

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI YENİ OKSİM TİPİ LİGAND KOMPLEKSLERİNİN NÜKLEOLİTİK
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ender ÇEKİRGE

AĞUSTOS 2008

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI YENİ OKSİM TİPİ LİGAND KOMPLEKSLERİNİN NÜKLEOLİTİK
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Kimyager Ender ÇEKİRGE

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
" Yüksek Lisans (Kimya)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.07.2008
Tezin Savunma Tarihi : 07.08.2008**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ**

Enstitü Müdürü V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

Öncelikle; Üniversitemize Biyokimya Anabilim Dalının kurulmasında, geliştirilmesinde ve bugünlere gelmesinde büyük emeği geçen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'ın fikir ustası rahmetli Hocam, Prof. Dr. Saadettin GÜNER'e en içten şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın planlama ve uygulaması süresinde en kısıtlı zamanlarda bile yardımlarını esirgemeyen, bilgiye ve kaynaklara ulaşmamda teşvik edici, yol gösterici olan ve sabrını benden esirgemeyen, Saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışmada kullandığım komplekslerin teminini sağlayan, Prof. Dr. Serdar KARABÖCEK'e ve Doktora Öğrencisi Aşlıgül KÜÇÜKDURLU'ya ve moleküler modelleme çalışmaları için Prof. Dr. Rıza ABBASOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında her ihtiyaç duyduğumda yardımlarını benden esirgemeyen, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya, Arş. Gör. Dr. Arzu ÖZEL'e, Öğr. Gör. Yakup KOLCUOĞLU'na, Arş. Gör. Özlem FAİZ'e, Arş. Gör. Melike YILDIRIM'a ve Arş. Gör. Melek ÇOL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gece yaralarına kadar, çoğu kez de sabahlara kadar tezimin yazılma aşamasında bana yardım eden, desteklerini esirgemeyen, sadece iyi gün dostu olmadıklarını gösteren arkadaşlarım Taha DUNAY'a ve Kadir GÜLER'e yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Şartlar ne olursa olsun asla pes etmemek, bırakmamak gerektiğini öğreten, gecesini gündüzüne katarak bana yardım eden değerli arkadaşım Doktora Öğrencisi Gülşah GÜL'e minnettar olduğumu belirterek çok teşekkür ederim.

Daima en büyük desteğim olan sevgili aileme hayatım boyunca sağladıkları bütün imkânlardan, hiç eksik etmedikleri sevgi ve ilgilerinden dolayı en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yoğun ve yorucu tüm çalışmalarım sırasında eşsiz melodileriyle bana eşlik eden, müzik dâhisi Dave BRUBECK'e ve Quartet'ine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ender ÇEKİRGE

Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Nükleik Asitler.....	3
1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri.....	3
1.2.2. DNA ve Yapıları.....	4
1.3. Nükleik Asit–Protein Etkileşimleri ve Nükleolitik Enzimler.....	7
1.3.1. Nükleazlar.....	7
1.3.2. DNA Polimerazlar.....	9
1.3.3. Topoizomerazlar.....	11
1.4. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi.....	11
1.4.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler.....	12
1.4.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri.....	14
1.4.3. İnterkalasyon Etkileşimleri.....	15
1.5. İnterkalatörlerin Yapılarının ve DNA ile Etkileşimlerinin Teorik İncelenmesi... 19	19
1.6. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
2.1. Cihazlar.....	20
2.2. Kimyasal Maddeler.....	20
2.3. Model Suş ve Bileşikler.....	21
2.4. Luria–Bertani (LB) Besiyerinin Hazırlanması.....	22
2.5. Gece Kültürlerinin Hazırlanması.....	22

2.6.	Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.6.1.	Elektroforetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.7.	Nükleolitik Aktivite Deneylei	24
2.7.1.	Agaroz jel Elektroforezi ile Komplekslerin Nükleaz Etkinliklerinin İncelenmesi	24
2.7.2.	Nükleaz Etkinliği Gösteren Kompleksler İçin Uygun Şartların Belirlenmesi	25
2.7.2.1.	Kompleks Konsantrasyonlarının Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi	25
2.7.2.2.	İnkübasyon Zamanının Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi.....	25
2.7.2.3.	Reaksiyon Karışımının pH Değerinin Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi	26
2.8.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	27
3.	BULGULAR	28
3.1.	Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları	28
3.2.	Komplekslerin Nükleolitik Aktivitelerinin İncelenmesi	30
3.2.1.	K1'in Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi	30
3.2.1.1.	K1–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyonuna Bağımlılığı.....	30
3.2.1.2.	K1–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	31
3.2.1.3.	K1–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	32
3.2.2.	K2'nin Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi	32
3.2.2.1.	K2–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyonuna Bağımlılığı.....	32
3.2.2.2.	K2–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	33
3.2.2.3.	K2–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	34
3.2.3.	K3'ün Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi.....	35
3.2.3.1.	K3–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı.....	35
3.2.3.2.	K3–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	35
3.2.3.3.	K3–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	36
3.2.4.	K4'ün Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi.....	37
3.2.4.1.	K4–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı.....	37
3.2.4.2.	K4–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	38
3.2.4.3.	K4–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	38
3.2.5.	K5'in Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi	39
3.2.5.1.	K5–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı.....	39
3.2.5.2.	K5–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	40
3.2.5.3.	K5–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	41

3.2.6.	K6'nın Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi	41
3.2.6.1.	K6–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı.....	41
3.2.6.2.	K6–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı	42
3.2.6.3.	K6–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı.....	43
3.3.	Komplekslerin Moleküler Modelleme Çalışmaları	43
3.4.	DNA Kesiminin Mekanizması	47
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
5.	ÖNERİLER	52
6.	KAYNAKLAR.....	53
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, bazı yeni oksim tipi ligand komplekslerinin nükleolitik etkinliğini incelenmiş ve bunların içerisinde, (2E,3E)-3-[(6-{{(1E,2E)-2-(hidroksiimino)-1-metilpropiliden}amino}piridin-2-il)imino]bütan-2-on oksim ligandının, homo dinükleer bakır(II) K1, hetero dinükleer bakır(II)-nikel(II) K2 ve 2-(hidroksiimino)-1-metilpropilidenaminofeniliminobütan-2-on oksim ligandının, mononükleer bakır(II) K3, hetero dinükleer nikel(II)-bakır(II) K4, homo dinükleer bakır(II) K5 ve homo trinükleer bakır(II) K6 komplekslerinin potansiyel nükleaz olabilecekleri tespit edilmiştir.

Komplekslerin nükleaz aktiviteleri, 1 µM-1000 µM konsantrasyon, pH 6.0-10.0 ve 0-60 dakika zaman aralıklarında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde oksim tipi ligand içeren mononükleer, homo ve heterodinükleer ve homotrinükleer komplekslerin nükleaz aktivitesi gösterdiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnterkalasyon, Oksim, Oksidatif Parçalanma, Nükleaz, Fenantrolin, Moleküler Modelleme

SUMMARY

Investigation of Nucleolytic Activities of Some New Oxime Type Ligand Complexes

In this study, nucleolytic activities of the newly synthesized complexes of some oxime type ligands have been investigated. Among these complexes, it has been determined that the homo dinuclear copper(II) K1, hetero dinuclear copper(II)–nickel(II) K2 complexes of the (2E,3E)-3-[(6-{{(1E,2E)-2-(hydroxyimino)-1-methylpropylidene}amino}pyridin-2-yl)imino]butane-2-one oxime ligand and copper(II) K3, heterodinuclear nickel(II)–copper(II) K4, homodinuclear copper(II) K5, and homotrimeric copper(II) K6 complexes of the 2-(hydroxyimino)-1-methylpropylideneaminophenyliminobutane-2-one oxime ligand to be a potential nuclease.

