans ışıması verdiği görülmüştür. Sırasıyla 4. ve 5. hatlarda yer alan benzimidazol türevi olan ve platin metali içeren PT-6 ile paladyum metali içeren PT-5 kodlu boyaların ise DNA ile etkileşime girerek floresans ışıma verdikleri görülmüştür. Platin içeren PT-6'nın paladyum içeren PT-5'e kıyasla daha yüksek şiddette ışıma verdiği görülmüş olup platin komplekslerinin paladyuma kıyasla daha kararlı olmasıyla literatürle uyumlu sonuç elde edilmiştir. Paladyum komplekslerinin yüksek reaktivitesi nedeniyle platine kıyasla kararlılığının düşük olduğu bilinmektedir.

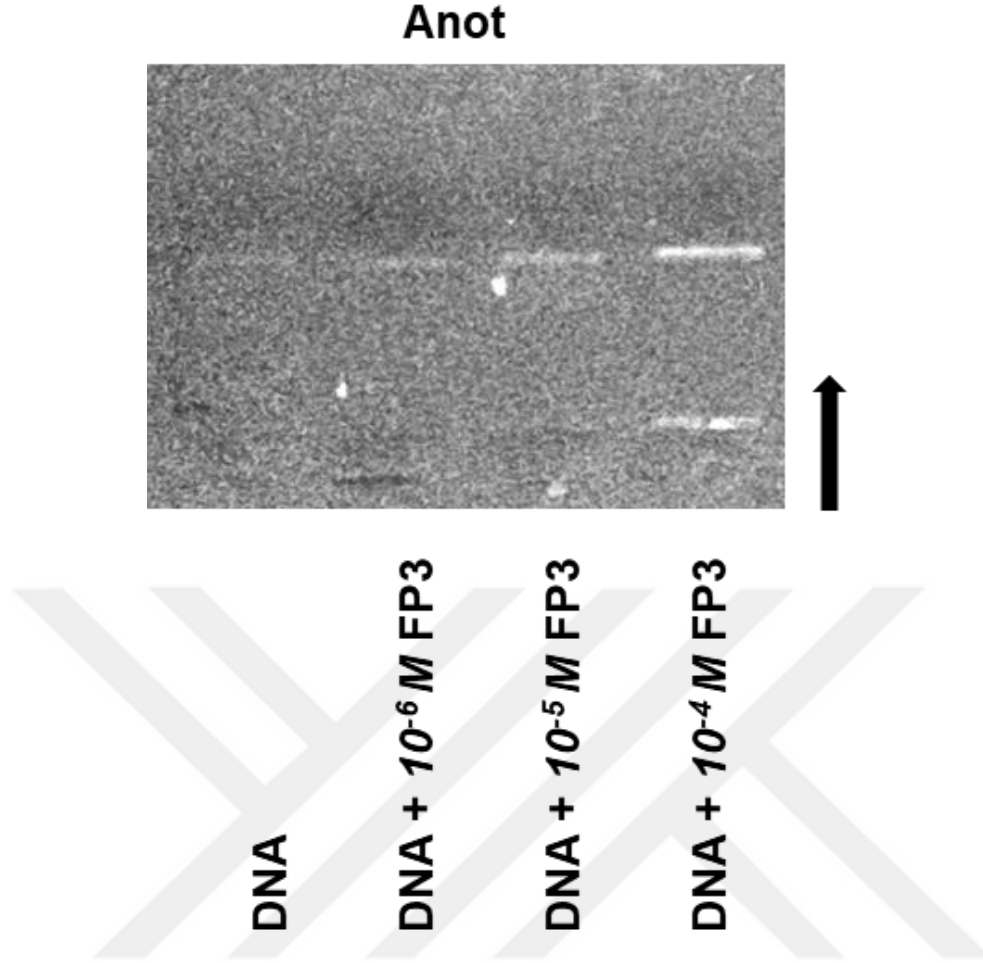


Şekil 4. 59. Soldan sağa sırasıyla, DNA+FP3, DNA, DNA+EtBr, DNA+PT6, DNA+PT5 etkileşimlerine ait agaroz jel görüntüsü

4.2.3.2. Buzağı timüs DNA'sı ile FP-3 kodlu boyanın farklı derişim oranlarındaki etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektroforezi analizleri ile incelenmesi ve etkileşim türünün belirlenmesi

Perilen dimit türevi olan FP-3 kodlu boyanın, DNA'nın baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yaptığı daha önce agaroz jel elektroforezi tespit edilmiştir. Bu çalışmada söz konusu boyar maddenin farklı derişimleri ile DNA'nın sabit derişimindeki etkileşimleri agaroz jel elektroforez ile incelenmiştir. 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M derişimde olacak şekilde FP-3 boya çözeltileri hazırlanmıştır. Derişimi $1,3 \times 10^{-6}$ M olan DNA ile FP-3, kodlu boyaların eşit hacimdeki (1:1) karışımları 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bölüm 2.4.1.1.'de detaylıca anlatıldığı şekilde agaroz jeli hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yükleme boyası ile DNA-boya etkileşim çözeltileri hacimce 1:5 oranında karıştırılarak 10 µl jel haciminde jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Daha sonra Fisherbrand™ multiSUB™ Midi Horizontal Gel System (ThermoFisher Scientific Inc, Amerika Birleşik Devletleri)'de 120 V'da 30 dakika boyunca örneklerin jelde yürütme işlemi yapılmıştır.

Şekil 4.60'ta soldan 1. hatta serbest DNA, 2. hatta DNA ile 10^{-6} M FP-3 etkileşimi, 3. hatta DNA ile 10^{-5} M FP-3 etkileşimi ve 4. hatta DNA ile 10^{-4} M FP-3 etkileşimine ait jel fotoğrafları yer almaktadır. Burada görüleceği üzere serbest halde DNA'nın ihmal edilebilir düzeyde ışıma yaptığı, derişimin artmasıyla birlikte etkileşime ait floresans veriminin arttığı ve jelde daha kuvvetli ışıma oluştuğu gözlenmiştir. Derişimin artmasının sonucu olarak çoklu stokiyometride etkileşimlerin de gerçekleşmiş olabileceği de düşünülmüştür. 4. hatta DNA ile etkileşen FP-3 anota doğru hareket ederken 4. hattın başında görülen daha kuvvetli ışımaya perilen kromoforlarının kümelenmesi, çökmesi sonucu olarak DNA ile etkileşmeden kalan FP-3 yapılarının sebep olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4. 60. Soldan sağa sırasıyla, DNA, DNA+ 10^{-6} M FP3, DNA+ 10^{-5} M FP3, DNA+ 10^{-4} M FP3 etkileşimlerine ait agaroz jel görüntüsü

Florimetrik deneylerden elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak jel elektroforetik yöntemlerle de perilen diimit türevi olan FP-3 boyasının DNA için iyi bir interkalaötr olduğu sonucu desteklenmiştir. Diğer taraftan, FP-3 ile daha önce yapılan kütle spektrometrik deneylerde kısa zincirli DNA yapıları kullanılmıştı. DNA oluşma veriminin düşük olması, kısa zincirli sarmalın kararsızlığı ve yaklaşık her 10 baz biriminde bir meydana gelen bir tam dönüşün (rotasyonun) olamaması kaynaklı DNA'da interkalasyon yapılabilecek alan oluşamaması nedenleriyle etkileşimin olmadığı yorumları yapılmıştı. Burada uzun zincirli büyük DNA yapısının kullanılmasıyla FP-3 yapısının DNA sarmalına interkalasyon yapabileceği alanın varlığı ile bu boya ile etkileşim çalışmalarında uzun zincirli çift sarmal DNA kullanımının gerekliliğini bir kez daha kanıtlamıştır.

Yüksek molekül ağırlık ve uzun zincirli DNA'nın baz çiftleri arasına interkale olarak etkileşime giren FP-3 yapısının etkin bir şekilde görüntüleme ajanı olarak EtBr'ye alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca uzun zincir DNA ile inkübasyon ortamında kolaylıkla etkileşime giren bu boyanın kullanımının klasik jel boyama (staining) yöntemine gerek kalmayarak örnek boya hacmi açısından daha düşük miktarlarda boya çözeltisi kullanımı sağlayarak deneysel çalışmalarda maliyeti düşüreceği ve en önemlisi de EtBr gibi yüksek oranda kanserojen olan boyanın kullanımındaki sınırlamaları ortadan kaldıracak yorumu yapılmıştır. Ancak perilen diimit türevi olan bu yapılarla çalışılırken sıklıkla karşılaşılan çözünürlük probleminin görüntüleme uygulamalarını sınırlamasının önüne geçilmesi için polar çözücülerde çözünürlüğü artırıcı çalışmaların yapılarak biyolojik ve tıbbi alanlarda bu floroforların kullanımının genişletilmesi gerekmektedir.

Daha önce Bölüm 4.2.2'de spektroskopik deneylerle PT-5 ve PT-6'nın DNA ile etkileşim mekanizmaları belirlenmiş olup jel elektroforetik yöntemlerle yapılan deney sonuçlarıyla da bu etkileşim mekanizmaları desteklenmiştir. Platin (II) içeren PT-6 ve paladyum (II) içeren PT-5 kodlu boyalar DNA ile etkileşimlerinde, DNA ile iyi interkalasyon yaptığı literatürde birçok çalışmada raporlanmış olan EtBr molekülüne kıyasla daha zayıf floresans etki gösterebilir de bu boyaların EtBr'ye alternatif görüntüleme ajanı olarak bazı sınırlamalar ile birlikte özellikle uzun çift sarmal DNA ile etkileşimlerde kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. Literatürde yer alan platin (II) metali içeren farklı amino asitler bağlı olan 1,10-fenantrolin ($[Pt(phen)(AA)]^+$, AA: Glisin, lösin, fenilalanin, tirozin, triptofan) komplekslerinin buzağı timus DNA'sı ile etkileşiminin floresans spektroskopisi ile incelendiği bir çalışmada platin içeren komplekslerin düşük konsantrasyonlarda interkalatif bağlanma ile DNA'daki Etidyum Bromürün interkalasyonunu inhibe ettikleri ve daha yüksek konsantrasyonlarda interkalatif olmayan bağlanma gösterdikleri raporlanmıştır [178]. Bununla birlikte literatürde yer alan birçok çalışmada platin ve paladyum içeren benzimidazol türevi moleküllerle ilgili heyecan verici sonuçlar paylaşılmıştır [34].

Tez çalışmasının bu bölümünde, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların her ne kadar DNA görüntülemede alternatif ajan olarak kullanılıp kullanılamayacakları irdelense de daha önceki kütle spektrometrik ve spektroskopik yöntemlerle tespit edilen ve bu bölümde de jel elektroforetik yöntemlerle desteklenen bir sonuç olarak bu boyaların DNA ile çoklu

stokiyometride ve kararlı olarak etkileşime girdikleri açıktır. Özellikle araştırmacıların anti-kanser ajanı olarak sitotoksik özellikler gösteren ve bunun yanı sıra hiç yan etki göstermeyen veya düşük yan etki gösteren metal kompleksleri üzerine araştırmaları artmıştır. Bu metal kompleksleri arasında ise paladyum ve platin kompleksleri öne çıkmaktadır. Paladyum kompleksleri, platin tarafından oluşturulan diğer komplekslere benzer olduklarından büyük ilgi görmektedir. Ancak paladyum komplekslerinin platine kıyasla daha iyi çözünürlüğü bu yapıları daha çekici hale getirmektedir. Öte yandan paladyumun yüksek reaktivitesi kaynaklı olarak yapısal bütünlüğünü DNA'ya ulaşacak kadar uzun süre koruyamaması nedeniyle kararlı etkileşimler oluşturup antikanser ajanları olarak kullanımları zordur. Hem tez kapsamında yapılan çalışmalarla hem de literatürde paylaşılan birçok raporda da belirtildiği üzere platin komplekslerinin DNA ile paladyum komplekslerine kıyasla daha kararlı etkileşime girdiği bilinmektedir. Benzimidazol türevi bu boyaların DNA ile iyi etkileştikleri bilindiğinden tıp alanında kanser teşhisi ve ileriki deneysel çalışmalarla birlikte kanser tedavisi alanında, yan etkileri ve direnci bilinen cis-platine alternatif olarak kullanılabilme olasılıkları heyecan vericidir.

Platin(II) ve paladyum(II) geçiş metalleri bazlı değişik fonksiyonel gruplara sahip benzimidazol türevi ligandlar içeren polar çözücülerde çözünürlüğü yüksek perilen diümit sistemlerin sentezlenerek bu yapıların hem interkalasyon yoluyla hem de nükleobaz seçiciliği ile birden fazla bağlanma moduyla nükleik asitlerle gerçekleştirecekleri etkileşimlerin etkinliklerinin Kütle Spektrometrisi ve spektroskopik yöntemlerle tayin edilmesi ileriki çalışmaların konusu olmalıdır. Bu yapıların kanser teşhis ve tedavisi amacıyla kullanılan literatürdeki model yapılara ve DNA görüntüleme amacıyla kullanılan EtBr'ye alternatif olup olamayacağı araştırılacaktır. Şekil 4.61'de ileriki çalışmalarda kullanılması planlanan yapılar verilmiştir.



Şekil 4. 61. İleriki çalışmalarda kullanılması planlanan Pt(II) ve Pd(II) geçiş metali bazlı benzimidazol türevi ligandlar içeren perilen diimit temelli yapılar A) $C_{94}O_{12}N_{12}H_{72}Pt_2$ ve B) $C_{94}O_{12}N_{12}H_{72}Pd_2$

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında benzimidazol temelli paladyum (II) ve platin (II) kompleksleri ve perilen diimit türevi yapıların tek iplik DNA oligonükleotitleri, çift sarmal kısa ve uzun DNA'lar ve tek iplik aptamerler ile kovalent olmayan etkileşimleri hem DNA ile etkileşime girme mekanizmaları üzerinden hem de bu yapıların DNA ile oluşturdıkları komplekslerin spektroskopik özelliklerinden dolayı DNA etkileşimleri ve DNA görüntüleme amacıyla kullanılabilme üzerinden tartışılmıştır.

- 1) N,N-di(n-butyl)-1,6,7,12-tetra(4-hidroksifenoksi)perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit (FP-3 kodlu) molekülü, Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II), [Pd(L₂)(sac)] (sac) (PT-5 kodlu) molekülü ve Sakkarinato-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II), [Pt(L₂)(sac)] (sac) (PT-6 kodlu) molekülünün MALDI-MS ile refletron pozitif modda ve ESI-MS ile pozitif modda karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.
- 2) Oligonükleotitlerin analizlerinde matriksin etkisinin incelenmesi amacıyla farklı matriksler ile farklı oranlardaki analit:matriks karışımları denemesi yapılmıştır. Nükleik asitlerin analizlerinde en uygun matrikslerin sırasıyla 3-HPA, THAP, ATT şeklinde olduğu belirlenmiştir. Oligonükleotitlerle en iyi çalışan matriksin 1:1 (analit:matriks) oranında on-spot olarak hazırlanan 3-HPA olduğu sonucuna ulaşılmıştır.
- 3) ON-1'den ON-14'e kadar olan tek iplik DNA oligonükleotitlerinin ve birbirlerinin tamamlayıcısı olan oligonükleotitlerin eşleşmesinden oluşan DS-1'den DS-7'ye kadar olan çift iplik DNA'ların 1:1 analit:matriks oranında on-spot olarak hazırlanan 3-HPA matriksi kullanılarak MALDI-MS ile lineer pozitif modda karakterizasyonları yapılmıştır.
- 4) Çift iplik DNA oluşumunda tavlama yönteminin (annealing process) etkisinin araştırılması amacıyla birbirlerinin tamamlayıcısı olan oligonükleotitlerden çift iplik oluşturulması amacıyla tavlama yöntemi ve ısı işlem görmeden (tavlanma yöntemi uygulanmadan) direkt karıştırılan oligonükleotitler, 3-HPA matriks ile 1:1 on-spot yöntemiyle hazırlanarak MALDI-MS ile lineer pozitif modda analiz edilmiştir. Model olması açısından yalnızca DS-5 kodlu DNA seçilmiştir. Tavlama yöntemi ile oluşan

çift iplik DNA veriminin tavlanmamışa oranla iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Tavlanma sürecindeki ısıtma ve ardından kademeli olarak soğumaya bırakma işlemi, hibritleşmeyi kolaylaştırarak hidrojen bağı oluşma verimini dolayısıyla DNA oluşma verimini arttırmaktadır. Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde çift iplik DNA oluşturmak için tavlanma süreci uygulanmıştır.

- 5) Çift iplik DNA'ların MALDI-MS ile lineer pozitif modda karakterizasyonları yapılmıştır. DNA yapısının bağlanma özellikleri, çift sarmalı oluşturan GC baz çiftlerinin yüzde oranına bağlı olarak değişmekte olup DS-1 %50, DS-2 %70, DS-3 %40, DS-4 %67, DS-5 %67, DS-6 %50, DS-7 %67 oranında G-C içeriğine sahiptir. Tüm DS karakterizasyon spektrumlarında, çift iplik DNA'ya ait sinyaller ile oligonükleotitlerin dimerlerine ait sinyal şiddetlerinin neredeyse aynı olduğu görülmüş ve dimer iyonlarının çift iplik DNA iyonlarını baskıladığı yorumu yapılmıştır. Deneysel sonuçlar incelendiğinde yalnızca G-C içeriği kıyaslaması yaparak DNA kuvveti ve kararlılığıyla ilgili kesin bir yorum yapılamamıştır.
- 6) Oligonükleotitlerin analizlerinde en iyi çalışan MALDI matriksinin 3-HPA olduğu FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyarların analizlerinde ise en uygun MALDI matriksinin DHB olduğu belirlenmiştir. Nükleik asit-boya etkileşimlerinin analizleri için optimum matriksin belirlenmesi amacıyla DHB ve 3-HPA matriks kullanılarak etkileşim tayini yapılmıştır. Sonuç olarak nükleik asit-boya etkileşimlerinin iyonlara ait sinyallerin 3-HPA matriksi ile gözlenmesinin daha uygun olduğu ve DHB matriksi ile elde edilen sinyallere göre daha iyi ayırıcılık ve sinyal şiddetine sahip oldukları tespit edilmiştir. Etkileşimlerin incelendiği MALDI kütle spektrometrik deneysel çalışmaların tümünde 3-HPA matriksi kullanılarak analit:matriks oranı 1:1 (hacimce) olan on-spot yöntemiyle kristallendirilmiş örnekler kullanılmasına karar verilmiştir.
- 7) Nükleik asit-boya etkileşimlerinin incelendiği deneysel çalışmalarda kütle spektrometrik sistemlerde ortama amonyum eklenmesiyle katyon katılmalarının önüne geçildiği bilindiğinden ve nükleik asit-boya etkileşimlerinin fizyolojik koşullarda araştırılması amacıyla inkübasyon ortamı olarak pH=7.0'da amonyum asetat tamponu seçilmiştir.

- 8) Nükleik asit-boya etkileşimlerinin MALDI-MS ile analizleri hem lineer hem reflektör pozitif ve negatif modlarında çalışılmış olup lineer pozitif iyon modunda alınan kütle spektrumlarının daha iyi olduğu belirlenmiştir.
- 9) ON-15 ve ON-16 kodlu oligonükleotitler ile FP-3 kodlu boyanın eşit derişimde ve hacimce 1:10 oranında hazırlanan, kovalent olmayan etkileşimlerinin incelendiği MALDI-MS ile lineer pozitif moddaki analizler sonucunda; FP-3 kodlu boyanın her iki oligonükleotit ile 1:1 stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür.
- 10) Bağlanma seçiciliği değerlendirmek için dizilimleri birbirinden farklı ON-1'den ON-14'e kadar tek iplik oligonükleotitler ve DS-1'den DS-7'ye kadar çift iplik DNA'lar ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyalar eşit hacim ve derişimde (5 pmol/μl) karıştırılarak 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında etkileşimleri MALDI-MS ile lineer pozitif moda ve ESI-MS pozitif iyon modunda incelenmiştir:
- MALDI-MS ve ESI-MS'te FP-3 kodlu boyanın ON-1-ON-14 kodlu oligonükleotitler ile ve DS-1-DS-7 kodlu çift iplik DNA'lar ile etkileşime girmediği tespit edilmiştir. PT-5 ve PT-6 boylarıyla olan etkileşimler Çizelge 5.1'de topluca verilmiştir.
 - DS-1 ile platin ve paladyum bağlı boya etkileşimi olmamıştır. Ancak bu DNA'yı oluşturan tek iplik oligonükleotitler ile 1:1 ve çoklu stokiyometride etkileşimler gerçekleşmiştir.
 - Yapısında hiç guanin bulunmayan ON-10 yapısıyla çoklu stokiyometride platin etkileşimlerinin gerçekleşmiş olması adenin bağlanmasının yanı sıra yüksek sitozin ve timin içeriği nedeniyle bu bazlar aracılığıyla da platin için alternatif bağlanma bölgesi oluşturduğu tespit edilmiştir.
 - Bağlı DNA bağlanma yüzdesine göre DNA ile boyaların etkileşimleri için en yüksek bağlanma oranının MALDI-MS'te DS-3 ve ESI-MS'te DS-2 kodlu DNA'lar ile olduğu görülmüştür. Baz dizilimlerine göre diğer DNA'lara kıyasla daha az bağlanma bölgesi içeren DS-3 ile en yüksek bağlanma olmasının nedeni olarak baz dizilimi seçiciliği olmadan bağlanma olasılığının yüksek olduğu düşünülmüştür. Diğer DS'ler ile etkileşimlerin göreceli olarak literatürle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.
 - MALDI ve ESI kütle spektrometresi analizlerinde gerek PT-5 gerekse PT-6 yapılarının her ikisinin de tüm baz birimleriyle etkileşime girdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5. 1. PT-5 ve PT-6 nükleik asit etkileşimlerinin MALDI-MS ve ESI-MS toplu sonuçları.

MALDI-MS				ESI-MS			
ON:boya kodu	ON:boya etkileşim stokiyometrisi	DS:boya kodu	DS:boya etkileşim stokiyometrisi	ON:boya kodu	ON:boya etkileşim stokiyometrisi	DS:boya kodu	DS:boya etkileşim stokiyometrisi
ON5:PT5	1:1, 1:2	DS3:PT5	1:1, 1:3	ON3:PT5	1:1, 1:2	DS2:PT5	1:1, 1:2
ON6:PT5	1:1, 1:2			ON4:PT5	1:1, 1:2		
ON7:PT5	1:1, 1:2	DS4:PT5	1:2, 1:4	ON11:PT5	1:1	DS6:PT5	1:1
ON8:PT5	1:1, 1:2			ON12:PT5	1:1		
ON7:PT6	1:1, 1:2, 2:2	DS4:PT6	1:1, 1:2	ON13:PT5	1:1, 1:2	DS7:PT5	1:1
ON8:PT6	1:1, 1:2			ON14:PT5	1:1, 1:2		
ON9:PT6	1:1, 1:2	DS5:PT6	1:1	ON7:PT6	1:1	DS4:PT6	1:1, 1:2
ON10:PT6	1:1, 1:2, 2:1, 2:2			ON8:PT6	1:1, 1:2		
ON11:PT6	1:1, 1:2, 2:1	DS6:PT6	1:1, 1:2	ON9:PT6	1:1, 1:2, 2:2	DS5:PT6	1:1
ON12:PT6	1:1, 1:2			ON10:PT6	1:1, 1:2		
-	-	-	-	ON11:PT6	1:1, 2:1	DS6:PT6	1:1
-	-			ON12:PT6	1:1, 2:1, 2:2		

- Çoklu stokiyometrideki etkileşimlerin nükleobaz bağlanmasına bir alternatif olarak fosfat omurgasına bağlanma şeklinde gerçekleşmiş olabileceği de düşünülmüştür.
- FP-3 kodlu perilen diimit türevi yapının hem kısa iplikli oligonükleotitler hem de kısa zincirli DNA'lar ile etkileşime girmediği MALDI-MS ve ESI-MS yöntemleriyle tespit edilmiştir. Perilen diimit türevi olan FP-3 boyasının çözünürlüğünün düşük olması, çözelti ortamında çökmeler olması, ON-1'den ON-14'e kadar olan oligonükleotit ipliklerinin 6-12 baz birimi aralığında olması nedeniyle bu oligonükleotitlerin eşleşmesinden oluşan çift iplik DNA'ların kısa olması ve tam rotasyon yapamayarak interkalatör FP-3 molekülü için bağlanma bölgesi (groove) oluşturamamasından

kaynaklı da etkileşimlerin gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Yüksüz olan FP-3 yapısının DNA'nın fosfat omurgası ile de herhangi bir etkileşime girmediği görülmüştür.

- MALDI-MS ve ESI-MS analizlerinin her ikisinde de çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olduğu gözlenmiştir. Oligonükleotit iplikleri 6-10-12 mer uzunlukta olup çift iplik DNA oluşumunda tavlanma sürecinde baz eşleşmesinin yanı sıra iplikler arası bağlanmalar, kuvvetler ile kararlı hale gelecek uzunlukta iplikler olmaması nedeniyle çift iplik DNA oluşma veriminin düşük olduğu yorumu yapılmıştır. Sarmal kararlılığının düşük olmasının çift iplik DNA'nın açılarak oligonükleotit dizilerini çözeltide serbest halde bulunmasına imkan verdiği ve bu oligonükleotitler ile boyaların etkileşimlerinin çift iplik DNA-boya etkileşimlerine kıyasla daha kararlı oldukları ve dolayısıyla daha yüksek şiddette sinyal vererek DNA-boya etkileşimlerini baskıladıkları, ayrıca özgün etkileşimlerin yanı sıra çoklu stokiyometride de etkileşime girdikleri görülmüştür.
- MALDI-MS ve ESI-MS analizleri sonucunda etkileşim stokiyometrilere ve sinyal şiddetleri farklı sonuçların nedenleri olarak iyonlaşma mekanizmalarındaki farklılık, tekli ve çoklu yüklenme özellikleri, spesifik olmayan katyon katılmaları ile etkileşime ait sinyallerin kararlılığının ve şiddetinin azalması, MALDI'de gaz fazında kompleks oluşumu, ESI'da çözelti fazında kompleks oluşumu, ESI iyonlaştırmanın etkileşimler sonucunda oluşan kompleks yapıların iyonlaşmasına uygun bir yöntem olmaması yorumları yapılmıştır.

11) Çift iplik DNA'lar ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların inkübasyon ortamındaki stokiyometrilere kompleks oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla boyaların sabit derişimine karşı DS-5 kodlu çift iplik DNA'nın farklı derişim oranlarındaki etkileşimleri MALDI-MS ile incelenmiştir. PT-5'in DS-5 ile PT-6'ya kıyasla daha fazla stokiyometride etkileşime girdiği görülmüştür. Ancak etkileşimlere ait sinyal şiddetleri incelendiğinde paladyum bağlı iyonlara ait sinyal şiddetlerinin 10^4 mertebesinde platin bağlı iyonlara ait sinyal şiddetlerinin ise 10^5 mertebesinde olduğu tespit edilmiş olup platin komplekslerinin paladyuma nazaran daha kararlı olduğu yorumu yapılmıştır.

12) İnkübasyon süresinin kompleks oluşum miktarına etkisinin araştırılması için 0-72 saat aralığında zaman taraması yapılmış ve MALDI-MS'te lineer pozitif modda analizler

gerçekleştirilmiştir. Özgün 1:1 stokiyometrideki tüm etkileşimler için optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur. Ayrıca inkübasyon süresi arttıkça özgün olan 1:1 stokiyometrideki etkileşimlerin yanında baz seçimli etkileşimlerin meydana gelmesiyle çoklu stokiyometrilere de etkileşimler gerçekleşmiştir.

13) Aynı molekül kütlesine sahip farklı dizilimdeki ON-7 ve ON-8 kodlu oligonükleotitlerin konformasyonel olarak farklılıklarının ve bu oligonükleotitlerin eşleşmesi ile oluşan DS-4 kodlu çift iplik DNA ile PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin konformasyonel olarak incelenmesi amacıyla İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi (IM-MS) analizleri ile analizleri yapılmıştır. Yapıların farklı yüklerde farklı konformerlere sahip olabildiği ve bunların da farklı konformasyonel özellikler gösterdiği gözlenmiştir. Aynı molekül kütlesine sahip ancak farklı dizilimdeki oligonükleotitlerin farklı konformasyonel özelliklere sahip oldukları, birbirleriyle eşlenik olan bu oligonükleotitlerin çift iplik DNA yapısına farklı katkılarının bulunduğu, bunların boyalarla etkileşimlerinde baz dizilimi seçiciliğiyle birlikte etkileşimlere ait kompleks yapılarda farklı konformasyonel özelliklerin oluştuğu, DNA ile birden fazla boya etkileşiminde her bir boya için eşit konformasyonel katkının olmadığı tespit edilmiştir.

14) Eşit derişimde ve hacimde hazırlanan aptamerler ile PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların kovalent olmayan etkileşimlerinin lineer pozitif mod MALDI-MS ve pozitif mod ESI-MS ile incelenmiştir. Tüm boyalarla olan etkileşimler Çizelge 5.2’de topluca verilmiştir.

- APT-2, 3, 4 ve 7’nin dizilimleri ve spektrumları karşılaştırıldığında FP-3 boyasının bağlanma stokiyometrisinde kayda değer baz çifti seçiciliği göstermediği ve ayrıca FP-3’ün çözelti ortamında kümelenerek birleşmesinden kaynaklı olarak çoklu stokiyometride nükleik asitlere bağlanması da olasıdır.
- Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda FP-3’ün kısa zincirli oligonükleotit dizileri (6-12 mer) ile etkileşime girmediği tespit edilmiştir. 18 mer uzunluktaki APT-2, APT-3, APT-4 ile 1:1 stokiyometride etkileşim olmasına rağmen 21 mer uzunluktaki APT-7 ile 1:1 ve 1:2 stokiyometride etkileşim oluşması APT-7 yapısının uzun zincirinin kendi içinde rotasyon yaparak veya iplik içi baz eşleşmesi ile FP-3 yapısı için interkalasyon yapabileceği bölge oluşturmuş olabileceği düşünülmüştür. Ancak büyük

hacimli bir yapı olan FP-3 yapısının interkalasyondan ziyade kısmi interkalasyon yapmış olabileceği yorumu daha baskın gelmektedir.

- FP-3 yapısının aptamerler ile etkileşim yolu olarak elektrostatik, interkalasyon veya kısmi interkalasyon yollarından hangisini seçtiği hakkında kesin sonuca varmak mümkün olmamıştır.

Çizelge 5. 2. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın aptamelerle etkileşimlerinin MALDI-MS ve ESI-MS toplu sonuçları.

MALDI-MS		ESI-MS	
APT:boya kodu	APT:boya etkileşim stokiyometrisi	APT:boya kodu	APT:boya etkileşim stokiyometrisi
APT2:PT5	Etkileşim gözlenmedi.	APT2:PT5	1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 ve 1:8
APT4:PT5	1:1, 1:2	APT4:PT5	1:3, 1:4, 1:5, 1:6 ve 1:7
APT2:PT6	1:1, 1:2, 1:3	APT2:PT6	1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4
APT4:PT6	1:1, 1:2, 1:3	APT4:PT6	1:2, 1:3 ve 1:4
APT2:FP3	1:1	-	-
APT3: FP3	1:1	-	-
APT4: FP3	1:1	-	-
APT7: FP3	1:1, 1:2	-	-

15) Tüm kütle spektrometrik sonuçlar değerlendirildiğinde; platin ve paladyum bağlı ligandların baz dizilimi seçiciliğiyle etkileşime girdikleri, molekül içi hidrojen bağlanmalarla kararlılıklarını arttırdıkları ve bunların yanı sıra protonlanmış ve katyon katılmış hallerinin de oligonükleotitler ile baz diziliminden bağımsız, seçimsiz olarak elektrostatik etkileşime girmiş olabileceği ve çift iplik DNA ile boya etkileşimlerini minimize ettiği ve baskıladığı sonucuna varılmıştır.

16) Platin (II) bağlı ligandla (PT-6) olan etkileşimler paladyum (II) bağlı ligand (PT-5) ile olan etkileşimlere kıyasla daha yüksek şiddette sinyal vermiş olup platin

etkileşimlerinin daha kuvvetli ve kararlı olduğu belirlenmiştir. Paladyum (II) bileşiklerinin yüksek reaktivitesi nedeniyle ligand değişim kinetiğinin çok hızlı olmasından kaynaklı olarak platin komplekslerine kıyasla daha kararsız kompleks oluşturması nedeniyle düşük sinyal şiddetine sahip etkileşim iyonları oluşturduğu düşünülmüştür.

17) FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların nükleik asitler ile etkileşim mekanizmalarının kesin olarak aydınlatılabilmesi için boyanın sabit derişimine karşı artan DNA derişimi ile Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ile analizleri gerçekleştirilmiş ve absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler incelenmiştir.

- DS-3-PT-5'in bağlanma sabitlerinin, DNA ile iyi interkalasyon yapan EtBr molekülünün bağlanma sabitinden ($K_b = 1,40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) küçük olduğu fakat FP-3'ün bağlanma sabitlerinin göreceli olarak EtBr'nin bağlanma sabitine yakın olduğu görülmüştür.
- DS-5-PT-5, DS-5-PT-6 ve DS-5-FP-3'ün bağlanma sabitlerinin EtBr'ye göre daha yüksek olduğu görülmüş olup bu yapıların DS5 ile iyi interkalasyon yaptıkları tespit edilmiştir. Platin metalli PT-6'nın bağlanma sabitinin ise paladyum metalli PT-5'in bağlanma sabitine göre daha büyük olması nedeniyle platin komplekslerinin daha kararlı olduğu yorumu yapılmıştır.
- Uzun zincirli buzağı timüs DNA sarmalı ile olan bağlanma sabitlerinin 10^7 M^{-1} mertebesinde olduğu ve kısa zincirli DNA'lara (DS-3, DS-5 gibi) kıyasla daha büyük olduğu görülmüştür. FP3 ve PT6 kodlu boyaların uzun zincirli DNA ile daha kararlı interkalasyon yaptığı tespit edilmiştir.
- DS-5 ile etkileşimlere ait bağlanma sabitlerinin DS-3 etkileşimlerine göre daha büyük olduğu tespit edilmiş olup DS-5 ile oluşan etkileşimlerin daha kararlı olduğu yorumu yapılmıştır. Baz diziliminden yola çıkılarak bağlanma bölgeleri ve bağlanma olasılıkları hakkındaki bilgiler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 5.3'te UV-vis Spektroskopi toplu sonuçları verilmiştir.

Çizelge 5. 3. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın DNA'larla etkileşimlerinin UV-vis Spektroskopi toplu sonuçları.

UV-vis Spektroskopi		
DS:boya kodu	DS:boya etkileşim türü	Etkileşim bağlanma sabiti, K_b (M^{-1})
DS3:FP3	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_{b(460\text{ nm})} = 1,00 \times 10^6$ $K_{b(570\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5$ $K_{b(620\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5$
DS3:PT5	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_{b(280\text{ nm})} = 5,00 \times 10^5$ $K_{b(320\text{ nm})} = 3,00 \times 10^5$
DS3:PT6	Absorpsiyon şiddetinde artma-Elektrostatik veya kısmi interkalasyon	$K_{b(280\text{ nm})} = 1,20 \times 10^6$ $K_{b(320\text{ nm})} = 5,00 \times 10^5$
DS5:FP3	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_{b(460\text{ nm})} = 1,60 \times 10^6$ $K_{b(570\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6$ $K_{b(630\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6$
DS5:PT5	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_{b(280\text{ nm})} = 1,50 \times 10^6$ $K_{b(320\text{ nm})} = 2,00 \times 10^6$
DS5:PT6	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_{b(280\text{ nm})} = 1,50 \times 10^6$ $K_{b(320\text{ nm})} = 3,00 \times 10^6$
Buzağı timüs DNA:FP3	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_b = 2,00 \times 10^7$
Buzağı timüs DNA:PT6	Absorpsiyon şiddetinde azalma-İnterkalasyon	$K_b = 1,00 \times 10^7$

18) FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların nükleik asitlerle etkileşimlerinin floresans özelliklerinin incelenmesi için boyanın sabit derişimine karşı artan DS-5 ve buzağı timüs DNA derişimi ile Floresans Spektroskopisi ile analizleri gerçekleştirilmiş olup Çizelge 5.4'te toplu sonuçlar verilmiştir.

- Tüm boyaların serbest halde floresans özellik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çizelge 5. 4. FP-3, PT-5 ve PT-6'nın DNA'larla etkileşimlerinin Floresans Spektroskopi toplu sonuçları.

Floresans Spektroskopi	
DS:boya kodu	DS:boya etkileşim türü
DS5:FP3	Floresans şiddetinde giderek azalma ve 5 nm maviye kayma-İnterkalasyon
DS5:PT5	Floresans şiddetinde çok fazla değişiklik yok-Etkileşim mekanizması belirlenemedi
DS5:PT6	Floresans şiddetinde giderek azalma- İnterkalasyon
Buzağı timüs DNA:FP3	Floresans şiddetinde giderek azalma- İnterkalasyon
Buzağı timüs DNA:PT6	Floresans şiddetinde giderek azalma ve 5 nm maviye kayma-İnterkalasyon

19) Buzağı timüs DNA'sı ile FP-3, PT-5 ve PT-6 kodlu boyaların etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

- DNA çok düşük, ihmal edilebilir düzeyde floresans özellik göstermiştir.
- Kontrol amaçlı kullanılmak üzere yüklenen DNA+EtBr etkileşiminin en yüksek floresansı verdiği gözlenmiştir.
- FP-3 boyası ile DNA'nın EtBr ile olduğu kadar olmasa da göreceli olarak kuvvetli bir floresans ışıması verdiği görülmüştür.
- PT-6 ve PT-5 kodlu boyaların ise DNA ile etkileşime girerek floresans ışıma verdikleri görülmüştür. Platin içeren PT-6'nın paladyum içeren PT-5'e kıyasla daha yüksek şiddette ışıma verdiği görülmüş olup platin komplekslerinin paladyuma kıyasla daha kararlı olduğu söylenmiştir.
- DNA'nın sabit derişimine karşı FP-3 kodlu boyanın farklı derişim oranlarındaki (10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} M) etkileşimlerinde; derişimin artmasıyla birlikte etkileşime ait floresans veriminin arttığı ve jelde daha kuvvetli ışıma oluştuğu gözlenmiştir. Derişimin artmasının sonucu olarak çoklu stokiyometride etkileşimlerin de gerçekleşmiş olabileceği de düşünülmüştür.