Nucleolytic activities of these complexes have been investigated at concentrations varied 1 μM –1000 μM , pH 6.0–10.0 and 0–60 minutes range using agarose gel electrophoresis. When the results were considered, it has been seen that mononuclear, homo and heterodinuclear and homotrimeric complexes containing oxime type ligands have shown nucleolytic activities.

Key Words: Intercalation, Oxime, Oxidative Cleavage, Nuclease, Phenanthroline, Molecular Modelling

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Purin ve Pirimidin Bazlarının Kimyasal Yapısı.....	3
Şekil 2. D-riboz ve D-2-deoksiribozun Kimyasal Yapısı	4
Şekil 3. Bir DNA molekülünün Yapısı	5
Şekil 4. DNA çift sarmalının sahip olduğu konformasyonlar.....	6
Şekil 5. DNA'nın süpersarmal yapısının Oluşturulması	7
Şekil 6. (A) DNA Polimerazın 5'→3' (B) DNA polimerazın 3'→5' ekzonükleaz ekzonükleaz aktivitesi.....	10
Şekil 7. (I) DNA'ya Metal Bağlanması'nın Muhtemel Yolları (II) DNA ile magnezyum iyonunun etkileşimi (A) yalnızca hidrojen bağlarıyla hegzahidratize, (B) hidrojen bağları ve koordine olarak bağlanan pentahidratize, (C) köprülü hegzahidratize ve hidrojen bağı ile bağlı.....	13
Şekil 8. Oluğa bağlanan ajanlar; netropsin ve distamisinin kimyasal yapıları ve oluğa bağlanma şekilleri.....	15
Şekil 9. Etidyum bromürün interkalasyonu.....	16
Şekil 10. İnterkalasyon yapan ajanların temsili kimyasal yapıları.....	16
Şekil 11. Bis-İnterkalatör ilaç diterkalaniumun kristal yapısının şekli.....	17
Şekil 12. DAPI'nin kimyasal yapısı	18
Şekil 13. Klasik olmayan interkalatörlerin kimyasal yapıları	18
Şekil 14. K1-K6 komplekslerinin kimyasal yapıları.....	22
Şekil 15. Sirküler DNA Formları ve agaroz jeldeki görüntüleri.....	24
Şekil 16. Kontrol deneyleri. 1, DNA-ligand I; 2, DNA-ligand I+MMPP; 3, DNA-MMPP; 4, DNA; 5, DNA-BamHI; 6, DNA-ligand II; 7, DNA-ligand II+MMPP; 8, DNA-MMPP; 9, DNA+40 mM T1+40 mM T2; 10, DNA+40 mM T1; 11, DNA+40 mM T1+MMPP; 12, DNA+40 mM T2; 13, DNA+40 mM T2+MMPP; 14, DNA+DMF; 15, DNA+DMF+MMPP.....	29

Şekil 17.	T1 ve T2 nin MMPP'li ortamda DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA; 2, DNA–BamHI; 3, 10 µM T1; 4, 25 µM T1; 5, 50 µM T1; 6, 75 µM T1; 7, 100 µM T1; 8, 10 µM T2; 9, 25 µM T2; 10, 50 µM T2; 11, 75 µM T2; 12, 100 µM T2.....	29
Şekil 18.	K1 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0.1 µM K1; 4, 1 µM K2; 5, 10 µM K1; 6, 100 µM K1; 7, 500 µM K1; 8, 1000 µM K1.....	30
Şekil 19.	K1 kompleksi ve MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0.....	31
Şekil 20.	K1 kompleksinin belirli konsantrasyon ve belirli pH değerinde nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. dakika.....	32
Şekil 21.	K2 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0.1 µM K2; 4, 1 µM K2; 5, 10 µM K2; 6, 100 µM K2; 7, 500 µM K2; 8, 1000 µM K2.....	33
Şekil 22.	K2 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.....	33
Şekil 23.	K2 kompleksinin belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. Dakika.....	34
Şekil 24.	K3 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 1 µM K3; 4, 10 µM K3; 5, 25 µM K3.....	34
Şekil 25.	K3 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0.....	36
Şekil 26.	K3 kompleksinin belirli konsantrasyon ve belirli pH değerinde nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. Dakika.....	36

Şekil 27.	K4 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 1 µM K4; 4, 10 µM K4; 5, 25 µM K4.....	37
Şekil 28.	K4 kompleksi ve MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.....	38
Şekil 29.	K4 kompleksinin belirli konsantrasyon ve belirli pH değerinde nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. Dakika.....	39
Şekil 30.	K5 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0.1 µM K5; 4, 1 µM K5; 5, 10 µM K5; 6, 100 µM K5; 7, 500 µM K5; 8, 1000 µM K5.....	39
Şekil 31.	K5 kompleksi ve belirli konsantrasyonda MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0.....	40
Şekil 32.	K5 kompleksinin, belirli konsantrasyon ve belirli pH değerinde nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. Dakika.....	41
Şekil 33.	K6 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0.1 µM K6; 4, 1 µM K6; 5, 10 µM K6; 6, 100 µM K6; 7, 500 µM K6; 8, 1000 µM K6.....	42
Şekil 34.	K6 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.....	42
Şekil 35.	K6 kompleksinin, belirli konsantrasyon ve belirli pH değerinde nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. dakika; 4, 10. dakika; 5, 20. dakika; 6, 30. dakika; 7, 40. dakika; 8, 50. dakika; 9, 60. Dakika.....	43
Şekil 36.	d(GpC) ² dinükleotidinin moleküler modellemesi.....	44
Şekil 37.	K5 kompleksinin moleküler modellemesi.....	44
Şekil 38.	K6 kompleksinin moleküler modellemesi.....	44
Şekil 39.	K6 kompleksinin interkalasyonu.....	45

Şekil 40.	K5 kompleksinin Fenantrolin grubunun interkalasyonu.....	46
Şekil 41.	K5 kompleksinin oksim ligandının interkalasyonu.....	46
Şekil 42.	1,10–fenantrolin kompleksinin nükleolitik aktivitesinin kinetik mekanizmasının şematik gösterimi.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Protein nükleazların sınıflandırılması.....	9

SEMBOLLER DİZİNİ

A	: Adenin
bp	: Baz Çifti
C	: Sitozin
DAPI	: 4',6-diamidino-2fenilindol
DMF	: Dimetilformamit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetra Asetik Asit
G	: Guanin
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HOMO	: En Yüksek Enerjili Dolu Moleküler Orbital
K ₂ HPO ₄	: Di Potasyum Hidrojen Fosfat
LUMO	: En Düşük Enerjili Boş Moleküler Orbital
MMPP	: Magnezyummonoperoksifalat
mM	: Milimolar
MPA	: Merkaptopropiyonik Asit
NMR	: Nükleer Mağnetik Rezonans
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonunun Negatif Logaritması
RNA	: Ribonükleik Asit
T	: Timin
U	: Urasil
UV	: Ultra Viyole
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat Derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Nükleik asitler, biyomoleküller içerisinde fonksiyonları açısından oldukça önemli bir sınıfa oluşturlar. Bu biyopolimerler canlıların yaşam sürecinde önemli bir rol oynarlar. Kalıtım bilgisini taşıyan ve depolayan moleküller olduklarından, canlı organizmaların büyüme, gelişme ve çoğalması için gerekli bütün bilgiyi içerir ve genetik bilginin replikasyonu ve transkripsiyonu süresi boyunca protein ve enzimlerin biyolojik sentezine yol gösterirler [1,2].