20) Florimetrik deneylerden elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak jel elektroforetik yöntemlerle de perilen diimit türevi olan FP-3 boyasının DNA için iyi bir interkalatör olduğu sonucu desteklenmiştir ve etkin bir şekilde görüntüleme ajanı olarak EtBr'ye

alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. Uzun zincirli büyük DNA yapısının kullanılmasıyla birlikte FP-3 yapısının DNA sarmalına interkalasyon yapabileceği alanın varlığı ile bu boya ile etkileşim çalışmalarında uzun zincirli çift sarmal DNA kullanımının gerekliliği desteklenmiştir. Öte yandan biyolojik sistemlerde kullanılacak olan perilen diimit türevi bu boyanın su gibi polar çözücülerde çözünürlüğünün arttırılması çalışmaları yapılarak sulu çözeltideki güçlü π - π istifleme etkileşimlerinin dolayısıyla da floresansın kuvvetli biçimde kendi kendini söndürme etkisinin önüne geçilmesi gerekmektedir.

- 21) Platin (II) içeren PT-6 ve paladyum (II) içeren PT-5 kodlu boyalar DNA ile etkileşimlerinde, DNA ile iyi interkalasyon yaptığı literatürde birçok çalışmada raporlanmış olan EtBr molekülüne kıyasla daha zayıf floresans etki gösterebilir de bu boyaların EtBr'ye alternatif görüntüleme ajanı olarak bazı sınırlamalar ile birlikte özellikle uzun çift sarmal DNA ile etkileşimlerde kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır. Benzimidazol türevi bu boyaların (kütle spektrometrisi ve spektrometrik analiz sonuçlarına göre) DNA ile iyi etkileştikleri bilindiğinden tıp alanında kanser teşhisi ve ileriki deneysel çalışmalarla birlikte kanser tedavisi alanında, yan etkileri ve direnci bilinen cis-platine alternatif olarak kullanılabileme olasılıkları yüksektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. N. Topkaya and A. E. Cetin, "Determination of Electrochemical Interaction between 2-(1H-benzimidazol-2-yl) Phenol and DNA Sequences," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 8, pp. 1571–1578, Aug. 2019, doi: 10.1002/ELAN.201900199.
- [2] S. N. Topkaya, G. Serindere, and M. Ozder, "Determination of DNA Hypermethylation Using Anti-cancer Drug-Temozolomide," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 5, pp. 1052–1059, May 2016, doi: 10.1002/ELAN.201501027.
- [3] S. E. Pierce, R. Kieltyka, H. F. Sleiman, and J. S. Brodbelt, "Evaluation of binding selectivities and affinities of platinum-based quadruplex interactive complexes by electrospray ionization mass spectrometry," *Biopolymers*, vol. 91, no. 4, pp. 233–243, 2009, doi: 10.1002/bip.21130.
- [4] D. L. Ma, D. S. H. Chan, P. Lee, M. H. T. Kwan, and C. H. Leung, "Molecular modeling of drug–DNA interactions: Virtual screening to structure-based design," *Biochimie*, vol. 93, no. 8, pp. 1252–1266, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2011.04.002.
- [5] M. Monajjemi and F. Mollaamin, "Molecular Modeling Study of Drug-DNA Combined to Single Walled Carbon Nanotube," *J. Clust. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 259–272, Jun. 2012, doi: 10.1007/s10876-011-0426-y.
- [6] T. Ellis, D. A. Evans, C. R. H. Martin, and J. A. Hartley, "A 96-well DNase I footprinting screen for drug-DNA interactions," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 12, Jun. 2007, doi: 10.1093/nar/gkm467.
- [7] S. Dogra, P. Awasthi, S. Tripathi, T. P. Pradeep, M. S. Nair, and R. Barthwal, "NMR-based structure of anticancer drug mitoxantrone stacked with terminal base pair of DNA hexamer sequence d-(ATCGAT) 2," *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 32, no. 7, pp. 1164–1183, Jul. 2014, doi: 10.1080/07391102.2013.809021/SUPPL_FILE/TBSD_A_809021_SM7306.DOC.
- [8] M. Raja, J. Albertí, J. Saurina, and S. Sentellas, "Liquid chromatography-mass spectrometry as a general approach for investigating covalent binding of drugs to DNA," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 14, pp. 3911–3922, May 2016, doi: 10.1007/S00216-016-9481-4/TABLES/2.
- [9] C. J. Baltazar, R. Mun, H. A. Tajmir-Riahi, and J. Bariyanga, "Spectroscopic studies on the interaction of mimosine with BSA and DNA," *J. Mol. Struct.*, vol.

- 1161, pp. 273–278, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2018.01.039.
- [10] F. Araya, G. Huchet, I. McGroarty, G. G. Skellern, and R. D. Waigh, “Capillary electrophoresis for studying drug–DNA interactions,” *Methods*, vol. 42, no. 2, pp. 141–149, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.YMETH.2006.09.006.
- [11] F. C. Loo, S. P. Ng, C. M. L. Wu, and S. K. Kong, “An aptasensor using DNA aptamer and white light common-path SPR spectral interferometry to detect cytochrome-c for anti-cancer drug screening,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 198, pp. 416–423, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.SNB.2014.03.077.
- [12] M. A. Husain, H. M. Ishqi, T. Sarwar, S. U. Rehman, and M. Tabish, “Interaction of indomethacin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling approach,” *Medchemcomm*, vol. 8, no. 6, pp. 1283–1296, Jun. 2017, doi: 10.1039/C7MD00094D.
- [13] Y. You et al., “Measuring Binding Constants of Cucurbituril-Based Host-Guest Interactions at the Single-Molecule Level with Nanopores,” *ACS Sensors*, vol. 4, no. 3, pp. 774–779, Mar. 2019, doi: 10.1021/ACSSENSORS.9B00408/ASSET/IMAGES/LARGE/SE-2019-00408E_0004.JPEG.
- [14] Y. Zhang, J. Hu, and C. Y. Zhang, “Sensitive detection of transcription factors by isothermal exponential amplification-based colorimetric assay,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 21, pp. 9544–9549, Nov. 2012, doi: 10.1021/AC3024087/SUPPL_FILE/AC3024087_SI_001.PDF.
- [15] G. V. Suárez-Moreno et al., *Second and third-row transition metal compounds containing benzimidazole ligands: An overview of their anticancer and antitumour activity*, vol. 472. 2022.
- [16] Ö. Tarı, F. Gümüş, L. Açık, and B. Aydın, “Synthesis, characterization and DNA binding studies of platinum(II) complexes with benzimidazole derivative ligands,” *Bioorg. Chem.*, vol. 74, pp. 272–283, 2017, doi: 10.1016/j.bioorg.2017.08.015.
- [17] N. T. Abdel-Ghani and A. M. Mansour, “Molecular structures of antitumor active Pd(II) and Pt(II) complexes of N,N-donor benzimidazole methyl ester,” <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2012.661048>, vol. 65, no. 5, pp. 763–779, 2012, doi: 10.1080/00958972.2012.661048.
- [18] E. A. Nyawade, M. O. Onani, S. Meyer, and P. Dube, “Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of new 2-pyrral-L-amino acid Schiff base palladium (II) complexes,” *Chem. Pap.*, vol. 74, no. 11, pp. 3705–3715, Nov. 2020, doi: 10.1007/S11696-019-00986-5/TABLES/5.

- [19] N. Shrivastava, M. J. Naim, M. J. Alam, F. Nawaz, S. Ahmed, and O. Alam, "Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship," *Arch. Pharm. (Weinheim)*, vol. 350, no. 6, pp. 1–80, 2017, doi: 10.1002/ardp.201700040.
- [20] Z. Zhao, N. Xu, Y. Wang, G. Ling, and P. Zhang, "Perylene diimide-based treatment and diagnosis of diseases," *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, pp. 8937–8950, 2021, doi: 10.1039/d1tb01752g.
- [21] Z. Xu et al., "A unique perylene-based DNA intercalator: Localization in cell nuclei and inhibition of cancer cells and tumors," *Small*, vol. 10, no. 20, pp. 4087–4092, Jun. 2014, doi: 10.1002/smll.201401262.
- [22] Z. Xu et al., "Molecular size, shape, and electric charges: Essential for perylene bisimide-based DNA intercalator to localize in cell nuclei and inhibit cancer cell growth," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 18, pp. 9784–9791, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b01665.
- [23] K. R. Wang, H. W. An, R. X. Rong, Z. R. Cao, and X. L. Li, "Synthesis of biocompatible glycodendrimer based on fluorescent perylene bisimides and its bioimaging," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 35, no. 7, pp. 727–734, 2014, doi: 10.1002/marc.201300916.
- [24] M. Yin and S. Zhang, "A Unique perylene-based DNA intercalator: Localization in cell nuclei and inhibition of cancer cells and tumors," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 2, p. 466, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.nano.2015.12.060.
- [25] J. Scott, "Introduction to recombinant DNA," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 9, no. 1 Supplement, pp. 3–16, 1986, doi: 10.1007/BF01800854.
- [26] "Comparison of Nucleic Acid Gel Stains," www.biotium.com (Erişim tarihi: 8 Ocak 2023).
- [27] B. A. Armitage, "Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation," *Top. Curr. Chem.*, vol. 253, pp. 55–76, 2005, doi: 10.1007/b100442.
- [28] S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, and M. Tabish, "Studying non-covalent drug-DNA interactions," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 576, pp. 49–60, 2015, doi: 10.1016/j.abb.2015.03.024.
- [29] C. L. Mazzitelli, J. S. Brodbelt, J. T. Kern, M. Rodriguez, and S. M. Kerwin, "Evaluation of binding of perylene diimide and benzannulated perylene diimide ligands to DNA by electrospray ionization mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass*

- Spectrom., vol. 17, no. 4, pp. 593–604, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.jasms.2005.12.011.
- [30] Y. Ma et al., “Ph-Sensitive perylene tetra-(alkoxycarbonyl) probes for live cell imaging,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 8, pp. 6615–6622, 2016, doi: 10.1039/c6nj00153j.
- [31] M. J. Farooqi, M. A. Penick, J. Burch, G. R. Negrete, and L. Brancalion, “Characterization of novel perylene diimides containing aromatic amino acid side chains,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 153, pp. 124–131, 2016, doi: 10.1016/j.saa.2015.08.013.
- [32] D. Görl, X. Zhang, and F. Würthner, “Molecular assemblies of perylene bisimide dyes in water,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 26, pp. 6328–6348, 2012, doi: 10.1002/anie.201108690.
- [33] Y. Sun, S. Bi, D. Song, C. Qiao, D. Mu, and H. Zhang, “Study on the interaction mechanism between DNA and the main active components in *Scutellaria baicalensis* Georgi,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 129, no. 2, pp. 799–810, 2008, doi: 10.1016/j.snb.2007.09.082.
- [34] D. Inci, R. Aydin, Ö. Vatan, O. Şahin, and N. Çinkiliç, “Water-soluble binary and ternary palladium(ii) complexes containing amino acids and intercalating ligands: Synthesis, characterization, biomolecular interactions and cytotoxicities,” *New J. Chem.*, vol. 43, no. 12, pp. 4681–4697, 2019, doi: 10.1039/c8nj05934a.
- [35] F. Darabi, H. Hadadzadeh, J. Simpson, and A. Shahpiri, “A water-soluble Pd(ii) complex with a terpyridine ligand: Experimental and molecular modeling studies of the interaction with DNA and BSA; And: In vitro cytotoxicity investigations against five human cancer cell lines,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 11, pp. 9081–9097, 2016, doi: 10.1039/c6nj01880g.
- [36] B. Tutkun, “Heterohalkalı Benimidazol Türevlerinin Sentezi ve Metal Kompleksleri”, Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 2013.
- [37] D. Gigante, “Life sciences,” *William Blake Context*, vol. 1, no. August, pp. 270–276, 2019, doi: 10.1017/9781316534946.031.
- [38] “Biomolecules: Types and Functions - Conduct Science.” <https://conductscience.com/biomolecules-types-and-functions/> (Erişim tarihi: 8 Ocak 2023).
- [39] S. Minchin and J. Lodge, “Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids,” *Essays Biochem.*, vol. 63, pp. 433–456, 2019, doi:

10.1042/EBC20180038.

- [40] N. Yoshida, T. Imai, S. Phongphanphane, A. Kovalenko, and F. Hirata, “Molecular recognition in biomolecules studied by statistical-mechanical integral-equation theory of liquids,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 4, pp. 873–886, Jan. 2009, doi: 10.1021/JP807068K/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2008-07068K_0001.JPEG.
- [41] M. Zourob, *Recognition receptors in biosensors*. Springer, 2010.
- [42] N. Chaffey, “Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell*. 4th edn.,” *Ann. Bot.*, vol. 91, no. 3, p. 401, Feb. 2003, doi: 10.1093/AOB/MCG023.
- [43] “Photograph 51, by Rosalind Franklin (1952) | The Embryo Project Encyclopedia.” <https://embryo.asu.edu/pages/photograph-51-rosalind-franklin-1952> (Erişim tarihi: 8 Ocak 2023).
- [44] “The Structure and Function of DNA - *Molecular Biology of the Cell* - NCBI Bookshelf.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/> (Erişim tarihi: 8 Ocak 2023).
- [45] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub, “Mechanical Stability of Single DNA Molecules,” *Biophys. J.*, vol. 78, no. 4, pp. 1997–2007, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76747-6.
- [46] T. V Chalikian, J. Vo“lkervo“lker, G. E. Plum, and K. J. Breslauer, “A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques,” vol. 96, pp. 7853–7858, 1999.
- [47] Z. Cui, J. A. Theruvathu, A. Farrel, A. Burdzy, and L. C. Sowers, “Characterization of synthetic oligonucleotides containing biologically important modified bases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 379, no. 2, pp. 196–207, 2008, doi: 10.1016/j.ab.2008.04.031.
- [48] A. Özgen, “Kovalent Olmayan Komplekslerin Sitokiyometri ve Kararlılıklarının Kütle Spektrometresi ile İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012.
- [49] R. G. Keil, “2.12 Mineral Matrices and Organic Matter Introduction 338 12.12.2 Evidence for Organic Matter Association with Minerals 340 12.12.2.1 Correlations with Grain Size and Mineral-Specific Surface Area 340 12.12.2.2 Why Do Organic Matter and Minerals Stick Together? 340 12.12.2.2.1 Sorption 341 12.12.2.2.2 Occlusion by biomineralization 343 12.12.2.2.3 Secondary architectures: aggregation 343 12.12.2.2.4,” *Org. Geochem.*, vol. 12, pp. 337–359, 2014, doi:

10.1016/B978-0-08-095975-7.01024-X.

- [50] A. Carrier, P. Le Ber, and C. Auclair, "Spin-labeled oxazolopyridocarbazole as a probe for studying nonintercalating DNA groove binding ligands," *Biochemistry*, vol. 29, no. 25, pp. 6002–6009, Jun. 1990, doi: 10.1021/BI00477A018.
- [51] Antonino Lauria, Paola Barraja, Gaetano Dattolo, and Anna Maria Almerico, "DNA Minor Groove Binders: an Overview on Molecular Modeling and QSAR Approaches," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 20, pp. 2136–2160, 2007, doi: 10.2174/092986707781389673.
- [52] R. Wing et al., "Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA," *Nature*, vol. 287, no. 5784, pp. 755–758, 1980, doi: 10.1038/287755a0.
- [53] C. Pabo and R. T. Sauer, "PROTEIN-DNA RECOGNITION," 1984.
- [54] B. H. Geierstanger and D. E. Wemmer, "Complexes of the minor groove of DNA," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 24, pp. 463–493, 1995, doi: 10.1146/annurev.bb.24.060195.002335.
- [55] G. Bischoff, S. Hoffmann, and R. Zhdanov, "DNA-binding of Drugs Used in Medicinal Therapies," *Front. Med. Chem. - Online*, vol. 1, no. 1, pp. 619–645, 2005, doi: 10.2174/1567204043396361.
- [56] A. Erxleben, "Investigation of non-covalent interactions of metal complexes with DNA in cell-free systems," *Chimia (Aarau).*, vol. 71, no. 3, pp. 102–111, 2017, doi: 10.2533/chimia.2017.102.
- [57] A. M. Pyle, J. P. Rehmann, R. Meshoyrer, N. J. Turro, J. K. Barton, and C. V. Kumar, "Mixed-Ligand complexes of ruthenium(II): Factors governing binding to DNA," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, no. 8, pp. 3051–3058, 1989, doi: 10.1021/JA00190A046/ASSET/JA00190A046.FP.PNG_V03.
- [58] A. A. Phadte, S. Banerjee, N. A. Mate, and A. Banerjee, "Spectroscopic and viscometric determination of DNA-binding modes of some bioactive dibenzodioxins and phenazines," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 18, no. December 2018, p. 100629, 2019, doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100629.
- [59] A. Oleksi et al., "Molecular Recognition of a Three-Way DNA Junction by a Metallosupramolecular Helicate** Although much current drug research focuses on agents that inhibit the action of proteins, nucleic acids are attractive therapeutic targets because of their potential for controlling from the authors," *Angew. Chem. Int. Ed*, vol. 45, pp. 1227–1231, 2006, doi: 10.1002/anie.200503822.
- [60] A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, and M. C. Williams, "Survey and

Summary Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 9, pp. 3971–3988, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw237.