Canlı sistemlerde hücrenel ortam içinde bulunan Nükleik asitler, proteinler, su, metal iyonları ve bu metal iyonlarının kompleksleri, küçük organik moleküller ve diğer kimyasal türlerin büyük bir bölümü ile geri dönüşümlü olarak etkileşirler [3,4]. Bütün bu kimyasal türler arasında, nükleik asitlerle proteinler arasındaki etkileşimler, DNA'nın replikasyonu, rekombinasyonu ve translasyonu gibi birçok biyokimyasal süreçte önemli bir rol oynar [5]. Bir biyomolekülün fonksiyonu genellikle onun diğer moleküllerle olan spesifik ve kovalent olmayan etkileşimlerine bağlıdır [5]. Bu etkileşimler DNA çift sarmalının purin ve pirimidin halkalarının spesifik atomları ile amino asit yan zincirleri arasında; hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, iyonik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler aracılığı ile gerçekleşir [6]. Bu protein-DNA etkileşimleri hücrenel işlevler için gereklidir [7]. Sekans spesifik olarak DNA bağlayan proteinler tanımlanmıştır ve DNA protein kompleksleri, X-ray kristalografisi, NMR, absorpsiyon, floresans ve UV spektroskopisi gibi çeşitli metodlar kullanılarak çok geniş bir şekilde çalışılmıştır [5,7].

Proteinlerin yokluğunda, hücreler, DNA'ları üzerindeki herhangi bir fonksiyonu gerçekleştiremezler. DNA, gerekli bir fonksiyonu gerçekleştirebilmek için enzimlerle sıra spesifik olarak etkileşirler. Böyle enzimler, spesifik hedef sıraları, spesifik yapıları veya DNA'da spesifik kimyasal modifikasyonları tanırlar ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu, tamiri veya prokaryotlarda restriksiyonu gibi reaksiyonları katalizlemelerinin yanında [8], bu reaksiyonlarda önemli roller oynarlar [9]. Bu biyokimyasal süreçlerde önemli olan enzimlere bir örnek olan nükleazlar, DNA omurgasını oluşturan, biyolojik sistemlerde de çoğu zaman rastlanan ve kimyasal bağlar arasında en kuvvetli bağlar olan, şeker ve fosfat grupları arasındaki fosfodiester bağlarının kesilmesi reaksiyonlarının katalizinden sorumludurlar [10,11,12].

Fosfodiester bağlarının biyolojik moleküller arasında en kararlı bağlar oluşu ve bu bağları hidrolizleyebilme yetenekleri yüzünden nükleazlar, bütün enzimler içinde yegâne kılınmıştır. Diğer hiçbir enzim, bir organizmanın fizyolojisini nükleazlar gibi etkileyemezler [12]. Nükleazların bir kaçı kendi birincil özelliği olan fosfodiester bağlarının hidrolizlenmesini katalizlemeleri yanında diğer enzimatik fonksiyonları da barındırır [12]. Çoğu nükleazlar, DNA polimeraz, ligaz, helikaz veya kinaz ve represör gibi diğer fonksiyonları gösteren enzimler gibi birleşik katalitik aktivitelere de sahiptirler [12].

Enzimler, biyolojik sistemlerde kimyasal reaksiyonları kolaylaştıran biyokatalizörlerdir. Bu biyokatalizörler geleneksel olarak proteinler olarak bilinirler. Fakat proteinler katalitik fonksiyona sahip yegâne moleküller değildirler. Son yıllarda birkaç DNA ve RNA molekülünün böylesi fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Protein ve DNA ya da RNA'ya ek olarak başka birkaç molekülün (bleomisin, fenantrolin ve diğerleri gibi) nükleolitik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Enzim benzeri katalitik fonksiyon gösteren kimyasal reaktifler veya küçük moleküller “kemzim” (chemzymes) olarak adlandırılmıştır. Bu nükleazlar “yapay” veya “kimyasal nükleazlar” olarak adlandırılırlar [12].

DNA ve RNA'ya bağlanan ve onları oksidatif veya hidrolitik mekanizma ile kesen kimyasal nükleazların gelişimi son birkaç on yıl süresince önemli bir ilgi çekmiştir. Böyle yapay küçük–molekül katalizörlerin; biyoteknoloji, nanoteknoloji, terapötik yaklaşımlar ve nükleik asit konformasyonları çalışmalarında potansiyel olarak yararlı araçlar olabileceği düşünülmektedir. Bu bakımdan nükleik asitlerle geçiş metal komplekslerinin etkileşimleri daha fazla dikkat kazanmıştır [13]. Araştırmacılar yüksek sıra ve yapı özgüllüğü ile DNA'yı kesen ya da DNA'ya bağlanan yeni geçiş metallerinin dizaynına önemli derecede ilgi göstermişlerdir [14].

Son yirmi yılda bildirilmiş tüm metal kompleksleri arasında en ilgi çekici sınıf, etkin nükleik asit kesimi yüzünden katalizör olarak genişçe çalışılmış bakır(II) kompleksleridir [15]. Bakır fizyolojik olarak önemli bir metal elementidir [16]. Bu bakır komplekslerinin arasından, dikkatler yüksek nükleolitik aktiviteleri ve anti tümör, anti–mantar ve anti mikrobiyal aktiviteleri yüzünden 1,10–fenantrolin ligandının bakır komplekslerine odaklanmıştır [17].

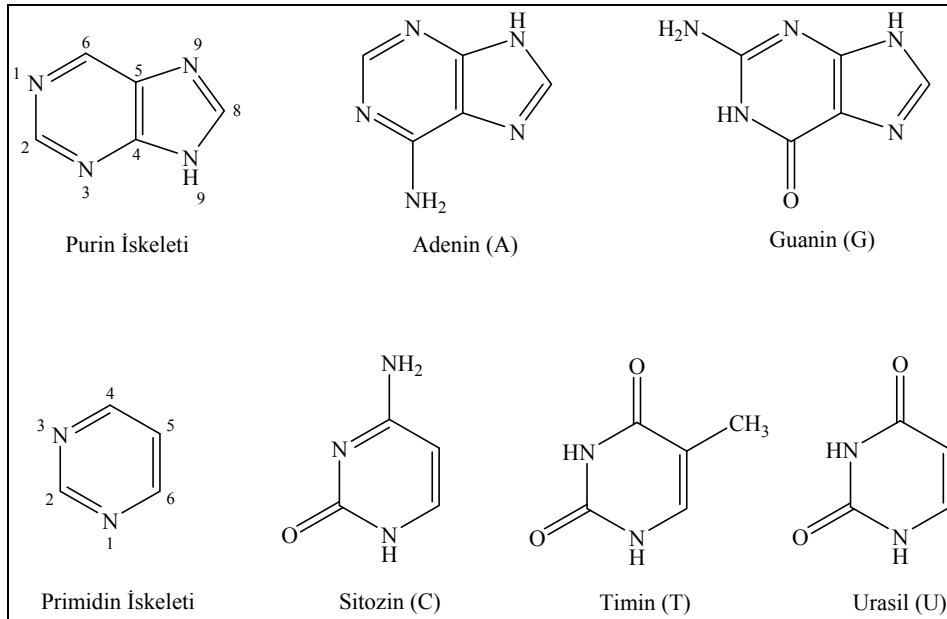
1.2. Nükleik Asitler

1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri

Nükleik asitler ilk defa F. Miescher tarafından 19. yüzyılın ikinci yarısında izole edilmiş ve çalışılmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarla beraber purin ve pirimidin adı verilen organik molekülleri de içerdiği belirlenmiştir. Ancak nükleik asitlerin gerçek biyolojik önemi 20. yüzyılın ortalarına doğru anlaşılmıştır [1].

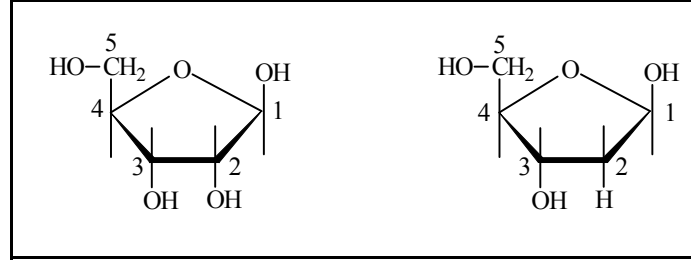
Bu bileşenleri ile birlikte nükleik asitler nükleotid olarak adlandırılan monomerlerin birer polimeri olarak değerlendirilebilirler. Nükleotidlerden oluşturulan ve nükleik asit olarak bilinen polinükleotidler, fizyolojik pH değerlerinde fosfat grubu üzerindeki zayıf asidik gruplar iyonlaşmış olduğundan, bir polianyon karakteri taşırlar [1].

Bir nükleotid molekülü, bir purin veya bir pirimidin gibi azot içeren bir baz ile beraber bir şeker ve bir veya birden fazla fosfat grubu içeren maddelerdir. Azot içeren purinler adenin (A) ve guanin (G) şeklinde bilinir, pirimidinler ise sitozin (C), timin (T) ve urasil (U)'dir (Şekil 1). DNA molekülü adenin ile guanin purinlerini ve timin ile sitozin pirimidinlerini içerir. RNA molekülleri ise adenin ile guanin purinleri ve sitozin ile urasil pirimidinlerini ihtiva eder. Dolayısıyla birer yapı elemanı olarak timin sadece DNA'da ve urasil de sadece RNA'da kullanılır [1].



Şekil 1. Purin ve Pirimidin Bazlarının Kimyasal Yapısı [1]

Nükleotidler D-riboz ve D-2-deoksiriboz adı verilen iki tür şekerden oluşur. RNA molekülü D-riboz içerir. DNA ise deoksiriboz moleküllerinden oluşturulur ve D-2-deoksiriboz molekülünün 2 numaralı karbon atomunda ribozun aynı konumunda bulunan hidroksil grubu yerine bir hidrojen atomu mevcuttur (Şekil 2) [1].



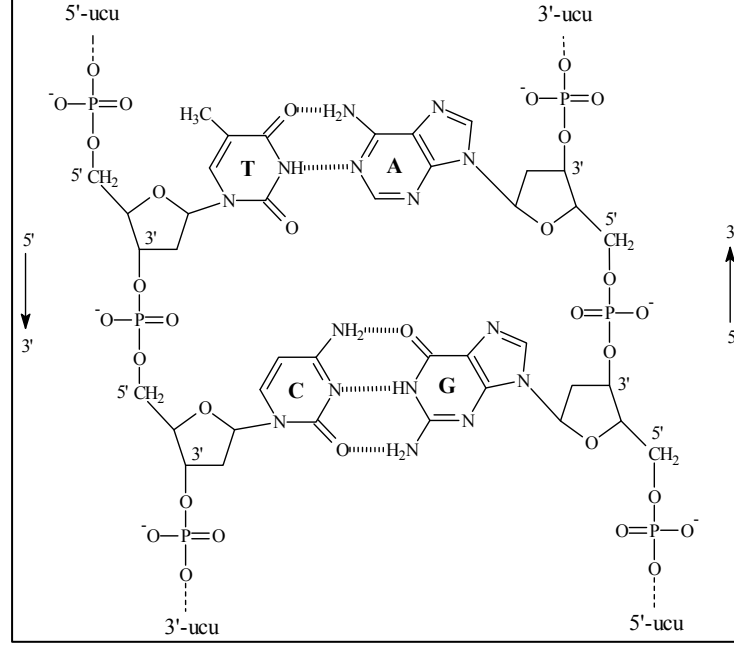
Şekil 2. D-riboz ve D-2-deoksiribozun Kimyasal Yapısı [1]

1.2.2. DNA ve Yapıları

DNA molekülünün yapısı ilk defa 1950'li yıllarda Watson ve Crick adlı araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Bu yapıya göre, bir DNA molekülünde temel iskeleti şeker-fosfat birimleri oluşturur ve bu moleküller de birbirlerine fosfodiester bağları ile bağlıdır. DNA zincirlerinde şeker-fosfat iskeletinin sadece bir yapı görevi vardır ve herhangi bir genetik bilgi içermez. DNA zincirindeki bazlar ise genetik bilginin depolanmasından sorumludur. Bazların sırası ise nükleik asidin birincil (primer) yapısı olarak adlandırılır [1].

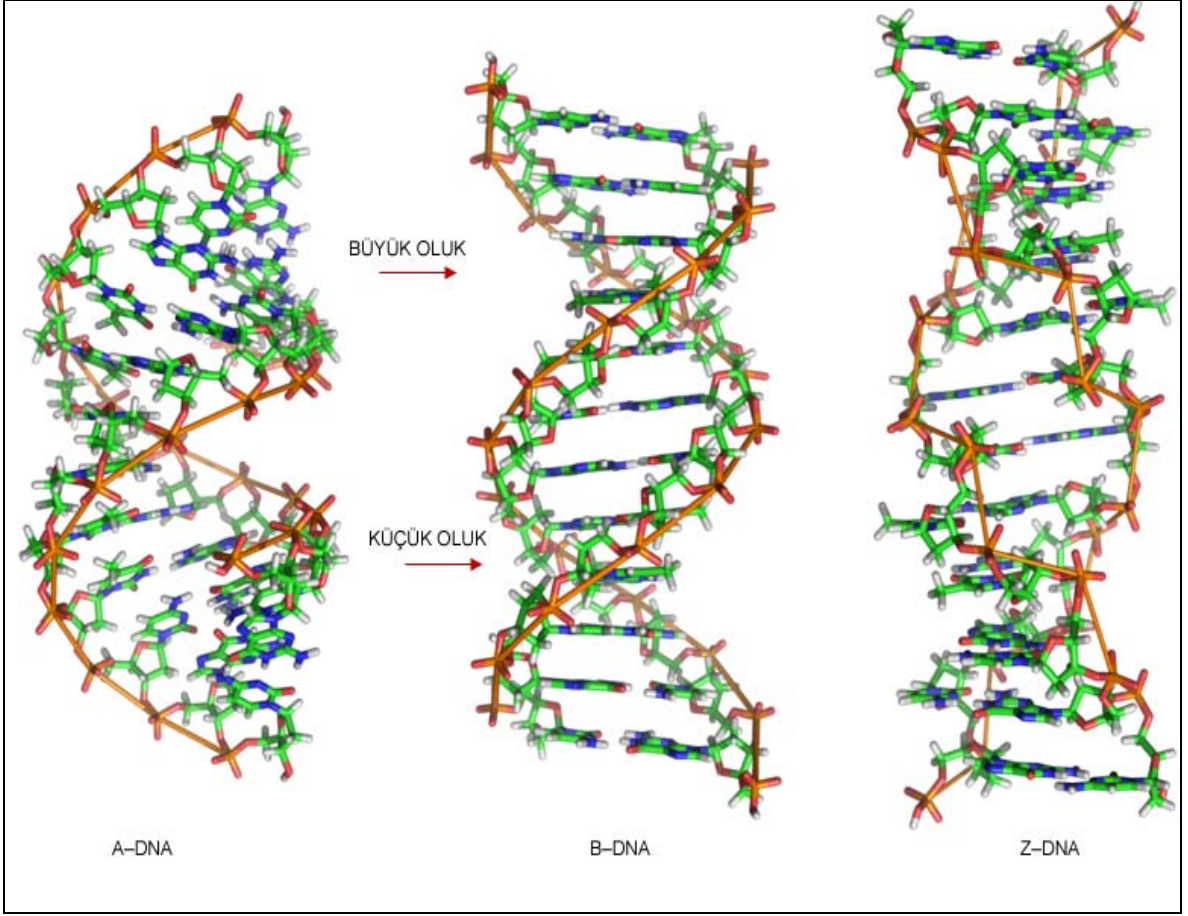
Bütün yapılan çalışmalar sonucu DNA molekülünün bir sarmal olacağı sonucuna varılmış ve purinlerin pirimidinlerle eşleştiği dikkate alınarak bu sarmalın muhtemel yapısı önerilmiştir. Bu yapıda DNA molekülü bir çift sarmal halinde iki oldukça uzun deoksiribonükleotit zincirinden oluşmaktadır (Şekil 3). Bu iki zincirin fosfat-deoksiriboz iskeleti hidrofilik olduğundan sulu ortam ile etkileşecek şekilde çift sarmalın dışında yer alır. Birbirleri ile hidrojen bağları ile eşleşmiş purin/pirimidin bazları ise sarmalın iç kısmında, sarmalın uzun eksenine dik bir düzlem üzerinde ve her bir eşleşmiş baz çifti birbiri üzerine istiflenmiş gibi yer alır. Böyle bir istiflenme ise eşleşmiş bazların kuvvetli van der Waals etkileşimleri yapmalarını sağlar. Ayrıca, sarmalda yer alan iki zincir birbirine göre antiparalel olarak yönlenmişlerdir. Böyle bir konumda her iki zincir çok sayıda purin/pirimidin bazları arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Bütün bu gözlemler ayrıca, lifler halindeki DNA moleküllerinin düzenli bir 3-boyutlu yapıya sahip