- [61] N. T. Abdel Ghani and A. M. Mansour, “Palladium(II) and platinum(II) complexes containing benzimidazole ligands: Molecular structures, vibrational frequencies and cytotoxicity,” *J. Mol. Struct.*, vol. 991, no. 1–3, pp. 108–126, 2011, doi: 10.1016/j.molstruc.2011.02.014.
- [62] U. Doğan et al., “Novel Benzimidazole- Platinum(II) Complexes: Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Anticancer Activity,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1229, 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2020.129785.
- [63] N. T. Abdel Ghani and A. M. Mansour, “Novel Pd(II) and Pt(II) complexes of N,N-donor benzimidazole ligand: Synthesis, spectral, electrochemical, DFT studies and evaluation of biological activity,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 373, no. 1, pp. 249–258, 2011, doi: 10.1016/j.ica.2011.04.036.
- [64] L. Messori et al., “Reactivity and biological properties of a series of cytotoxic Pt(II) (amine) 2 complexes, either cis or trans configured,” *Inorg. Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 1717–1726, 2012, doi: 10.1021/ic202036c.
- [65] A. Kellett, Z. Molphy, C. Slator, V. McKee, and N. P. Farrell, “Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 4, pp. 971–988, Feb. 2019, doi: 10.1039/c8cs00157j.
- [66] C. Mügge et al., “Elucidating the reactivity of Pt(II) complexes with (O,S) bidentate ligands towards DNA model systems,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 160, pp. 198–209, 2016, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.02.013.
- [67] L. Messori et al., “Interactions between anticancer trans -platinum compounds and proteins: Crystal structures and esi-ms spectra of two protein adducts of trans - (dimethylamino)(methylamino)dichloridoplatinum(II),” *Inorg. Chem.*, vol. 53, no. 15, pp. 7806–7808, Aug. 2014, doi: 10.1021/ic5012583.
- [68] A. Çal, “Yeni Nesil Platin Komplekslerinin Kütle Spektrometrik Yöntemlerle İncelenmesi ve Antikanser Aktivitelerinin İn Vitro Olarak Araştırılması”, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
- [69] V. H. Cohn et al., “Biochemistry 1985, 24, 707-713 707 in Fundamentals of Drug Metabolism Adducts of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification, and Quantitation1,” *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C*, vol. 27, no. 2, p. 58, 1984.
- [70] S. Utku, F. Gumus, S. Tezcan, M. S. Serin, and A. Ozkul, “Synthesis,

- characterization, cytotoxicity, and DNA binding of some new platinum(II) and platinum(IV) complexes with benzimidazole ligands,” *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 25, no. 4, pp. 502–508, 2010, doi: 10.3109/14756360903282858.
- [71] A. D. Richards and A. Rodger, “Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 3, pp. 471–483, 2007, doi: 10.1039/b609495c.
- [72] P. M. Takahara, C. A. Frederick, and S. J. Lippard, “Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 49, pp. 12309–12321, 1996, doi: 10.1021/JA9625079/SUPPL_FILE/JA12309.PDF.
- [73] A. P. Silverman, W. Bu, S. M. Cohen, and S. J. Lippard, “2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(amine)(cyclohexylamine)]²⁺ bound to a dodecamer DNA duplex,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 49743–49749, Dec. 2002, doi: 10.1074/JBC.M206979200.
- [74] A. Hussain, M. F. AlAjmi, T. R. Md, A. A. Khan, P. A. Shaikh, and R. A. Khan, “Evaluation of Transition Metal Complexes of Benzimidazole-Derived Scaffold as Promising Anticancer Chemotherapeutics,” *Mol.* 2018, Vol. 23, Page 1232, vol. 23, no. 5, p. 1232, May 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23051232.
- [75] N. T. A. Ghani and A. M. Mansour, “2-[(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-amino]-benzoic acid methyl ester: Crystal structure, DFT calculations and biological activity evaluation,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 81, no. 1, pp. 754–763, 2011, doi: 10.1016/j.saa.2011.07.021.
- [76] M. Barwiolek et al., “The synthesis, characterization and fluorescence properties of new benzimidazole derivatives,” *J. Lumin.*, vol. 211, no. September 2018, pp. 88–95, 2019, doi: 10.1016/j.jlumin.2019.03.026.
- [77] Salahuddin, M. Shaharyar, and A. Mazumder, “Benzimidazoles: A biologically active compounds,” *Arab. J. Chem.*, vol. 10, pp. S157–S173, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.ARABJC.2012.07.017.
- [78] E. Horak, P. Kassal, and I. Murković Steinberg, “Benzimidazole as a structural unit in fluorescent chemical sensors: the hidden properties of a multifunctional heterocyclic scaffold,” <https://doi.org/10.1080/10610278.2017.1403607>, vol. 30, no. 10, pp. 838–857, Oct. 2017, doi: 10.1080/10610278.2017.1403607.
- [79] Ş. N. Karuk Elmas, “Biyotiyollerin Tayini İçin Perilen Diimid Temelli Floresans Problemlerin Geliştirilmesi ve Uygulamaları”, Doktora Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman, 2019.

- [80] E. Kozma and M. Catellani, "Perylene diimides based materials for organic solar cells," *Dye. Pigment.*, vol. 98, no. 1, pp. 160–179, 2013, doi: 10.1016/j.dyepig.2013.01.020.
- [81] S. Udenfriend and P. Zaltzman, "Fluorescence characteristics of purines, pyrimidines, and their derivatives: Measurement of guanine in nucleic acid hydrolyzates," *Anal. Biochem.*, vol. 3, no. 1, pp. 49–59, 1962, doi: 10.1016/0003-2697(62)90043-X.
- [82] D. Pastré, O. Piétrement, A. Zozime, and E. Le Cam, "Study of the DNA/ethidium bromide interactions on mica surface by atomic force microscope: Influence of the surface friction," *Biopolymers*, vol. 77, no. 1, pp. 53–62, 2005, doi: 10.1002/bip.20185.
- [83] S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J. F. Neault, and H. A. Tajmir-Riahi, "Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue," *J. Mol. Struct.*, vol. 827, no. 1–3, pp. 35–43, 2007, doi: 10.1016/j.molstruc.2006.05.004.
- [84] V. L. Singer And R. P. Haugland, "Fluorescent Imaging of Nucleic Acids and Proteins in Gels," *Fluoresc. Lumin. Probes Biol. Act.*, pp. 51–62, Jan. 1999, doi: 10.1016/B978-012447836-7/50006-3.
- [85] H. J. Karlsson, M. Eriksson, E. Perzon, B. Åkerman, P. Lincoln, and G. Westman, "Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 21, p. 6227, Nov. 2003, doi: 10.1093/NAR/GKG821.
- [86] J. B. Lepecq and C. Paoletti, "A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical—Chemical characterization," *J. Mol. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 87–106, Jul. 1967, doi: 10.1016/0022-2836(67)90353-1.
- [87] C. G. Reinhardt and T. R. Krugh, "A Comparative Study of Ethidium Bromide Complexes with Dinucleotides and DNA: Direct Evidence for Intercalation and Nucleic Acid Sequence Preferences* 1" Ethidium aggregation can be adequately represented by dimer formation with a dimerization constant K_d ," *UTC*, 2022.
- [88] J. Sigmon and L. L. Larcom, "The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 17, no. 10, pp. 1524–1527, 1996, doi: 10.1002/elps.1150171003.
- [89] S. E. Miller, P. Taillon-Miller, and P. Y. Kwok, "Cost-effective staining of DNA with SYBR green in preparative agarose gel electrophoresis," *Biotechniques*, vol. 27, no. 1, pp. 34–36, 1999, doi: 10.2144/99271BM05.

- [90] Q. Huang and W. L. Fu, "Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 43, no. 8, pp. 841–842, 2005, doi: 10.1515/CCLM.2005.141.
- [91] M. C. M. Couto, A. P. Sudre, M. F. Lima, and T. C. B. Bomfim, "Comparison of techniques for DNA extraction and agarose gel staining of DNA fragments using samples of *Cryptosporidium*," *Vet. Med. (Praha)*, vol. 58, no. 10, pp. 535–542, 2013, doi: 10.17221/7085-VETMED.
- [92] A. M. Jeffrey, "DNA modification by chemical carcinogens," *Pharmacol. Ther.*, vol. 28, no. 2, pp. 237–272, 1985, doi: 10.1016/0163-7258(85)90013-0.
- [93] D. McGregor, "The genetic toxicology of toluene," *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, vol. 317, no. 3, pp. 213–228, 1994, doi: 10.1016/0165-1110(94)90003-5.
- [94] T. D. Stephens, C. J. W. Bunde, and B. J. Fillmore, "Mechanism of action in thalidomide teratogenesis," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, no. 12, pp. 1489–1499, 2000, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00388-3.
- [95] J. Liu et al., "DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 91, no. 1, pp. 269–276, 2002, doi: 10.1016/S0162-0134(02)00441-5.
- [96] S. He et al., "A craphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 3, pp. 453–459, 2010, doi: 10.1002/adfm.200901639.
- [97] X. Zhao, R. Tapeç-Dytioco, and W. Tan, "Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 38, pp. 11474–11475, 2003, doi: 10.1021/ja0358854.
- [98] X. Cao and P. A. Limbach, "Mass spectrometry: Nucleic acids and nucleotides studied using MS," *Encycl. Spectrosc. Spectrom.*, vol. 2, pp. 764–771, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11691-9.
- [99] V. Casagrande, "Stabilization of G-quadruplex structures by specific ligands: towards anti-HIV aptamers and new anticancer drugs.", *Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche, Università Degli Studi Di Roma La Sapienza, Facoltà Di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Roma*, 2009.
- [100] V. Gabelica, E. De Pauw, and F. Rosu, "Interaction between antitumor drugs and a double-stranded oligonucleotide studied by electrospray ionization mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 34, no. 12, pp. 1328–1337, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199912)34:12<1328::AID-JMS889>3.0.CO;2-F.

- [101] S. Kerwin, "G-Quadruplex DNA as a Target for Drug Design," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 6, no. 4, pp. 441–471, 2005, doi: 10.2174/1381612003400849.
- [102] L. H. Hurley et al., "G-quadruplexes as targets for drug design," *Pharmacol. Ther.*, vol. 85, no. 3, pp. 141–158, 2000, doi: 10.1016/S0163-7258(99)00068-6.
- [103] M. Atakay, "Model Sentetik Polimerlerin ve Komplekslerin Gaz Fazı Karakteristiklerinin İncelenmesi" Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016.
- [104] M. Ganeshpandian, S. Ramakrishnan, M. Palaniandavar, E. Suresh, A. Riyasdeen, and M. A. Akbarsha, "Mixed ligand copper(II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 140, pp. 202–212, 2014, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.07.021.
- [105] G. Zhang, P. Fu, L. Wang, and M. Hu, "Molecular spectroscopic studies of farrerol interaction with calf thymus DNA," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 16, pp. 8944–8952, 2011, doi: 10.1021/jf2019006.
- [106] M. Khorasani-Motlagh, M. Noroozifar, and S. Mirkazehi-Rigi, "Fluorescence and DNA-binding spectral studies of neodymium(III) complex containing 2,2'-bipyridine, [Nd(bpy)₂Cl₃·OH₂]," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 75, no. 2, pp. 598–603, 2010, doi: 10.1016/j.saa.2009.11.024.
- [107] N. Shahabadi and S. Hadidi, "Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 96, pp. 278–283, 2012, doi: 10.1016/j.saa.2012.05.045.
- [108] K. Bhadra and G. S. Kumar, "Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: A comparative spectroscopic and calorimetric study," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1810, no. 4, pp. 485–496, 2011, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.01.011.
- [109] C. Wei, J. Wang, and M. Zhang, "Spectroscopic study on the binding of porphyrins to (G₄T₄G₄)₄ parallel G-quadruplex," *Biophys. Chem.*, vol. 148, no. 1–3, pp. 51–55, 2010, doi: 10.1016/j.bpc.2010.02.009.
- [110] F. Schmid, "Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry," *eLS*, pp. 1–4, 2001, doi: 10.1038/npg.els.0003142.
- [111] N. Shahabadi and M. Maghsudi, "Multi-spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of antihypertensive drug; Methyldopa with calf thymus DNA," *Mol. Biosyst.*, vol. 10, no. 2, pp. 338–347, 2014, doi: 10.1039/c3mb70340a.

- [112] X. Ling, W. Zhong, Q. Huang, and K. Ni, "Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 93, no. 3, pp. 172–176, 2008, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.07.008.
- [113] F. Cui, Q. Liu, H. Luo, and G. Zhang, "Spectroscopic, viscositic and molecular modeling studies on the interaction of 3'-Azido-daunorubicin thiosemicarbazone with DNA," *J. Fluoresc.*, vol. 24, no. 1, pp. 189–195, 2014, doi: 10.1007/s10895-013-1285-8.
- [114] J. Ren and J. B. Chaires, "Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands," *Biochemistry*, vol. 38, no. 49, pp. 16067–16075, 1999, doi: 10.1021/bi992070s.
- [115] C. V. Kumar, R. S. Turner, and E. H. Asuncion, "Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 74, no. 2–3, pp. 231–238, 1993, doi: 10.1016/1010-6030(93)80121-O.
- [116] A. Chakrabarty, A. Mallick, B. Haldar, P. Das, and N. Chattopadhyay, "Binding interaction of a biological photosensitizer with serum albumins: A biophysical study," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 3, pp. 920–927, 2007, doi: 10.1021/bm061084s.
- [117] A. Mallick, B. Haldar, and N. Chattopadhyay, "Spectroscopic investigation on the interaction of ICT probe 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H indolo-[2,3-a] quinolizine with serum albumins," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 30, pp. 14683–14690, 2005, doi: 10.1021/jp051367z.
- [118] F. Y. Wu, F. Y. Xie, Y. M. Wu, and J. I. Hong, "Interaction of a new fluorescent probe with DNA and its use in determination of DNA," *J. Fluoresc.*, vol. 18, no. 1, pp. 175–181, 2008, doi: 10.1007/s10895-007-0261-6.
- [119] C. Icel and V. T. Yilmaz, "In vitro DNA binding studies of the sweetening agent saccharin and its copper(II) and zinc(II) complexes," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 130, pp. 115–121, 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.11.001.
- [120] C. Ozluer and H. E. S. Kara, "In vitro DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 138, pp. 36–42, 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.015.
- [121] X. L. Li, Y. J. Hu, H. Wang, B. Q. Yu, and H. L. Yue, "Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 3, pp. 873–880, 2012, doi: 10.1021/bm2017959.
- [122] R. Kakkar, R. Garg, and Suruchi, "Theoretical study of tautomeric structures and

- fluorescence spectra of Hoechst 33258,” *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 579, no. 1–3, pp. 109–113, 2002, doi: 10.1016/S0166-1280(01)00721-7.
- [123] H. Wu, F. Jia, F. Kou, B. Liu, J. Yuan, and Y. Bai, “A Schiff base ligand N-(2-hydroxylacetophenone)-3-oxapentane-1, 5-diamine and its nickel(II) complex: Synthesis, crystal structure, antioxidation, and DNA-binding properties,” *Transit. Met. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 847–853, 2011, doi: 10.1007/s11243-011-9539-2.
- [124] W. T. Cong et al., “A visible dye-based staining method for DNA in polyacrylamide gels by ethyl violet,” *Anal. Biochem.*, vol. 402, no. 1, pp. 99–101, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.AB.2010.03.017.
- [125] N. Büyükköy, “Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi İle İnsan İnsülini Ve Analoglarının Analizi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- [126] H. Awad, M. M. Khamis, and A. El-Aneed, “Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization,” <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>, vol. 50, no. 2, pp. 158–175, Feb. 2014, doi: 10.1080/05704928.2014.954046.
- [127] D. H. Chace, J. C. DiPerna, and E. W. Naylor, “Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: A model for clinical mass spectrometry in the next millennium,” *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr. Suppl.*, vol. 88, no. 432, pp. 45–47, 1999, doi: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb01156.x.
- [128] P. T. Clayton, “Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 24, no. 2, pp. 139–150, 2001, doi: 10.1023/A:1010358715835.
- [129] E. De Hoffmann and V. Stroobant, “Mass spectrometry: principles and applications,” *Choice Rev. Online*, vol. 45, no. 08, pp. 45-4389-45-4389, 2008, doi: 10.5860/choice.45-4389.
- [130] E. Birol, “MALDI-Kütle Spektrometresi’nde İyon Oluşma Mekanizmalarına Etki Eden Bazı Faktörlerin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2021.
- [131] M. Petković and T. Kamčeva, “FAB, ESI and MALDI mass spectrometric methods in the study of metallo-drugs and their biomolecular interactions,” *Metallomics*, vol. 3, no. 6, pp. 550–565, 2011, doi: 10.1039/c0mt00096e.
- [132] D. C. Schriemer and L. Li, “Detection of High Molecular Weight Narrow Pelydisperse Polymers up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 17, pp. 2721–2725, 1996, doi: 10.1021/ac960442m.

- [133] D. C. Muddiman, R. Bakhtiar, S. A. Hofstadler, and R. D. Smith, “Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Instrumentation and applications,” *J. Chem. Educ.*, vol. 74, no. 11, pp. 1288–1292, 1997, doi: 10.1021/ed074p1288.
- [134] R. E. March, “Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer,” *Encycl. Anal. Chem.*, pp. 1–25, 2006, doi: 10.1002/9780470027318.a6015.
- [135] “Mass Spectrometry Facility | Quadrupole.” <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml> (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).
- [136] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, and B. A. Thomson, “An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 36, no. 8, pp. 849–865, 2001, doi: 10.1002/jms.207.
- [137] D. E. Clemmer and M. F. Jarrold, “Ion Mobility Measurements and their Applications to Clusters and Biomolecules,” *J. MASS Spectrom.*, vol. 32, pp. 577–592, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199706)32:6.
- [138] M. E. Ridgeway, M. Lubeck, J. Jordens, M. Mann, and M. A. Park, “Trapped ion mobility spectrometry: A short review,” *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 425. Elsevier B.V., pp. 22–35, Feb. 01, 2018, doi: 10.1016/j.ijms.2018.01.006.
- [139] İ. Avcı, “Protein Esaslı Biyoterapötik İlaçların İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi ile Karakterizasyonları,” Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2022.
- [140] D. R. Hernandez, J. D. DeBord, M. E. Ridgeway, D. A. Kaplan, M. A. Park, and F. Fernandez-Lima, “Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer,” *Analyst*, vol. 139, no. 8, pp. 1913–1921, 2014, doi: 10.1039/c3an02174b.
- [141] C. J. Gray et al., “Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1860, no. 8, pp. 1688–1709, 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.02.003.
- [142] T. Wyttenbach, P. R. Kemper, G. Baykut, M. A. Park, and M. T. Bowers, “A new instrument with high mass and high ion mobility resolution,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 434, pp. 108–115, 2018, doi: 10.1016/j.ijms.2018.09.008.
- [143] Massachusetts Institute of Technology Department of Chemistry 5.35 Introduction to Experimental Chemistry “Module 1: Fundamentals of Spectroscopy.”, https://ocw.mit.edu/courses/5-35-introduction-to-experimental-chemistry-fall-2012/3f54ecef6f159a0a11dd60251491e075_MIT5_35F12_Mod1_Background.pdf (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).

- [144] “Morötesi-Görünür Işık Spektrofotometresi (UV-Vis) - Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi | Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.” <https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/76/morotesi-gorunur-isik-spektrofotometresi-uv-vis-nir> (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).
- [145] “Analytical chemistry - UV visible spectroscopy.” <http://www.dynamicscience.com.au/tester/solutions1/chemistry/analytical-chem/uvspec.htm> (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).
- [146] R. J. Fritsch and I. Krause, “ELECTROPHORESIS,” *Encycl. Food Sci. Nutr.*, pp. 2055–2062, Jan. 2003, doi: 10.1016/B0-12-227055-X/01409-7.
- [147] D. S. Kryndushkin, I. M. Alexandrov, M. D. Ter-Avanesyan, and V. V. Kushnirov, “Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 49, pp. 49636–49643, 2003, doi: 10.1074/jbc.M307996200.
- [148] C. M. Roth, “Electrophoresis - Nucleic Acids,” *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.*, pp. 456–460, 2004, doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00130-8.
- [149] “Acrylamide Gel Electrophoresis | Thermo Fisher Scientific - TR.” <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis/acrylamide-gel-electrophoresis.html> (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).
- [150] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C. Y. Hsu, and Y. H. Kim, “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments,” *J. Vis. Exp.*, no. 62, p. 3923, Apr. 2012, doi: 10.3791/3923.
- [151] N. C. Stellwagen and E. Stellwagen, “Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no. 10, pp. 1917–1929, Mar. 06, 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.11.090.
- [152] L. Piculell and S. Nilsson, “Anion-specific salt effects in aqueous agarose systems. 1. Effects on the coil-helix transition and gelation of agarose,” *J. Phys. Chem.*, vol. 93, no. 14, pp. 5596–5601, 1989, doi: 10.1021/J100351A053/ASSET/J100351A053.FP.PNG_V03.
- [153] N. C. Stellwagen, “Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. SUPPL. 1, Jun. 2009, doi: 10.1002/elps.200900052.
- [154] C. Biertümpfel, J. Basquin, D. Suck, and C. Sauter, “Crystallization of biological macromolecules using agarose gel,” 2002.