olması gerektiğini göstermiştir. Polinükleotitlerdeki baz dizisinin oluşturduğu birincil (primer) yapı ile belirlenmiş bu düzenli katlanmalar ikincil yapı olarak tanımlanır ve bu ikincil yapı bir sarmal olarak ortaya çıkar [1].



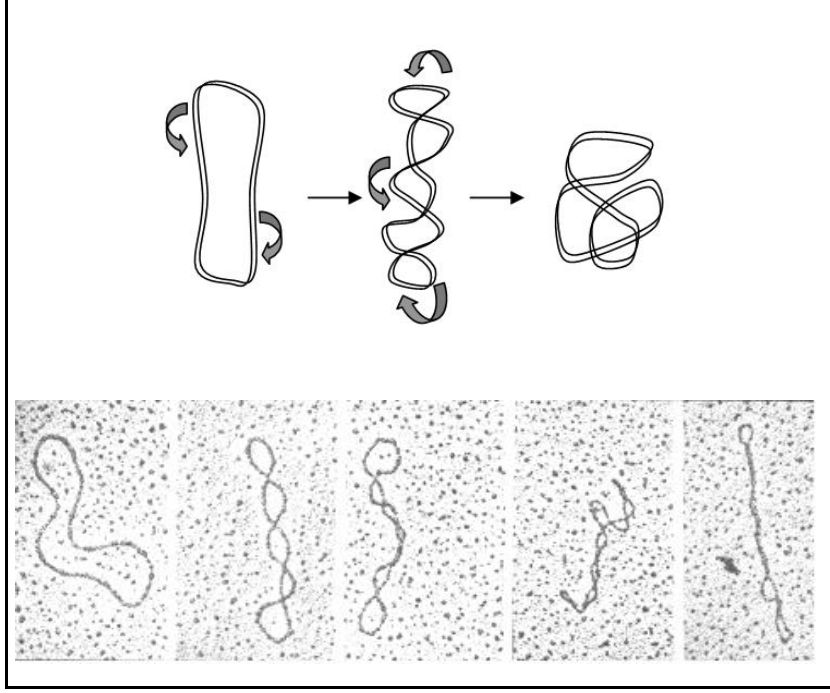
Şekil 3. Bir DNA molekülünün Yapısı [1]

İki zincirli polinükleotid sarmallarının üç farklı konformasyona sahip olabileceği gözlenmiş ve DNA çift sarmalı için bu konformasyonlar; A–DNA, B–DNA ve Z–DNA olarak adlandırılmıştır (Şekil 4). Bu konformasyonlar değişik geometrik özellikleri ile farklılıklar gösterirler ve her üç konformasyondaki sarmalın yüzeyleri de farklıdır. B sarmalında iki farklı oluk (yiv) bulunur ki bunlar büyük oluk ve küçük oluk şeklinde tanımlanırlar. A sarmalında ise bu oluklar ise derinlik açısından birbirine oldukça benzer. Su ortamında B–DNA formu daha baskın olup su molekülleri, bu küçük oluklara yerleşerek hidrojen bağları ile B formunun daha kararlı olmasını sağlar. Su molekülleri uzaklaştırıldığında ise A–formu daha baskın olur. Bu konformasyonlardan farklı olarak Z–DNA sarmalında deoksiriboz halkalarına göre bazların oryantasyonunda farklılıklar vardır. A–DNA ve B–DNA’da bazlar deoksiriboz halkasına göre anti–oryantasyonunda iken Z–DNA’da pirimidinler daima anti– ve purinler ise syn– konumuna sahiptir [1].



Şekil 4. DNA Çift Sarmalının Sahip Olduğu Konformasyonlar [18]

Doğal olarak oluşan çoğu prokaryotik DNA molekülleri çemberimsi bir yapıda bulunur. Dolayısıyla serbest 5'- veya 3'- uçlara sahip değildir. Çemberimsi DNA moleküllerinin bölgesel çift zincirli ikincil yapıların üzerindeki yüksek derecede katlanmalarla oluşturdukları süper sarmal yapılar molekülün üçüncül (tersiyer) yapısı olarak tanımlanır (Şekil 5) [1].



Şekil 5. DNA'nın Süpersarmal Yapısının Oluşturulması [1,19]

1.3. Nükleik Asit-Protein Etkileşimleri ve Nükleolitik Enzimler

Bir hücre içerisinde, transkripsiyon, replikasyon ve rekombinasyon gibi genlerin manipülasyonu ve yönetimine dair çoğu temel olay, nükleik asitler ve proteinlerin arasındaki spesifik etkileşimlere bağlıdır [20].

Nükleik asit molekülleri hücrelerde çok çeşitli türden reaksiyonlara maruz kalırlar. Genellikle bu moleküllerin modifiye edildiği veya modifikasyonunun uzaklaştırıldığı transfer reaksiyonları, polimerizasyon ve depolimerizasyon reaksiyonları, hidroliz reaksiyonları veya yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları gibi işlemlerin pek çoğu çeşitli enzimlerle gerçekleştirilir. Nükleik asitlerle etkileşip özellikle parçalanma reaksiyonlarını katalizleyen en yaygın örnekler nükleazlar, polimerazlar ve topoizomerazlardır [21].

1.3.1. Nükleazlar

Nükleik asitlerin enzimatik yıkımı ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında gözlemlenmiştir. Bu yıkım sürecini gerçekleştiren enzimler nükleazlar olarak adlandırılmıştır [20].

Nükleazlar, DNA zincirinin fosfat grubu ile şeker grupları arasındaki fosfodiester bağlarını kesen makaslar olarak kabul edilebilir. Nükleazların aktif bölgelerinde genellikle asidik ve bazik yan gruplara sahip aminoasitler bulunur. Bu aktif bölge yan grupları, magnezyum, kalsiyum, manganez veya çinko gibi katalitik olarak gerekli olan divalent katyonları bir kofaktör gibi kullanır [11].