- [155] R. Zenobi and R. Knochenmuss, "Ion formation in maldi mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 17, no. 5, pp. 337–366, 1998, doi: 10.1002/(sici)1098-2787(1998)17:5<337::aid-mas2>3.0.co;2-s.
- [156] K. J. Wu, A. Steding, and C. H. Becker, "Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 7, no. 2, pp. 142–146, 1993, doi: 10.1002/RCM.1290070206.
- [157] I. G. Gut, "DNA Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry," *Human Mutation*, vol. 23, no. 5, pp. 437–441, 2004, doi: 10.1002/humu.20023.
- [158] U. Pieses, W. Zürcher, M. Schär, and H. Moser, "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 14, p. 3191, Jul. 1993, doi: 10.1093/NAR/21.14.3191.
- [159] Ö. Ülkü, "Peptit ve Protein-Peg Konjugatlarının Sentezi ve Kütle Spektrometrik Analizi", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- [160] J. L. Beck, M. L. Colgrave, S. F. Ralph, and M. M. Shei, "Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 61–87, 2001, doi: 10.1002/mas.1003.
- [161] S. W. Morrical, "DNA-Pairing and Annealing Processes in Homologous Recombination and Homology-Directed Repair," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 2, 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A016444.
- [162] "Annealing Oligonucleotides Protocol." <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/protocol/genomics/pcr/annealing-oligos> (Erişim tarihi: 9 Ocak 2023).
- [163] B. Wang and C. Yu, "Fluorescence turn-on detection of a protein through the reduced aggregation of a perylene probe," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 8, pp. 1485–1488, 2010, doi: 10.1002/anie.200905237.
- [164] A. Kellett, Z. Molphy, C. Slator, V. McKee, and N. P. Farrell, "Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 4, pp. 971–988, 2019, doi: 10.1039/c8cs00157j.
- [165] N. P. E. Barry and P. J. Sadler, "Exploration of the medical periodic table: towards new targets," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 45, pp. 5106–5131, May 2013, doi: 10.1039/C3CC41143E.

- [166] E. Ulukaya, F. Ari, K. Dimas, E. I. Ikitimur, E. Guney, and V. T. Yilmaz, "Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 10, pp. 4957–4963, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.055.
- [167] J. K. Barton, "Metal–nucleic acid interactions," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 19, no. S2, pp. 815–832, 2014, doi: 10.1007/s00775-014-1163-0.
- [168] D. G. Sar, M. Montes-Bayón, E. B. González, and A. Sanz-Medel, "Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 21, no. 9, pp. 861–868, Aug. 2006, doi: 10.1039/B603434A.
- [169] L. Kelland, "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 8, pp. 573–584, Aug. 2007, doi: 10.1038/NRC2167.
- [170] J. Reedijk, "Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2009, no. 10, pp. 1303–1312, Apr. 2009, doi: 10.1002/EJIC.200900054.
- [171] K. M. Keller and J. S. Brodbelt, "Charge state-dependent fragmentation of oligonucleotide/metal complexes," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 1, pp. 28–37, Jan. 2005, doi: 10.1016/J.JASMS.2004.09.016.
- [172] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands," *Biomolecular Engineering*, vol. 24, no. 4, pp. 381–403, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
- [173] E. Luzzi, M. Minunni, S. Tombelli, and M. Mascini, "New trends in affinity sensing: Aptamers for ligand binding," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 22, no. 11, pp. 810–818, 2003, doi: 10.1016/S0165-9936(03)01208-1.
- [174] D. H. J. Bunka and P. G. Stockley, "Aptamers come of age - At last," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, no. 8, pp. 588–596, Aug. 2006, doi: 10.1038/nrmicro1458.
- [175] Ö. Birel, "A Review on Perylene-3,4,9,10-Tetracarboxylic Acid Diimide Molecules," *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilim. Derg.*, vol. 13, no. 2, pp. 379–386, 2017, doi: 10.18466/cbayarfe.319879.
- [176] L. Xie, J. Cui, X. Qian, Y. Xu, J. Liu, and R. Xu, "5-Non-amino aromatic substituted naphthalimides as potential antitumor agents: Synthesis via Suzuki reaction, antiproliferative activity, and DNA-binding behavior," *Bioorganic Med.*

Chem., vol. 19, no. 2, pp. 961–967, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.bmc.2010.11.055.

[177] J. Plsikova et al., “3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 57, pp. 283–295, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.09.020.

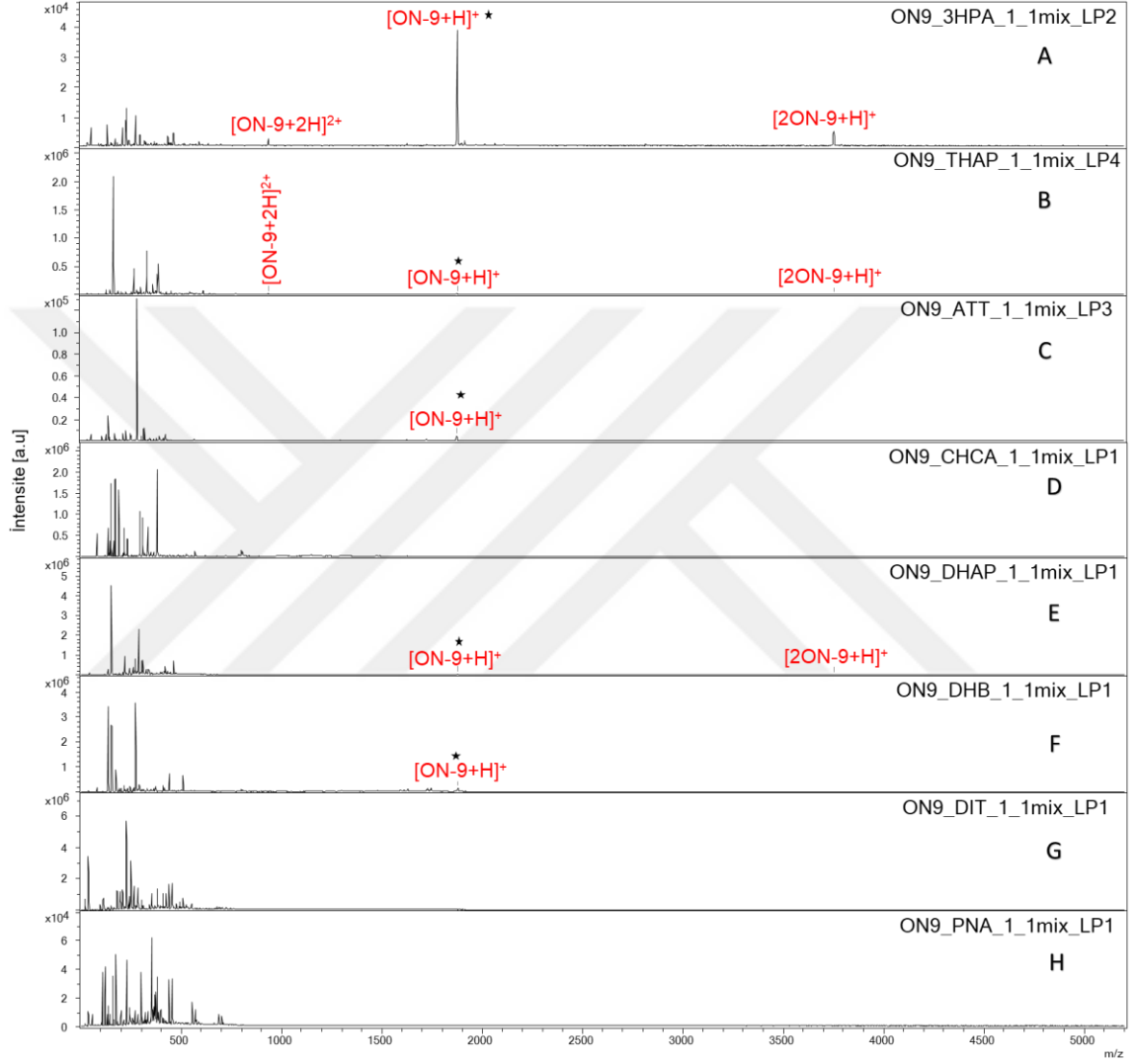
[178] R. Mital and T. S. Srivastava, “Binding Studies of Some Mixed-Ligand Platinum (II) Complexes of 1 , 10- Phenanthroline and Amino Acids,” vol. 120, 1990.



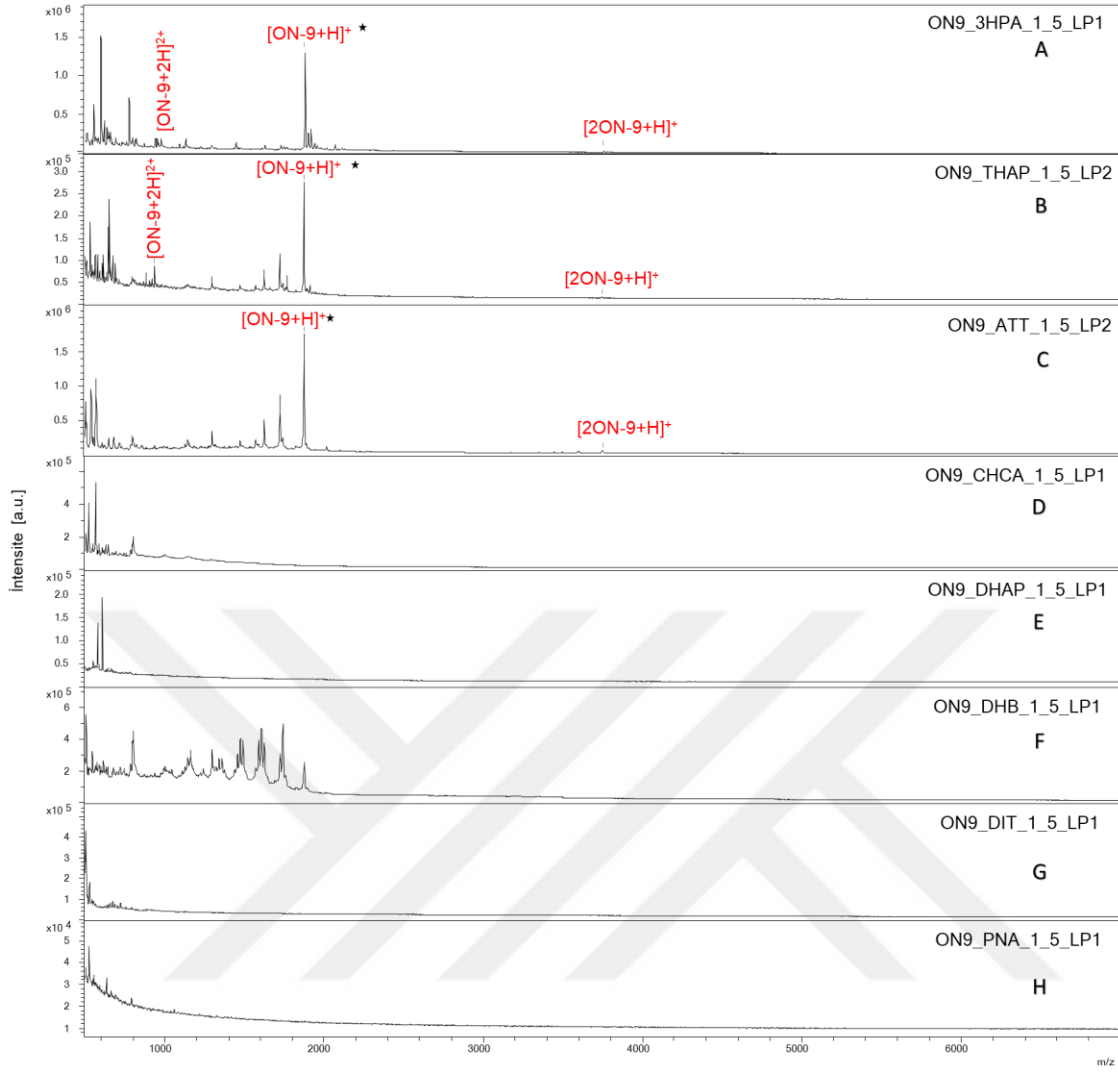
EKLER

EK 1. Spektrumlar

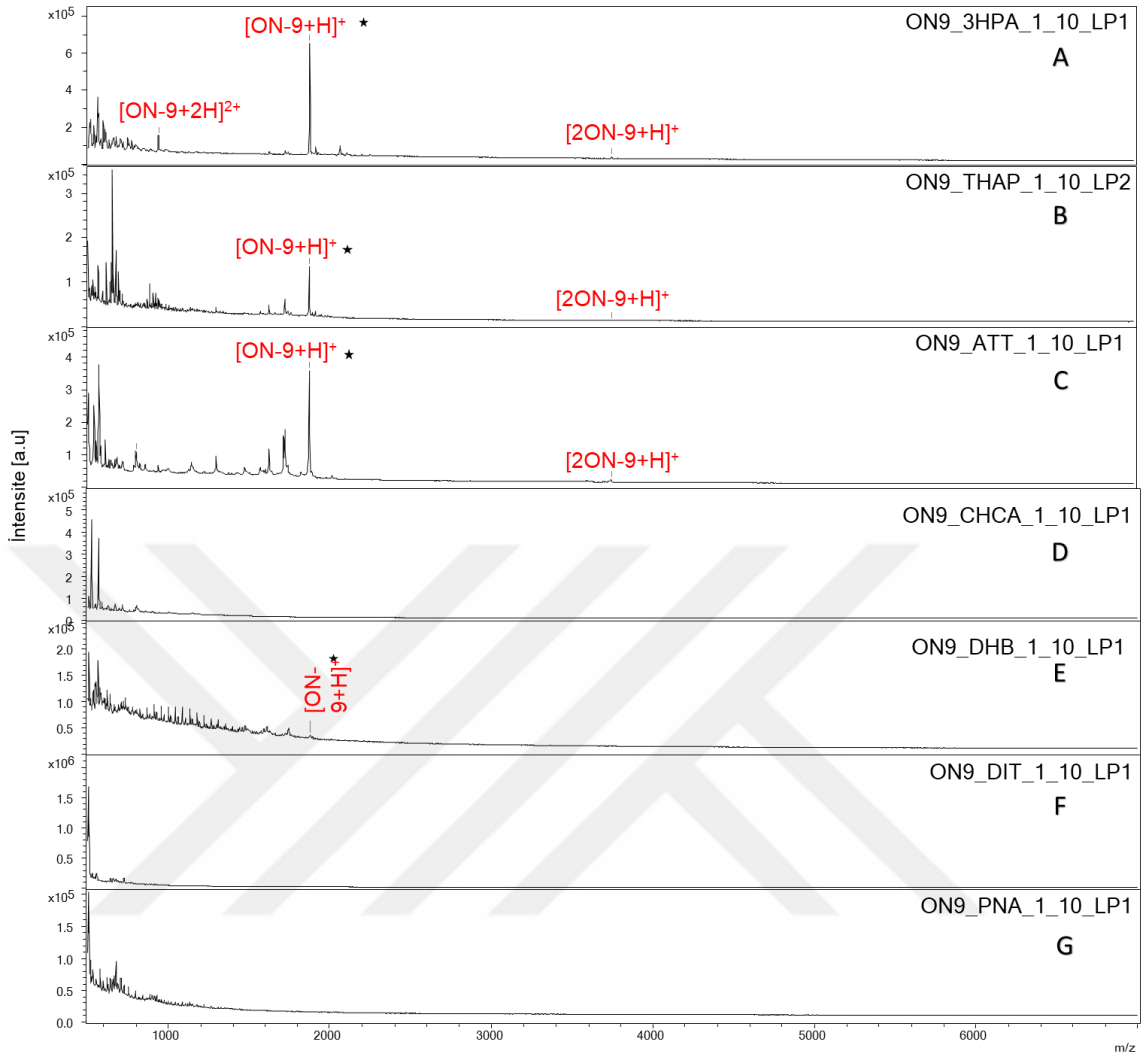
EK 1.1 Oligonükleotit analizlerinde matriks etkisinin incelenmesi



EK 1.1 -Şekil 1. ON-9 kodlu oligonükleotit ile A)3-HPA, B)THAP, C)ATT, D)CHCA, E)DHAP, F)DHB, G)DIT ve H)PNA matrikslerinin hacimce 1:1 (karışım) oranında hazırlanan lineer mod kütle spektrumları.

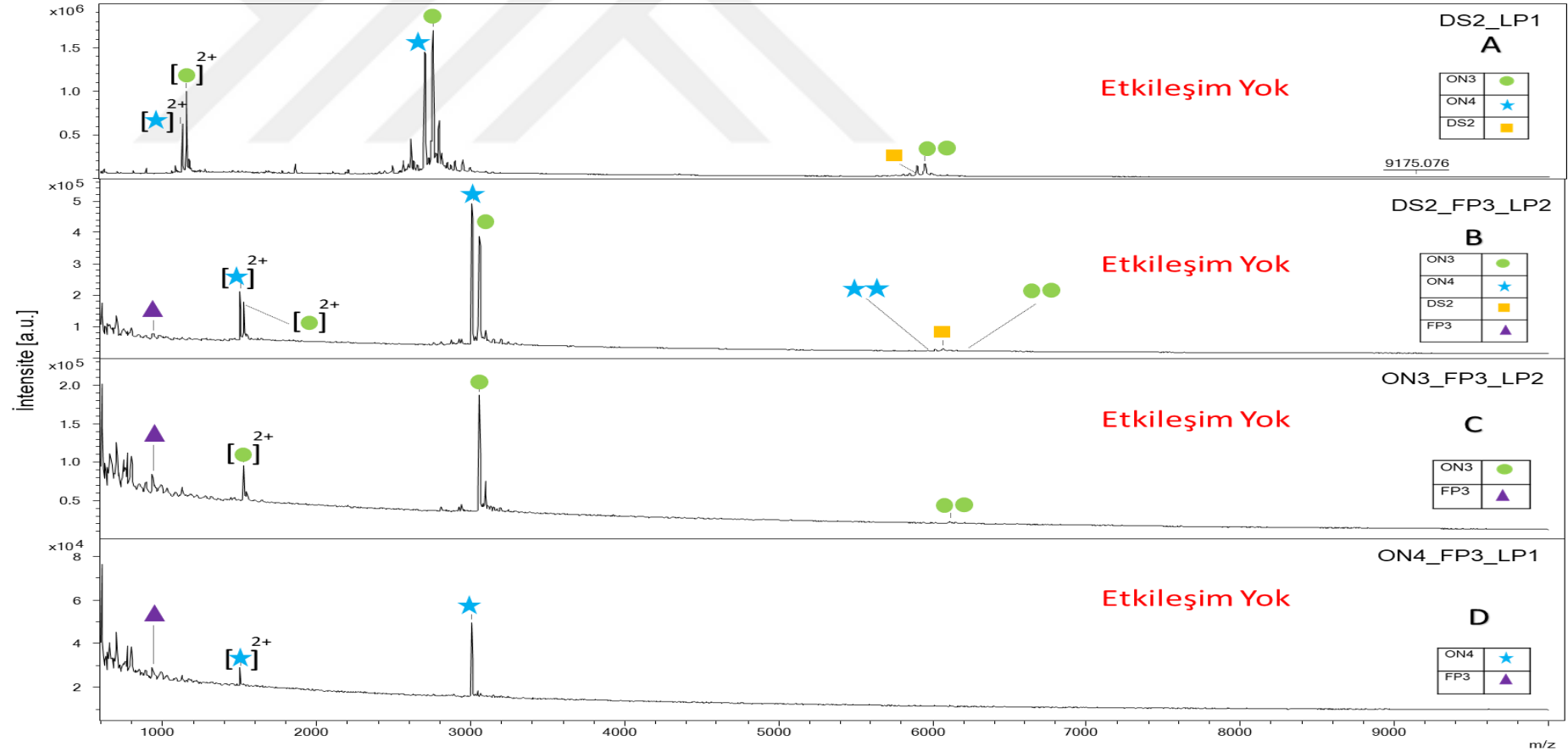


EK 1.1 -Şekil 2. ON-9 kodlu oligonükleotit ile A)3-HPA, B)THAP, C)ATT, D)CHCA, E)DHAP, F)DHB, G)DIT ve H)PNA matrislerinin hacimce 1:5 (karışım) oranında hazırlanan lineer mod kütle spektrumları.