Doğadaki enzimatik reaksiyonların çoğu geri dönüşümlüdür. Mikromoleküllerin hem sentezi hem de yıkımı genellikle aynı enzim tarafından gerçekleştirilir. Fakat makromoleküllerin yıkımı ve sentezi bütün biyolojik sistemlerde enzimlerin farklı grupları tarafından gerçekleştirilir. Nükleotidlerin yıkımı sürecinde nükleotidler arasındaki bağları kesen nükleazlar, nükleik asitlerin biyosentezini sağlayacak şekilde nükleotidler arasındaki bağları oluşturmazlar. Onun yerine nükleotidler arası bağlar ya spesifik nükleik asit moleküllerinin sentezi boyunca DNA veya RNA polimerazlar tarafından oluşturulurlar ya da ligaz enzimi tarafından bir araya getirilirler. Ancak bu kurala uymayan istisnalar da mevcuttur. Birkaç DNA polimeraz aynı polipeptidin farklı bölgelerinde nükleaz aktivitesi barındırır. Topoizomerazlar olarak adlandırılan nükleazların bir sınıfının da her iki özelliği birleştirdiği gösterilmiştir. Bu özellik; nükleotidler arası bağları kısa süreliğine hidrolizlemesi ve sonra tekrar birleştirmesidir [12].

Kunitz, 1940 yılında farklı nükleik asit moleküllerinin şeker gruplarına yapılan nükleolitik saldırıları içeren çalışmalara dayanarak nükleazları, ribonükleazlar ve deoksiribonükleazlar olarak iki ana gruba ayırmıştır. Yılan zehiri fosfodiesterazının hem ribonükleotidler hem de deoksiribonükleotidleri hidrolizleyebilmesinden dolayı Kunitz tarafından yapılan sınıflandırma, o zamana kadar geçerli olarak kabul edilmiştir. Bu durum kısmen, nükleik asitte bulunan diğer fosfoester bağlarına saldırabilen, yılan zehiri fosfodiesterazının spesifik olmayan yapısından kaynaklanmaktadır. Hem DNA'ya hem de RNA'ya saldıran yılan zehiri fosfodiesterazının ve mikrokokal (S7 nükleaz veya MNaz) nükleazın keşfi, nükleazların DNaz ve Rnaz olarak sınıflandırılmalarını uygunsuz kılmıştır. Daha sonra, şeker spesifik olmayan nükleazların yeni bir sınıfı, nükleazların listesine eklenmiştir [12].

Nükleazların sınıflandırılmalarındaki zorluklardan dolayı, Bernard ve Laskowski, nükleazların sınıflandırılmaları için bir anlaşma kriteri önermiştir. Bu sınıflandırma; hidrolizlenen substratın doğası (DNA, RNA), nükleolitik saldırının türü (endonükleaz, ekzonükleaz), nükleolitik ürünün doğası (3'- veya 5'- ucu fosfat grupları ile sonlanan mono- veya oligo- nükleotidler) ve hidrolizlenen bağın doğası gibi kriterleri göz önünde

tutmuştur (Tablo 1). Bu, nükleazların sınıflandırılmasındaki birçok problemi ortadan kaldırmıştır ve kendine has bir grupta istisnai özelliklere sahip enzimlerin yerleşmesi için kolay metodlar da sağlamıştır [12].

Tablo 1. Protein nükleazların sınıflandırılması [12]

Şeker Spesifik Nükleazlar		Şeker Spesifik Olmayan Nükleazlar
A. Ribonükleazlar	B. Deoksiribonükleazlar	I. Ekzonükleazlar
I. Ekzoribonükleaz	I. Genel Deoksiribonükleazlar	II. Endonükleazlar
II. Endoribonükleaz	a) Ekzodeoksiribonükleazlar	
	b) Endodeoksiribonükleazlar	
	II. Restriksiyon Endonükleazlar	
	III. Hasar Spesifik Deoksiribonükleazlar	
	IV. Topoizomerazlar	
	V. Rekombinaz	

1.3.2. DNA Polimerazlar

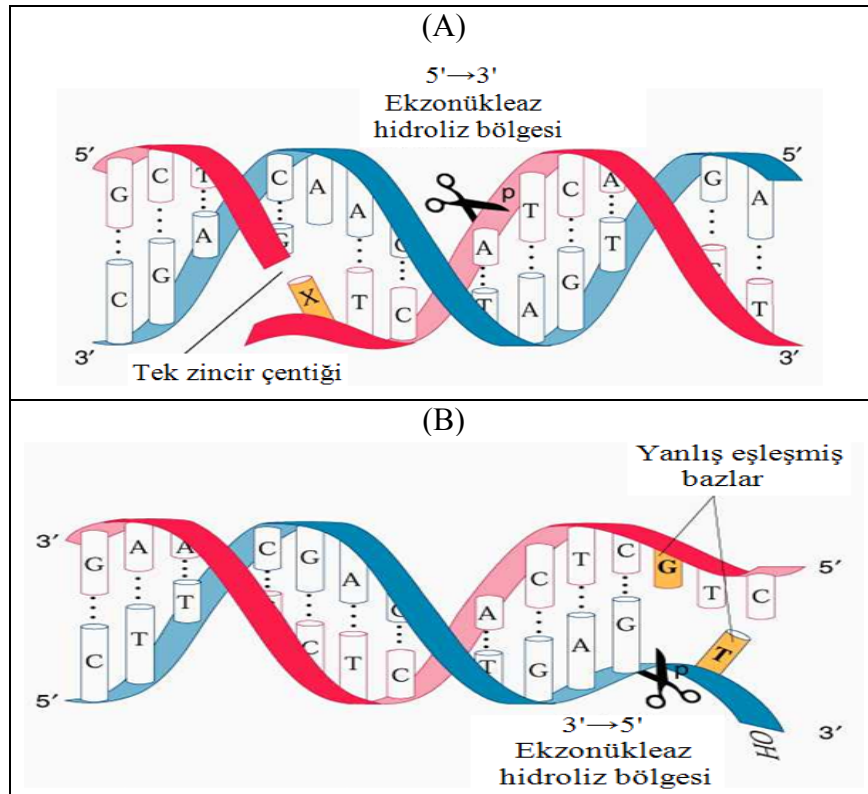
DNA polimerazlar, orijinal DNA molekülünün eksiksiz bir kopyasının üretilmesiyle sonuçlanan kalıp-bağımlı bir süreçte nükleotitlerden deoksiribonükleik asit sentezini yöneten moleküler motorlardır. Bu nedenle bu enzimler yaşayan organizmaların genetik kodunu üretmek ve manipüle etmek için gereklidirler [22,23].

DNA polimerlerini bir kerede bir nükleotid uzatmak için gerçekleşen nükleotidil transferinin kimyası temelde geneldir ve tüm polimerazların DNA sentezi için benzer bir katalitik mekanizmadan yararlandığı görülür. Yine de, DNA polimerazların, sadece farklı organizmalar arasında değil aynı organizma içinde sıra dışı bir farklılığı vardır. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae*'da sekiz farklı DNA polimerazın olduğu keşfedilmiştir. Bu enzimler tek başlarına veya yardımcı faktörlerle çalışırlar. DNA polimerazlar sadece genomik DNA replikasyonu için gerekli değil, DNA hasarının tamiri, DNA rekombinasyonu için olduğu kadar bu süreçlerle hücre devir regülasyonu arasında bir bağ kurmak için de gereklidir [22].

Fonksiyonlarına bağlı olarak DNA polimerazlar, replikatif DNA polimerazlar (DNA replikazlar) ve tamir polimerazları olarak iki gruba ayrılır.

Replikatif DNA polimerazlar, DNA'yı yüksek bir hızda ve yüksek doğrulukla sentezlerler ve hücre bölünmesinde oğul hücrelerin genetik kodun gerçek bir kopyasını almasını sağlarlar. Genelde bu DNA replikazlar verimli DNA replikasyonu için birlikte çalışan çeşitli proteinlerin kompleks makromoleküler topluluklarıdır.

DNA replikazların tersine DNA tamir polimerazları genellikle daha basit bir yapıya sahiptir ve DNA hasarının olduğu bölgelerde DNA sentezi için dizayn edildiği görülür. Tamir polimerazları bu özelliklerini 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi ve 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi ile sağlarlar (Şekil 6). 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi zincirin 3' ucundan başlanıp 5' ucuna doğru nükleotidlerin basamaklı hidrolizini içerir. Ancak enzim çift sarmalın bir parçası olmayan ve 3' ucunda serbest olarak bulunan bir nükleotide ihtiyaç duyar. 5'→3' aktivitesi ise DNA çift sarmalının bir parçası olan ve zincirdeki bir 3'-5' fosfodiester bağının hidrolizini katalizler [21,22].



Şekil 6. (A) DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi
(B) DNA polimerazın 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi [24]

1.3.3. Topoizomerazlar

DNA topoizomerazlar, hücrede DNA'nın konumsal durumunu yöneten harikulade moleküler makinelerdir. Bu enzimler, bu ustalıklarını, DNA'nın bir zincirini karşı zincirdeki bir kırığın içinden geçirerek veya DNA çift sarmalının bir bölgesini DNA'nın çift zincirinde oluşturulan bir boşluktan geçirerek yerine getirir [25].

Topoizomerazların karakterizasyonunun, *Escherichia coli* DNA topoizomeraz I ve *E. Coli* DNA girazın keşfedildiği yıllar olan 1970'lere kadar uzandığı bilinmektedir. Bu tarihten beri topoizomerazların, DNA metabolizmasının hemen hemen tüm durumlarında önemli olduğu gösterilmiştir [26].

Topoizomerazlar tarafından gerçekleştirilen DNA kesimi, proteindeki bir tirozin yan zinciri ve kırık zincirin uçlarının biri arasında geçici bir fosfodiester bağının oluşumuyla gerçekleşir. DNA'yı sadece bir zincirden kesen bu enzimler Tip I olarak adlandırılırlar. Bu enzimleri daha ileri düzeyde sınıflandıracak olursak, 5'-fosfat ucuna bağlanan Topoizomerazlar Tip IA alt ailesi olarak, 3'-fosfat ucuna bağlanan topoizomerazlar Tip IB alt ailesi olarak sınıflandırabilirler. Çakışmayacak derecede düzenlenmiş çift zincir kırığı oluşturmak üzere her iki zinciri kesen topoizomerazlar Tip II alt aileleri olarak birlikte gruplandırılmıştır. Alt ailelerin daha ileri sınıflandırılmaları yapısal nedenlere dayanmaktadır [25].

1.4. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi

Genetik bilginin taşıyıcısı olan DNA, hücre büyümesi ve bölünmesinde ana basamak olan DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna engel olabilme yeteneklerinden dolayı ilaç etkileşimlerinin ana hedefidir [27].

Bazı kanser, viral ve parasitik hastalıklara karşı kemoterapinin ve ilaç geliştirmenin en önemli yollarından biri de nükleik asitlerle geri dönüşümlü olarak etkileşen maddeler bulmayı gerektirir [3]. Çeşitli düşük moleküler ağırlıklı maddelerin DNA ile olan etkileşimleri hücresel döngüde doğal olarak uygun mekanizmalardır ve bu yüzden tıbbî tedavide de kullanılırlar [28].

Adrinamisin gibi doğal ve amsakrin gibi yapay, nükleik asitlerle etkileşebilen antibiyotikler, neoplastik hastalık türlerinin klinik tedavisinde büyük ölçüde kullanılmıştır. Sentetik oligopeptitler ve nükleotitler, yüksek sıra özgünlüğüne sahip potansiyel nükleazlar

ve nükleik asit tanıyan ilaçlar gibi yeni imkânlar sunar. Nükleik asitlerle küçük moleküllerin arasındaki ilişki, nükleik asit bağlanma özgünlüğü, ligand indüklü konformasyonel değişimler, bağlanmadaki kooperativitenin moleküler temelleri, aminoasit yan zincirlerinin nükleik asitlerle olan etkileşimleri ve diğer nükleik asit etkileşimlerinin ve kimyasının kritik özellikleri hakkında bilgi sağlamıştır [3].

Moleküller ve iyonlar çift zincirli DNA ile birbirinden oldukça farklı başlıca 3 yolla etkileşirler [27].

- Genel olarak non–spesifik ve esasen elektrostatik etkileşimler aracılığı ile sarmalın dış yüzeyi boyunca bağlanma
- Nükleik asitlerin oluklarının herhangi birinde baz çiftlerinin köşeleri ile bağlanan molekülün spesifik oluğa bağlanma etkileşimleri
- Baz çiftleri ile düzlemsel veya yaklaşık olarak düzlemsel aromatik halka sistemleri arasındaki interkalasyon etkileşimi [27].

Hem molekülün hem de DNA'nın yapısal özelliklerine bağlı olarak pek çok molekül DNA ile birden fazla etkileşim gösterir [29].

Çeşitli bağlanma şekilleri olmasına rağmen DNA boşluklarında esas olarak interkalasyon ve spesifik bağlanma etkileşimleri olmak üzere iki çeşit bağlanma türü vardır [29].

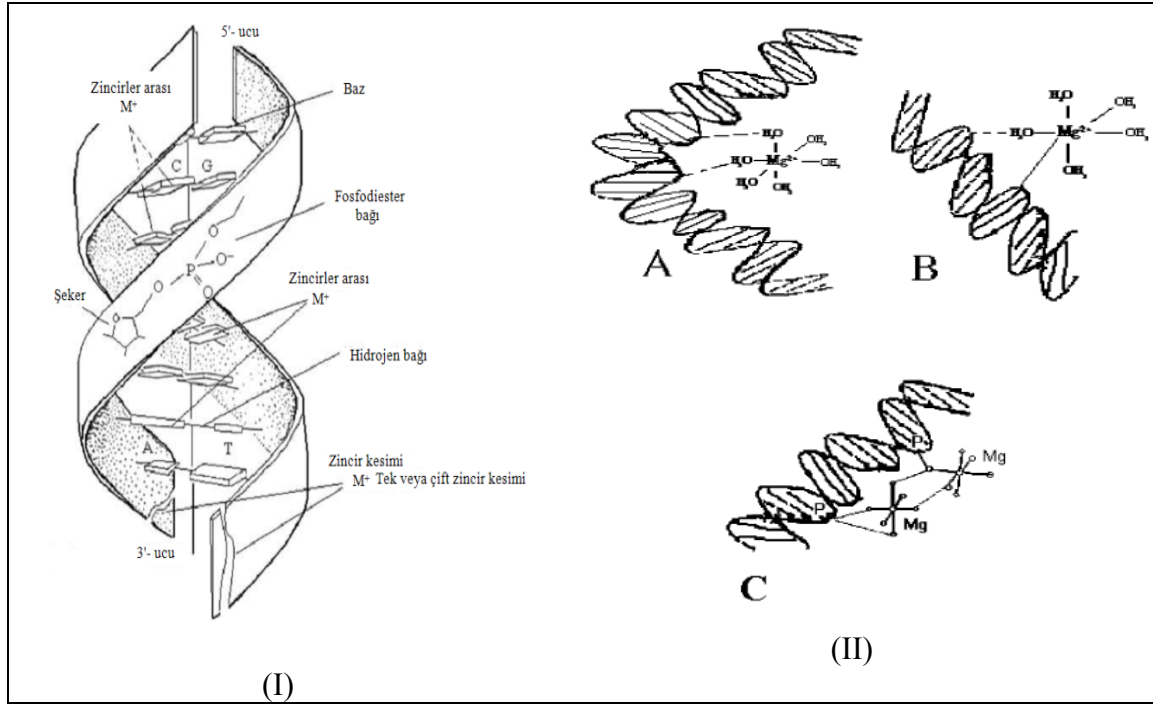
1.4.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler

Nükleik asitler, her fosfatta bir negatif yükün bulunduğu yüksek derecede yüklü poli elektrolitlerdir. Bu nedenle hücre içi ortamda iyonlarla özellikle de katyonlarla kuvvetlice etkileşebilirler [3,30].