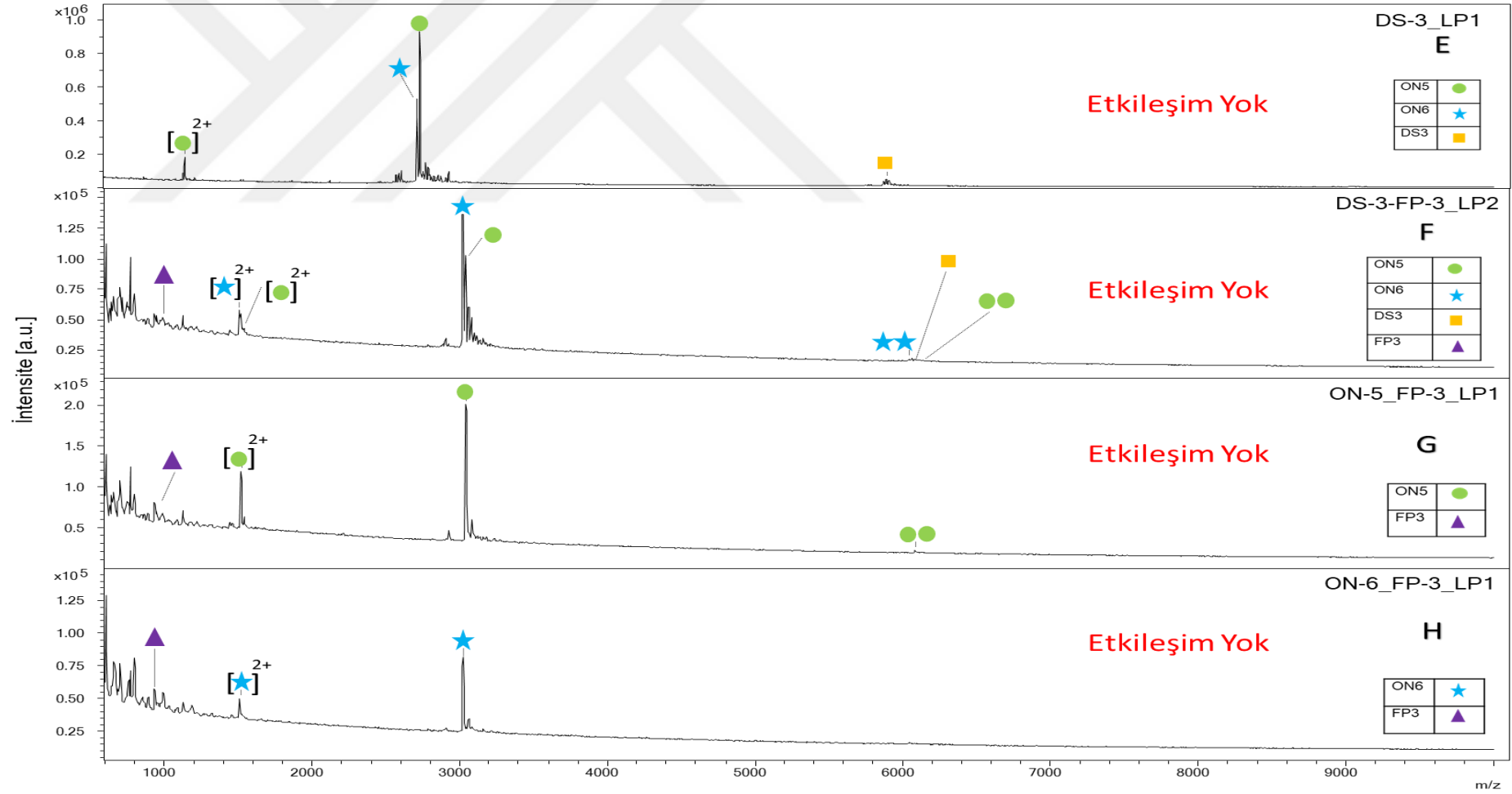


EK 1.1 -Şekil 3. ON-9 kodlu oligonükleotit ile A)3-HPA, B)THAP, C)ATT, D)CHCA, E)DHB, F)DIT ve G)PNA matrislerinin hacimce 1:10 (karışım) oranında hazırlanan lineer mod kütle spektrumları.

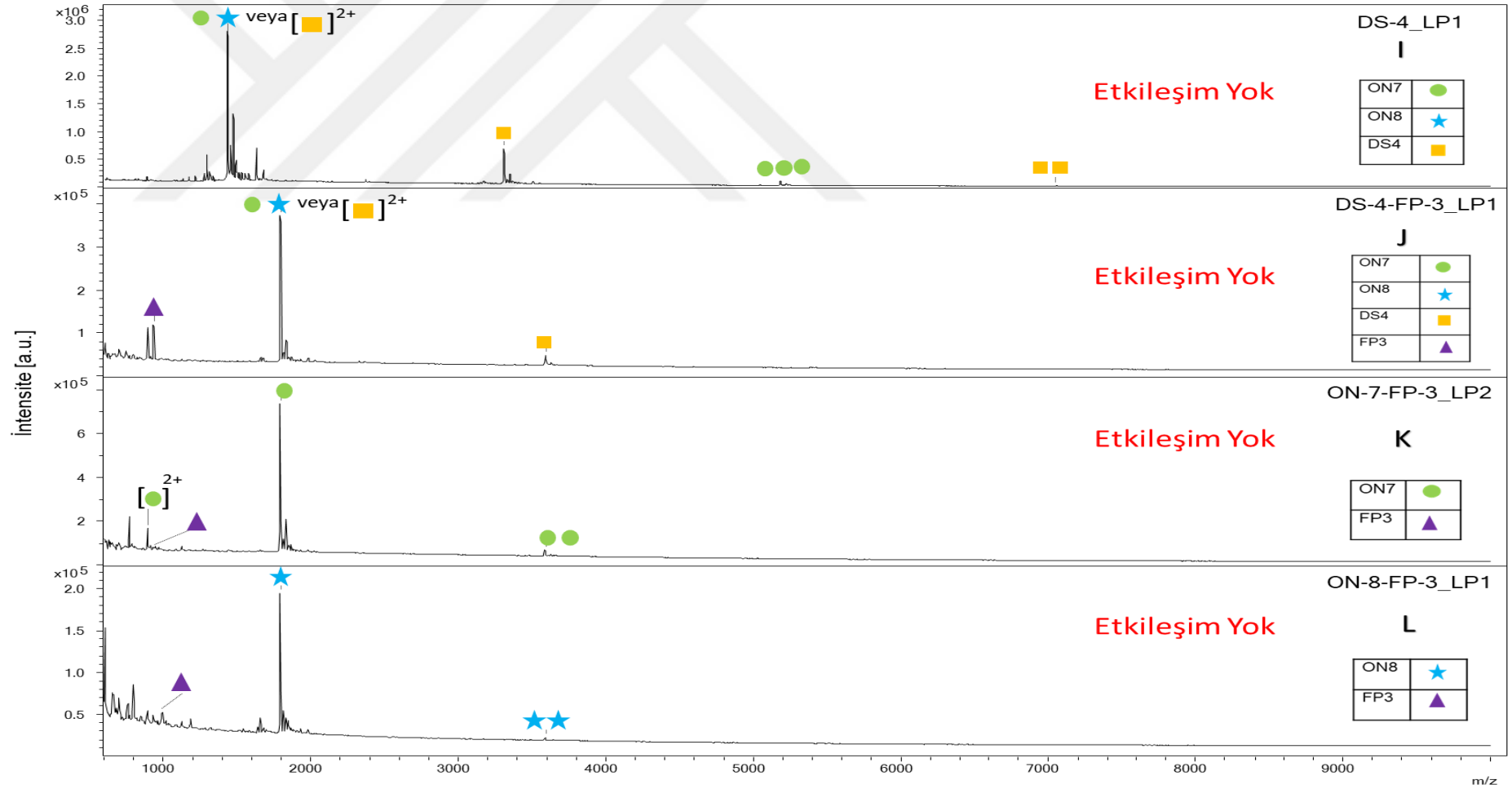
EK 1.2. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile FP-3 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri



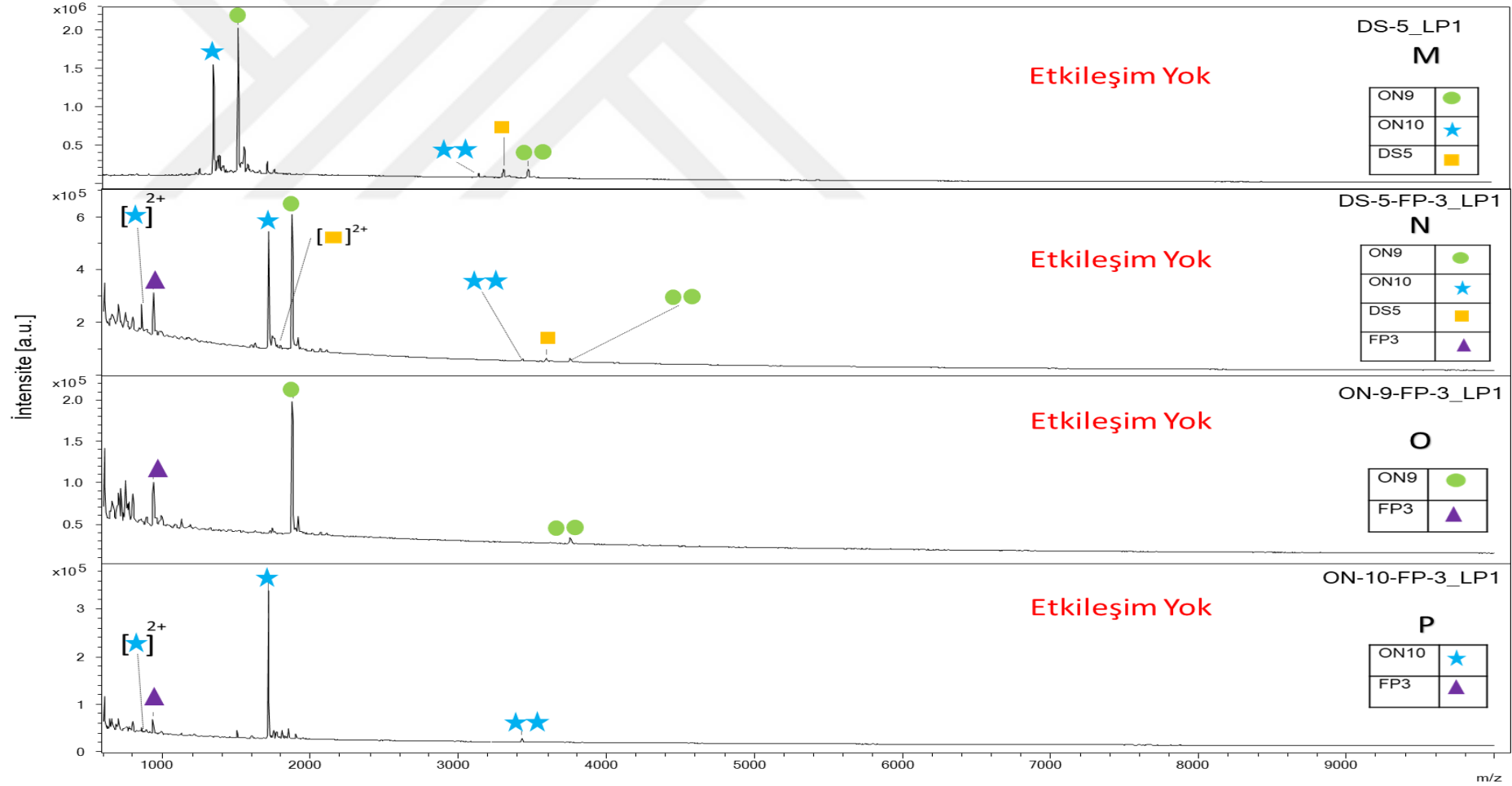
EK 1.2-Şekil 1. A)DS-2, B)DS-2-FP-3 etkileşimi, C)ON-3-FP-3 etkileşimi ve D)ON-4-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



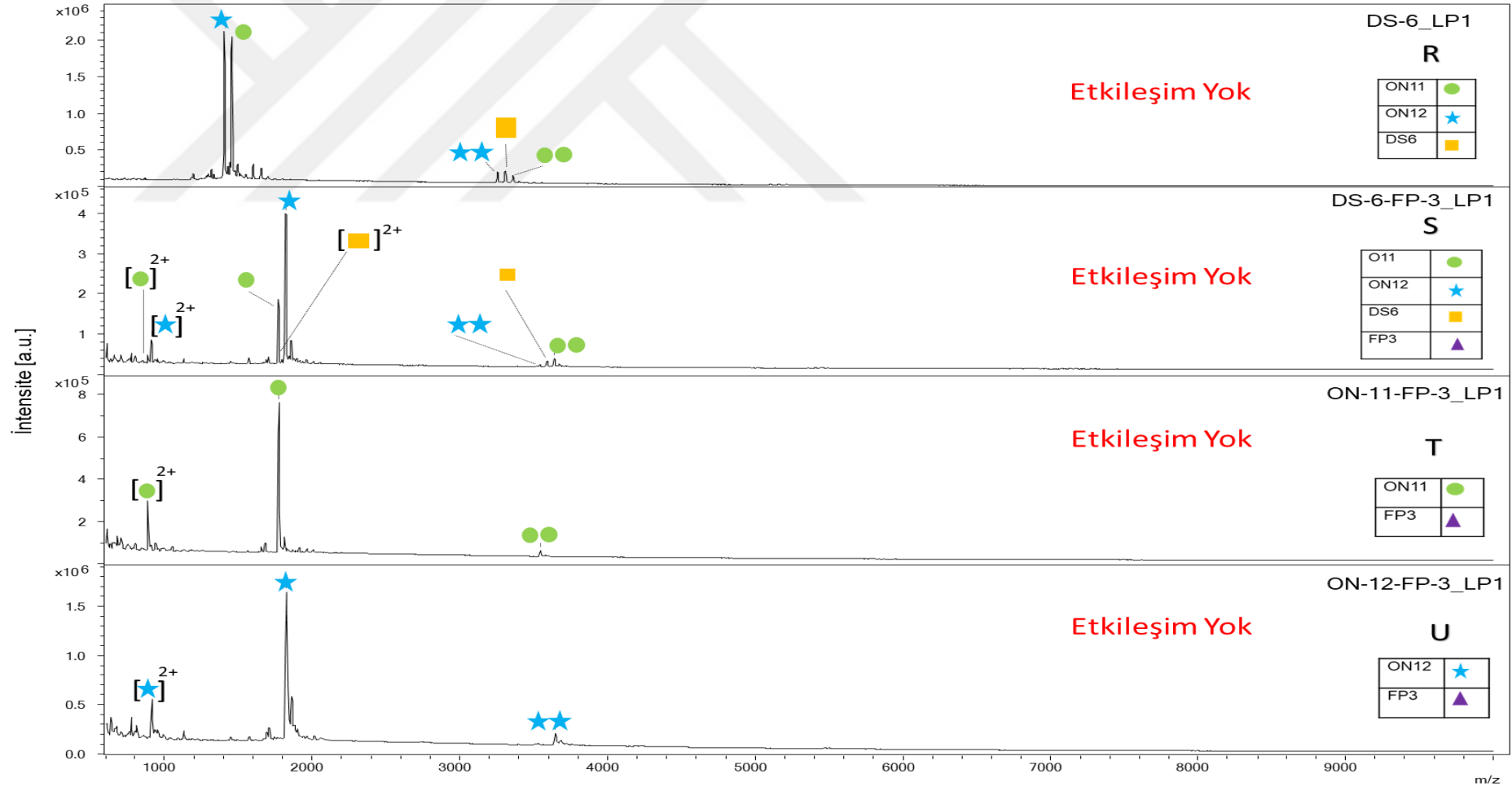
EK 1.2-Şekil 1. E)DS-3, F)DS-3-FP-3 etkileşimi, G)ON-5-FP-3 etkileşimi ve H)ON-6-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



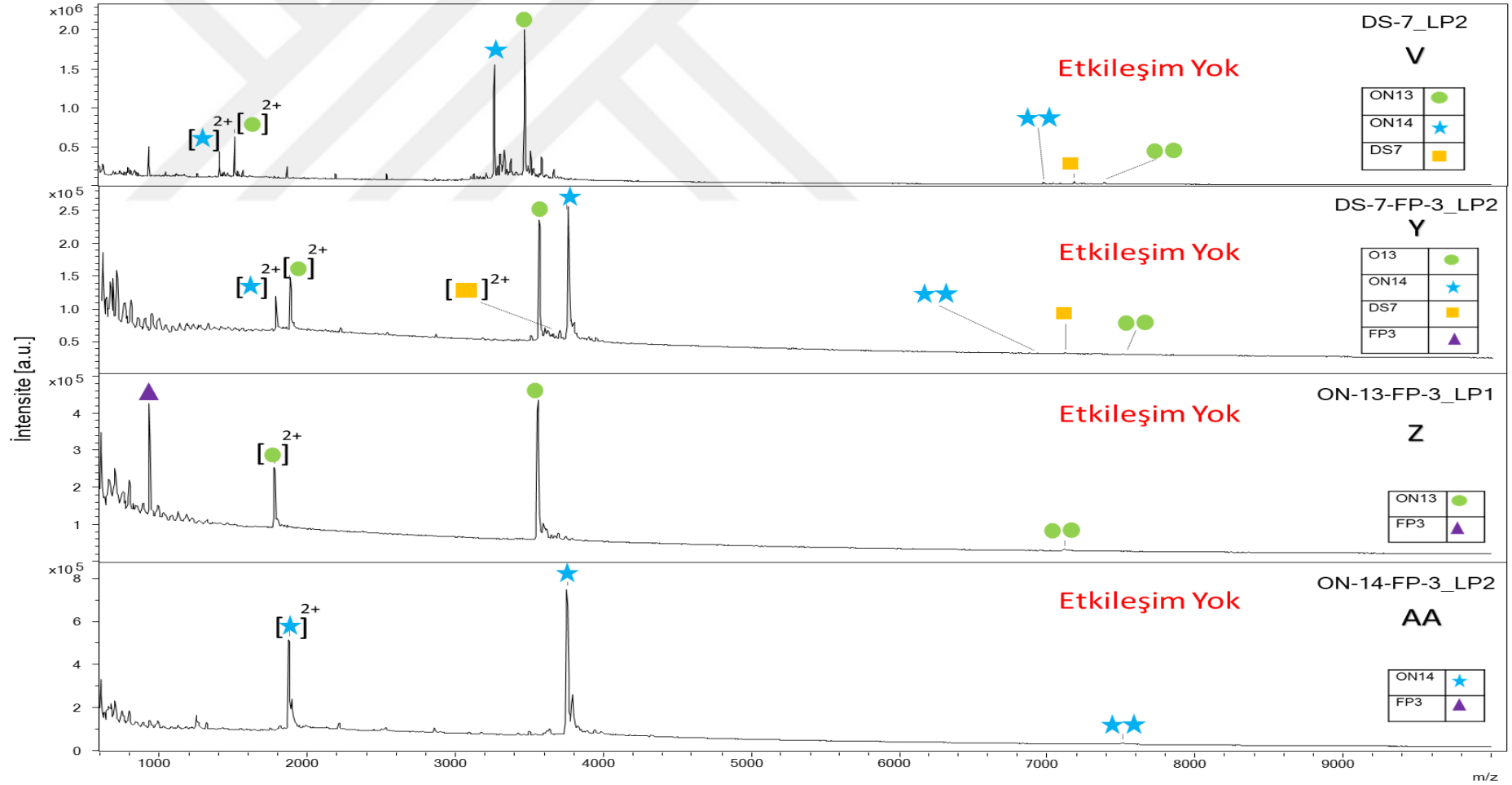
EK 1.2-Şekil 1. I)DS-4, J)DS-4-FP-3 etkileşimi, K)ON-7-FP-3 etkileşimi ve L)ON-8-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



EK 1.2-Şekil 1. M)DS-5, N)DS-5-FP-3 etkileşimi, O)ON-9-FP-3 etkileşimi ve P)ON-10-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile linear moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

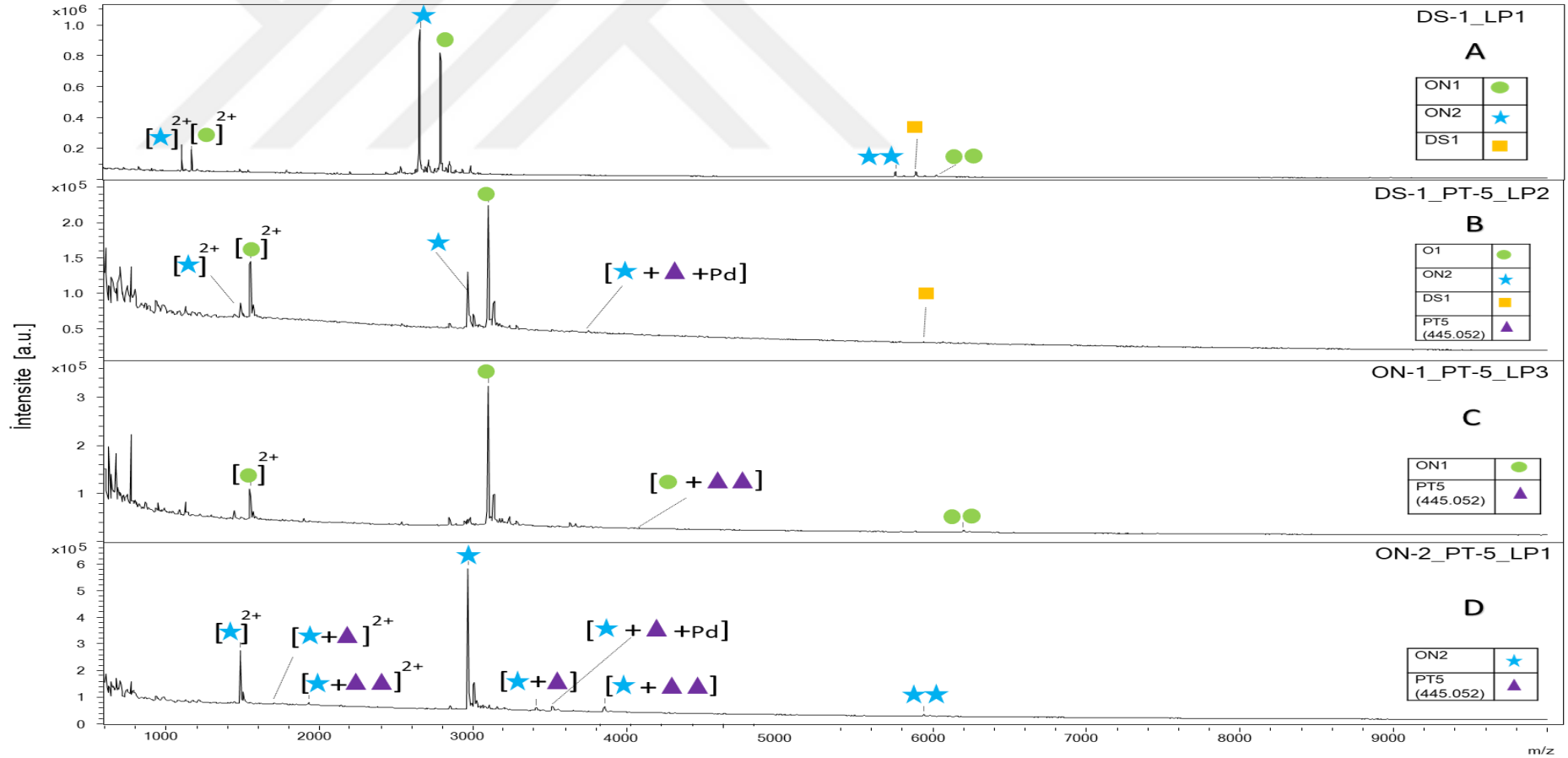


EK 1.2-Şekil 1. R)DS-6, S)DS-6-FP-3 etkileşimi, T)ON-11-FP-3 etkileşimi ve U)ON-12-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

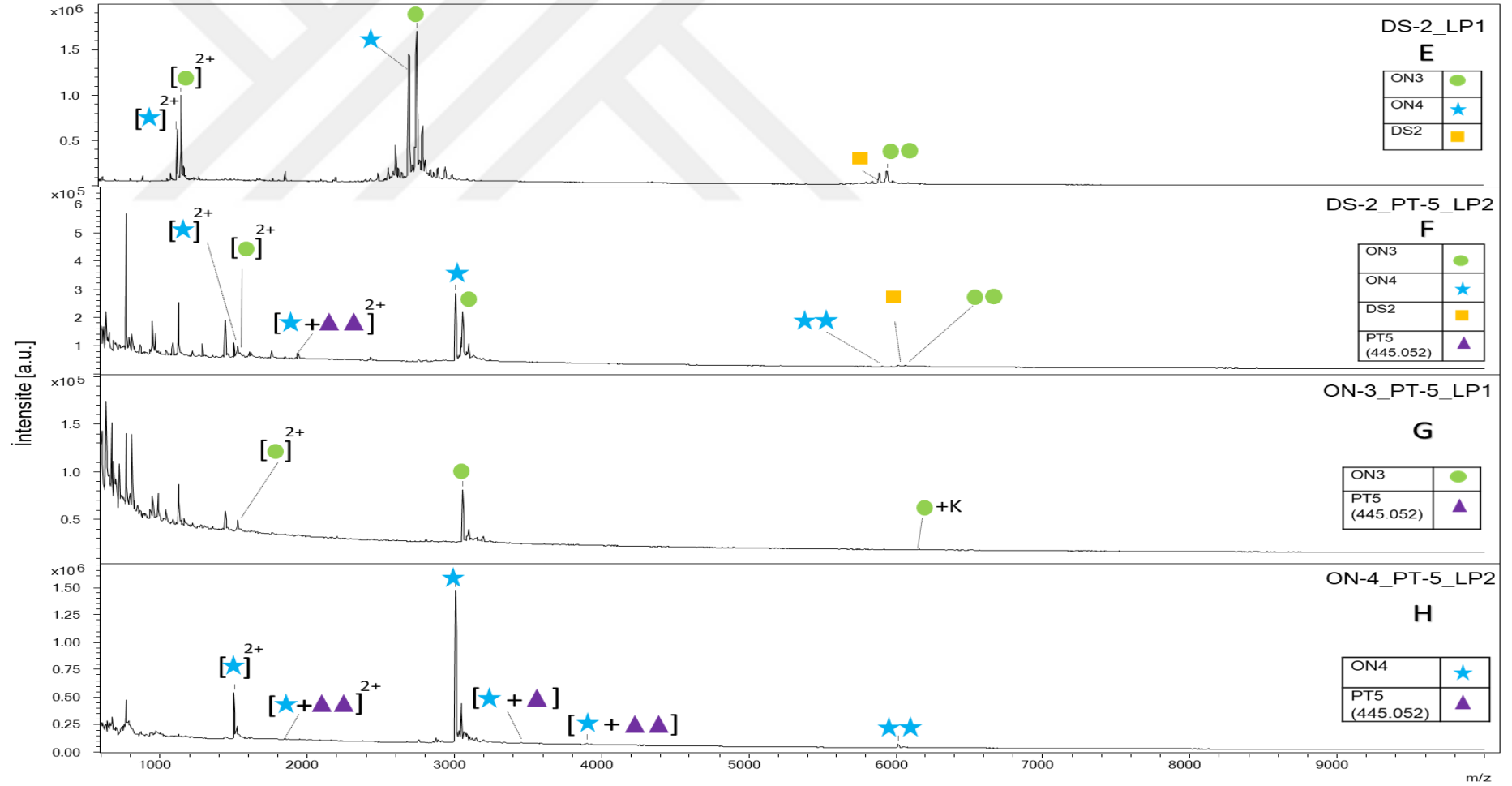


EK 1.2-Şekil 1. V)DS-7, Y)DS-7-FP-3 etkileşimi, Z)ON-13-FP-3 etkileşimi ve AA)ON-14-FP-3 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

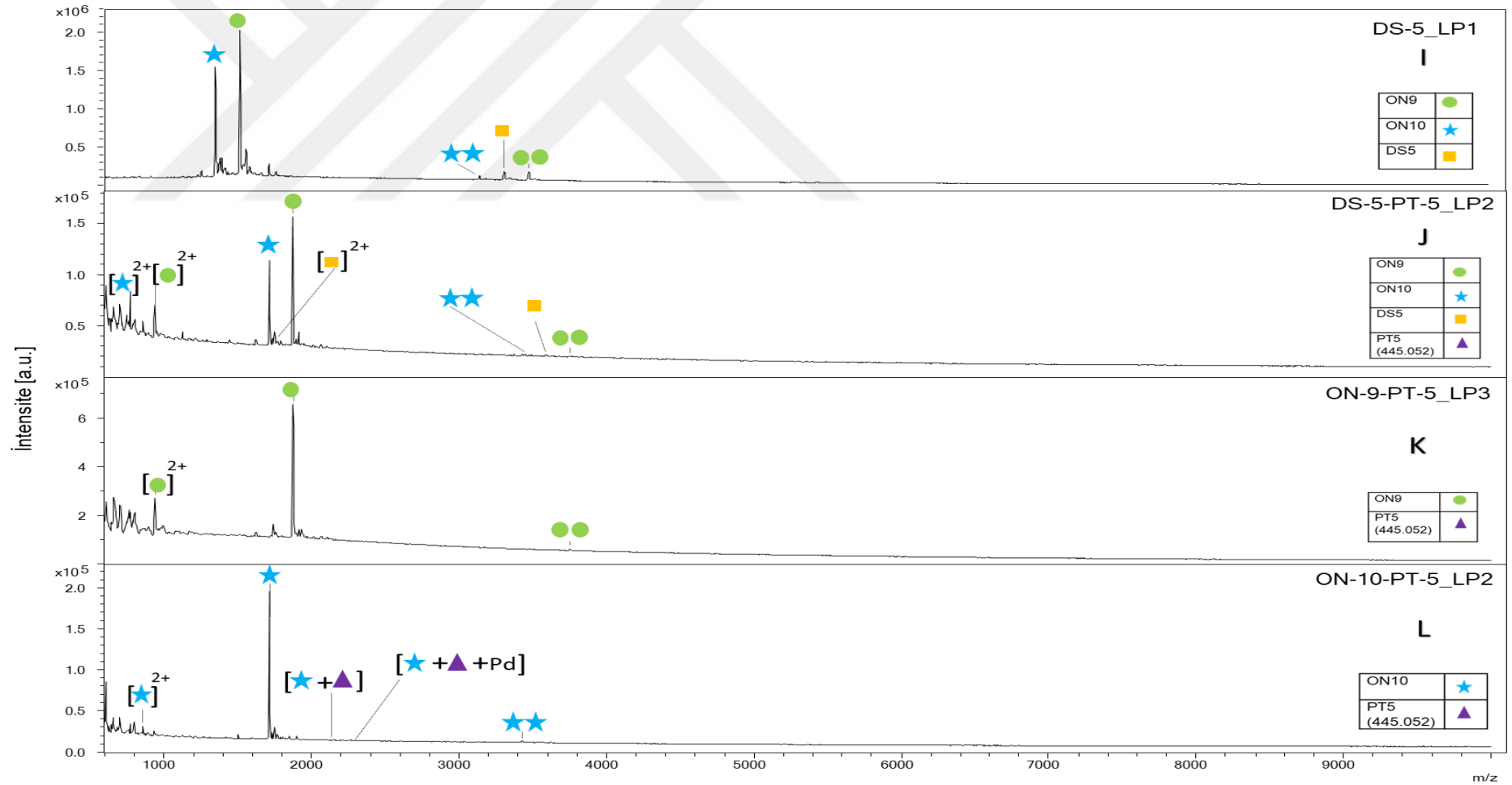
EK 1.3. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri



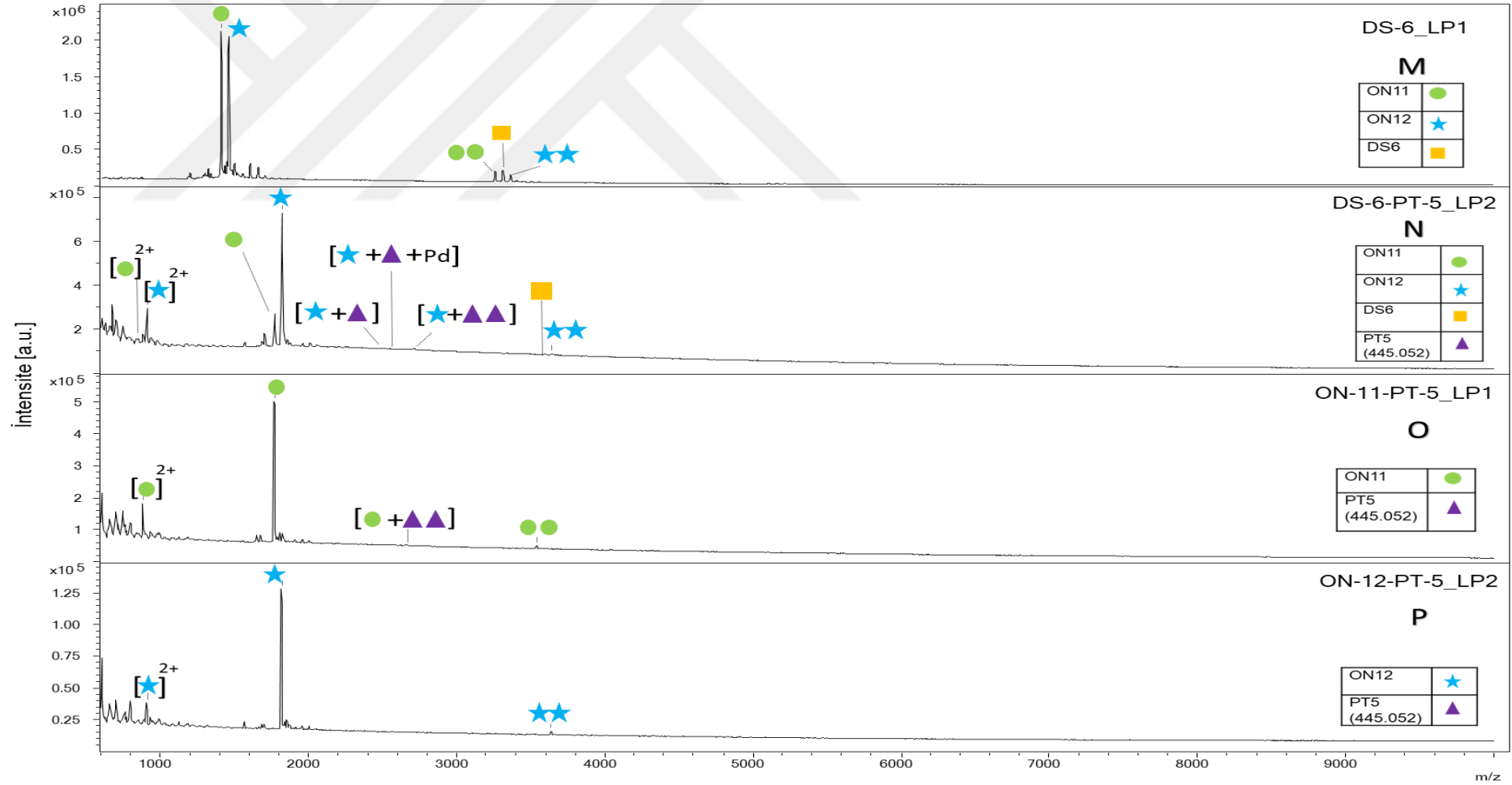
EK 1.3-Şekil 1. A)DS-1, B)DS-1-PT-5 etkileşimi, C)ON-1-PT-5 etkileşimi ve D)ON-2-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



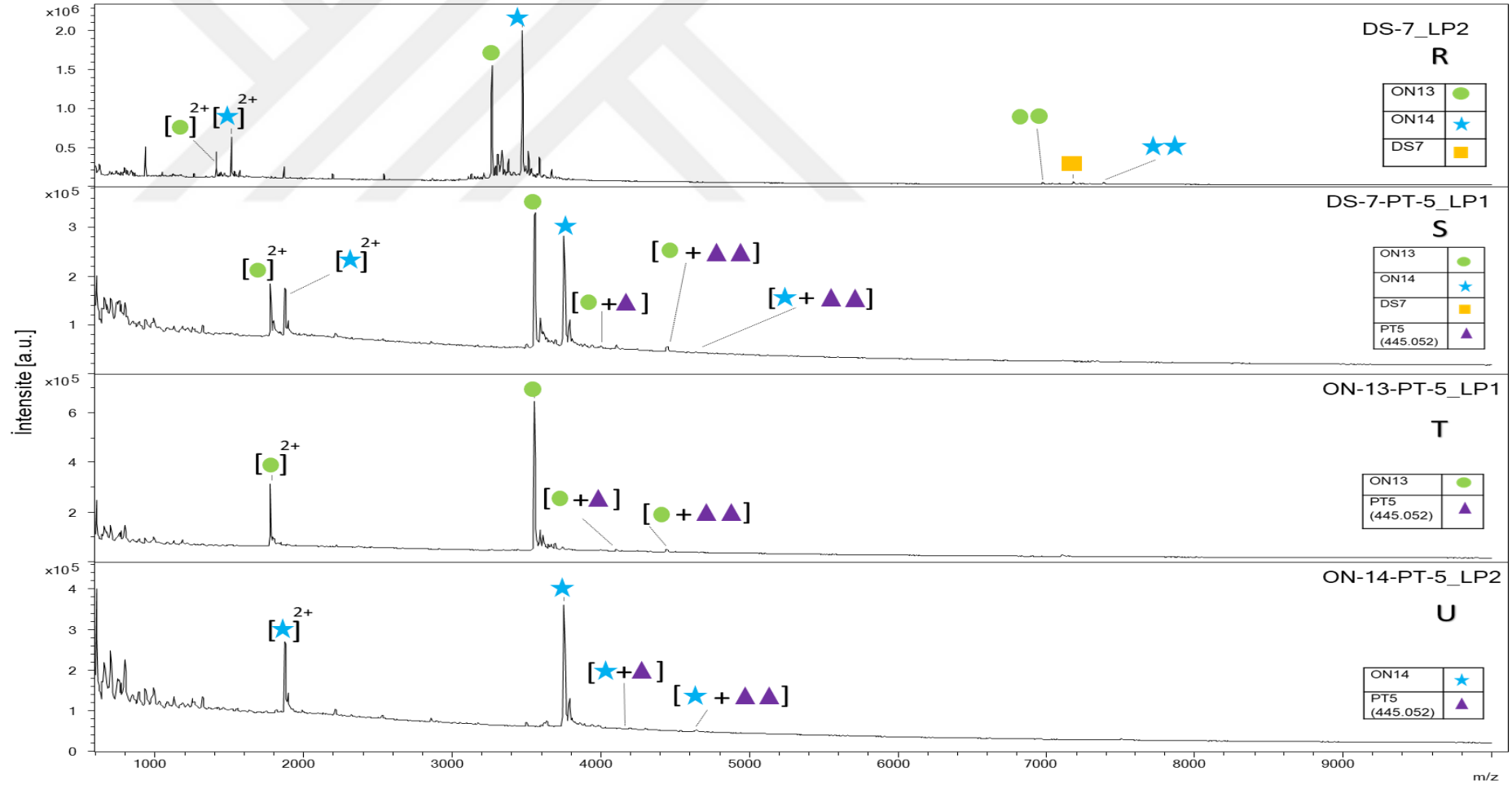
EK 1.3-Şekil 1. E)DS-2, F)DS-2-PT-5 etkileşimi, G)ON-3-PT-5 etkileşimi ve H)ON-4-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



EK 1.3-Şekil 1. I)DS-5, J)DS-5-PT-5 etkileşimi, K)ON-9-PT-5 etkileşimi ve L)ON-10-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

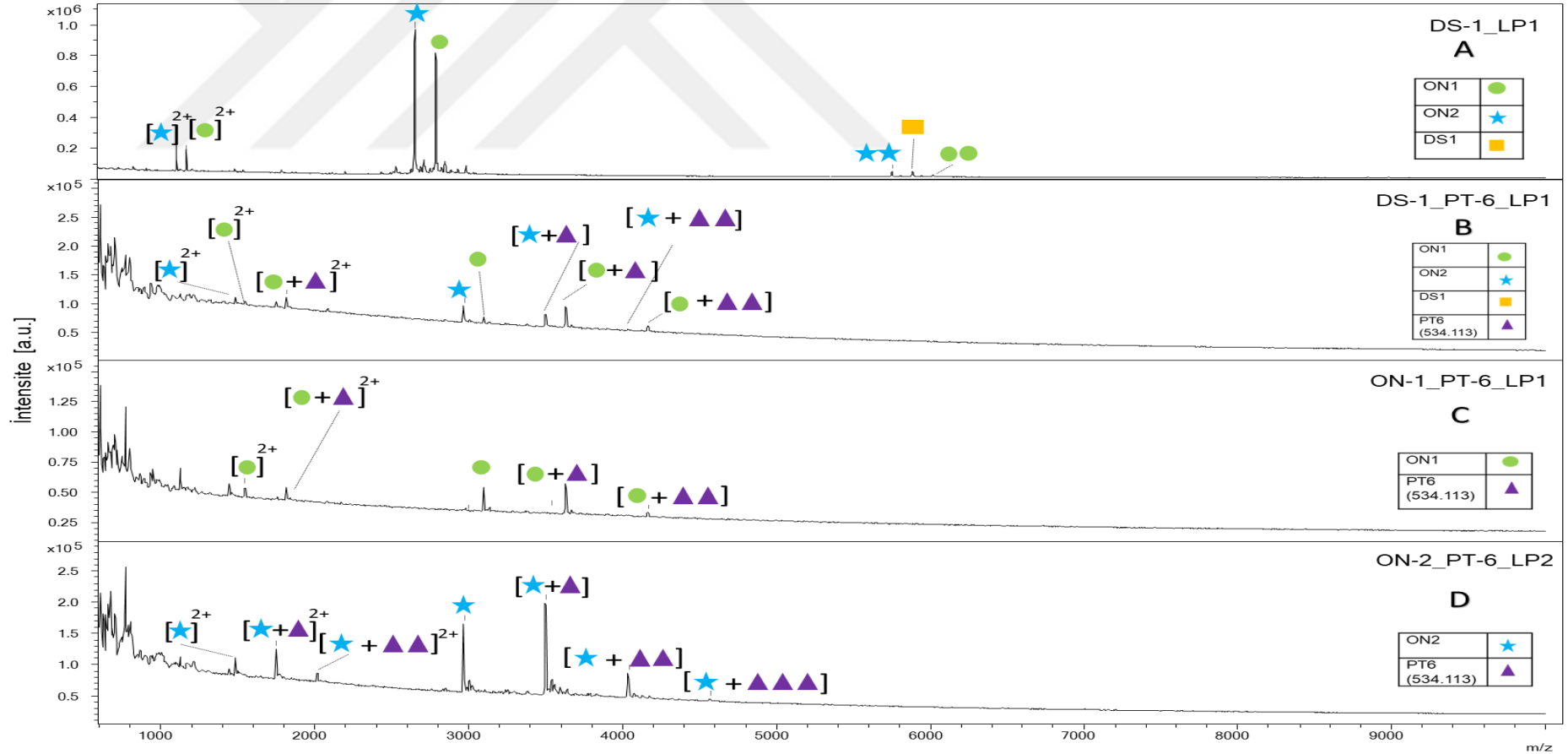


EK 1.3-Şekil 1. M)DS-6, N)DS-6-PT-5 etkileşimi, O)ON-11-PT-5 etkileşimi ve P)ON-12-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

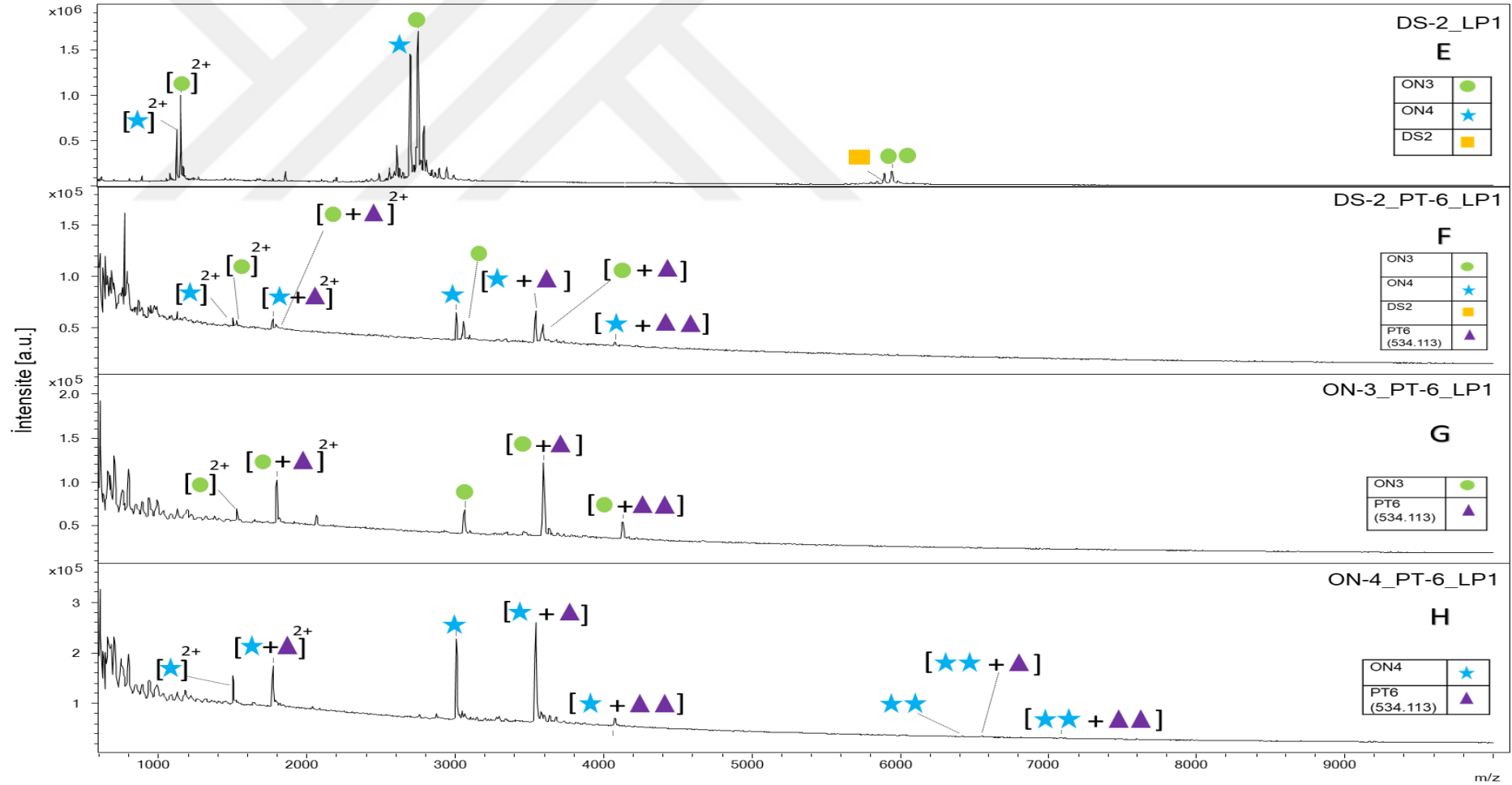


EK 1.3-Şekil 1. R)DS-7, S)DS-7-PT-5 etkileşimi, T)ON-13-PT-5 etkileşimi ve U)ON-14-PT-5 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).

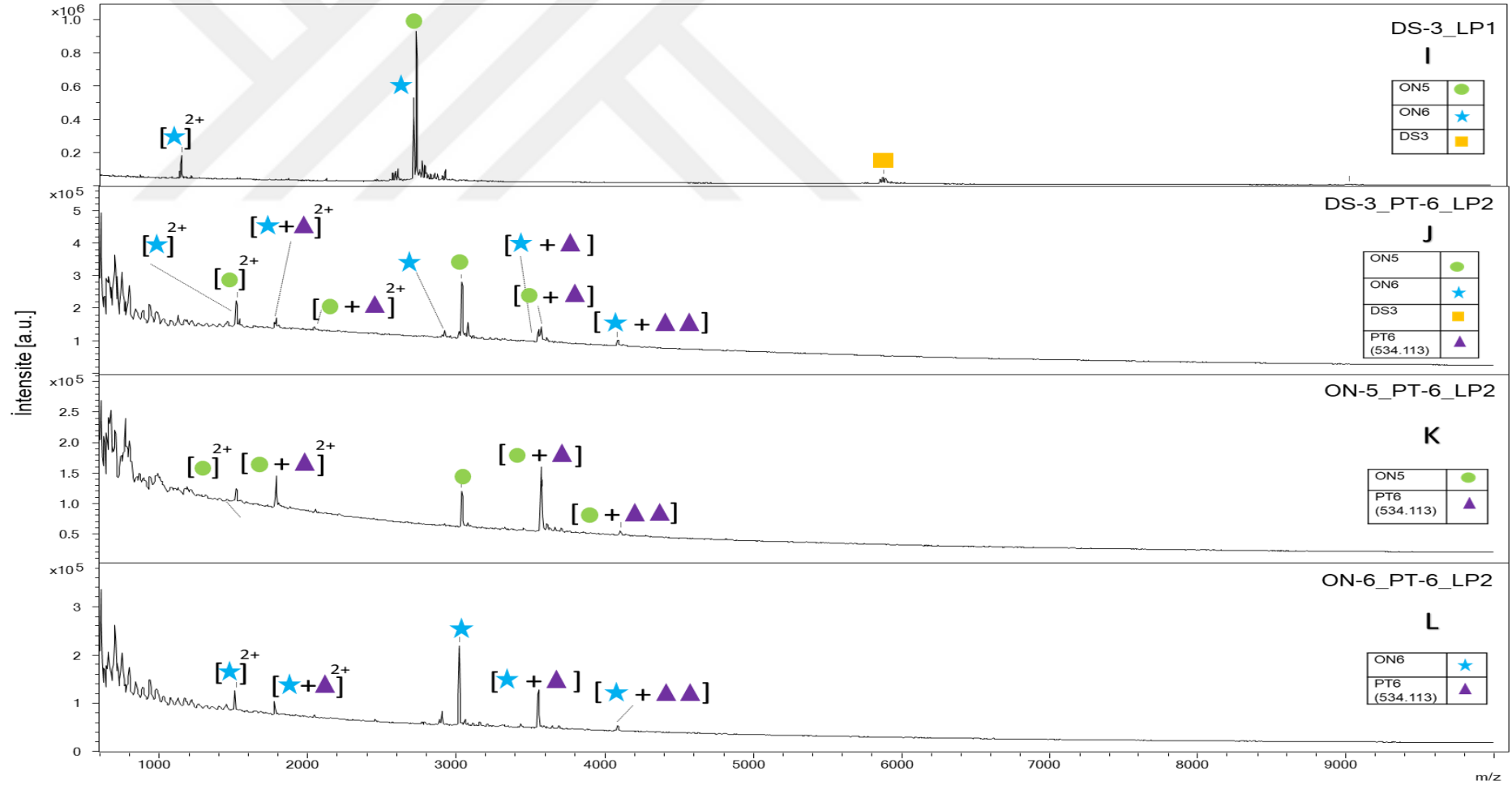
EK 1.4. Oligonükleotitler ve çift iplik DNA'lar ile PT-5 kodlu boyanın etkileşimlerinin MALDI-TOF-MS ile analizleri



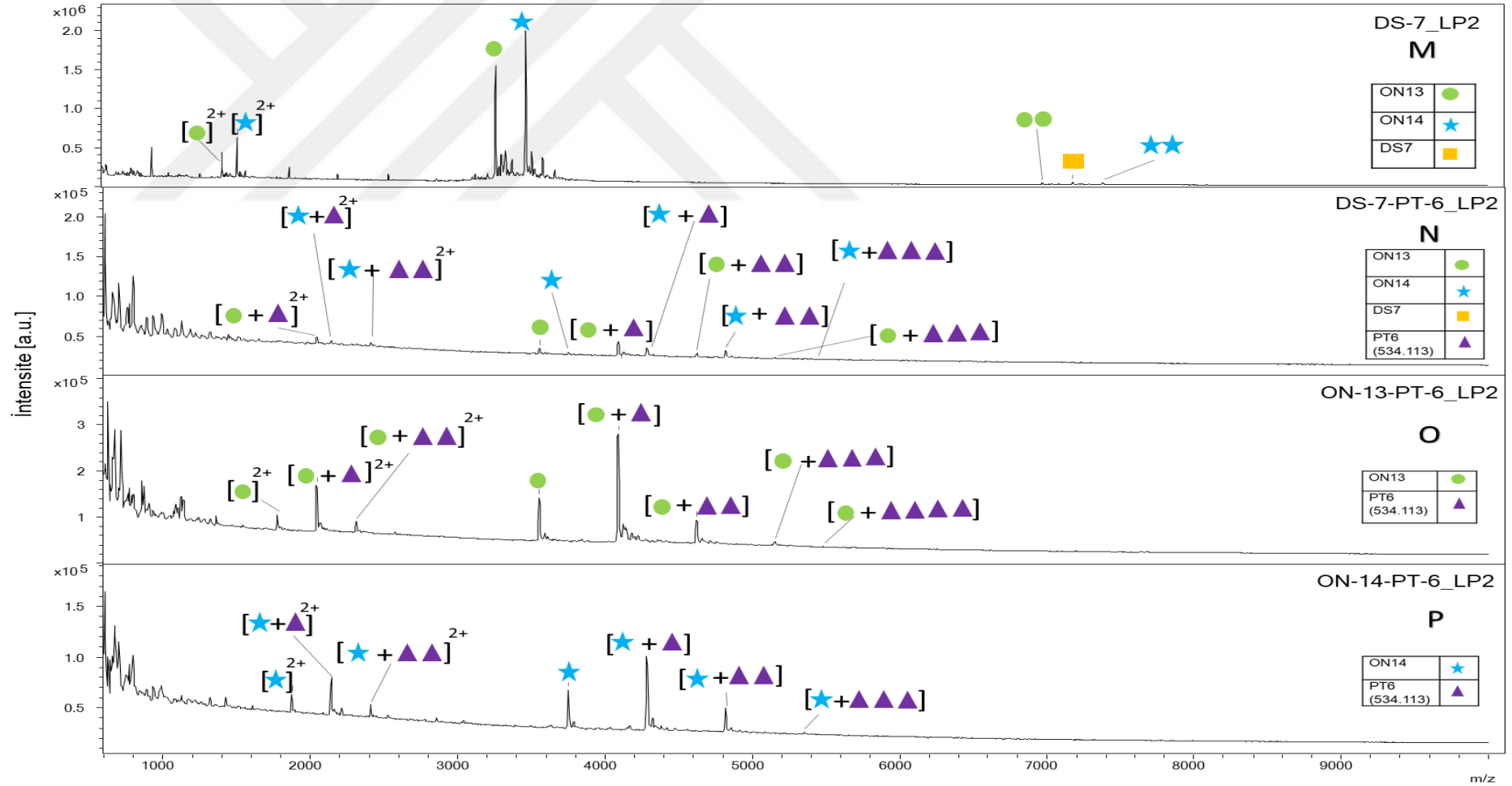
EK 1.4-Şekil 1. A)DS-1, B)DS-1-PT-6 etkileşimi, C)ON-1-PT-6 etkileşimi ve D)ON-2-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları.



EK 1.4-Şekil 1. E)DS-2, F)DS-2-PT-6 etkileşimi, G)ON-3-PT-6 etkileşimi ve H)ON-4-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



EK 1.4-Şekil 1. I)DS-3, J)DS-2-PT-6 etkileşimi, K)ON-5-PT-6 etkileşimi ve L)ON-6-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matriks ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).



EK 1.4-Şekil 1. M)DS-7, N)DS-7-PT-6 etkileşimi, O)ON-13-PT-6 etkileşimi ve P)ON-14-PT-6 etkileşimlerinin hacimce 1:1 (analit:matriks) oranındaki on-spot yöntemiyle hazırlanan 3-HPA matrisi ile lineer moddaki MALDI kütle spektrumları (devam ediyor).