Her ne kadar metal iyonlarının DNA'ya bağlanması uzun yıllardır araştırma konusu olmuşsa da bağlanma mekanizması hala bilinmemektedir. Pozitif yüklü metal iyonları yüksek elektron yoğunluğu veya DNA'nın negatif yüklü kalıntıları olarak karakterize edilmiş bölgeleri ile doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşirler [31].

Her iki zincirin omurgasının fosfatları ve bazların N ve O gibi elektron donör atomları gibi bölgeler negatif yükü yüklenmiş olabilir. Hakim olan metal bağlanma modu Guaninin N7 ve O6 ve adeninin N7 ve N1 ve de pirimidinlerin N3 atomları üzerinden gerçekleşir. Metal bağlanmasının muhtemel yolları Şekil 7'de gösterilmiştir. Metal iyonları ya kısmi dehidratize ya da tamamen hidratize olmuş olarak DNA'ya sıkıca bağlanabilirler

ve bu bağlanma doğrudan ya da dolaylı olabilir. Metal iyonları vücutta ya bağlı ya da serbest halde bulunurlar. Vücut sıvılarında serbest halde hegzahidratize şeklinde “serbest”, kovalent bağlarla kompleksler oluşturduğu zamanlarda da “bağlı” olurlar [31].



Şekil 7. (I) DNA'ya Metal Bağlanması Muhtemel Yolları

(II) DNA ile magnezyum iyonunun etkileşimi (A) yalnızca hidrojen bağlarıyla hegzahidratize, (B) hidrojen bağları ve koordine olarak bağlanan pentahidratize, (C) köprülü hegzahidratize ve hidrojen bağı ile bağlı [31]

Geçiş metalleri kısmi olarak dolu d-orbitallerine sahiptir. Böylece serbest radikal oluşturabilirler. Geçiş metalleri ikiden daha fazla bölgesiyle DNA ile etkileşebilirler ve bu etkileşimler çok karmaşıktır. Geçiş metalleri, su moleküllerini kolaylıkla verebilir ve iç küre koordine kompleksler oluşturabilir. Geçiş metalleri genellikle bazlarla doğrudan etkileşirken fosfat gruplarına dolaylı olarak bağlanır [31].

Geçiş metallerinin çoğu pürin bazlarının N7 ile veya pirimidin bazlarının N3 atomu ile kimyasal olarak reaksiyona girerler ve çift sarmalı bozarlar. Geçiş metallerinin G-C bölgelerine mahsus bağlanmaları, H_2O_2 kaynaklı oksidasyonun sebep olduğu radikal oluşumu üzerinden DNA'da hasara sebep olur [31].

Su molekülleri de nükleik asitlerin dış yüzeyi boyunca bağlanır. Su moleküllerinin yüklü fosfat grupları ile spesifik etkileşimleri kadar, bazlardaki polar gruplarla ve

şekerlerle spesifik etkileşimleri de nükleik asit konformasyonlarının kararlılığı için gereklidir. Nükleik asidin spesifik bir bölgesine bir ligandın güçlüce bağlanması ile suyun salıverilmesi, bağlanma serbest enerjisine hem uygun hemde uygun olmayan katkılarda bulunur. Bu katkıların bağıl büyüklüğü, salıverilen su moleküllerinin sayısına ve kompleks oluşumu boyunca kırılan etkileşimlerin türüne bağlıdır [3].

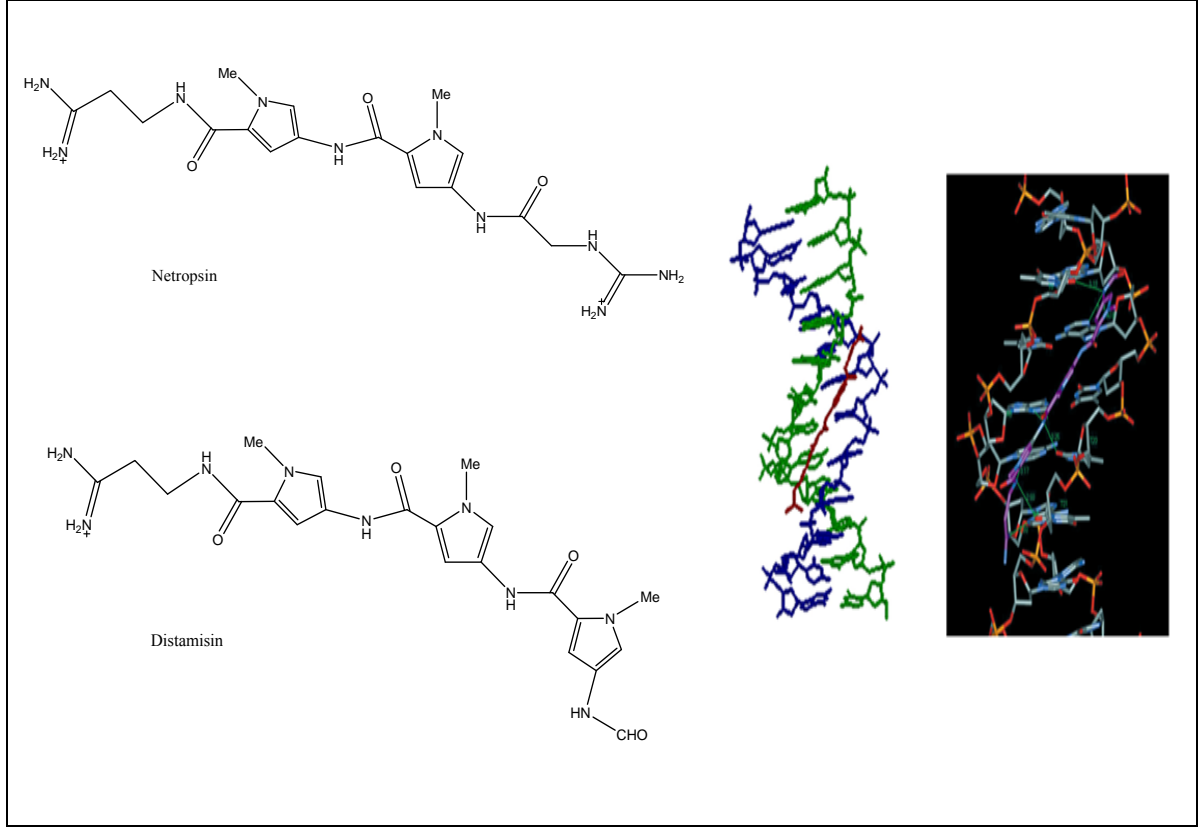
1.4.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri

Oluğa bağlanma etkileşimleri, nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan yüzeydeki fonksiyonel grupları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimi şeklinde gerçekleşir [3].

Oluğa bağlanma hayli güçlü bir bağlanma çeşididir ve bu bağlanma bir molekül, DNA'nın oluklarının birine uygun büyüklük ve şekilde ise gerçekleşir [32].

Oluğa bağlanma, interkalasyonun aksine DNA'da büyük konformasyonel değişimlere yol açmaz ve ligand–makromoleküler bağlanma için standart kilit–anahtar modeline benzer bir model göz önünde tutulabilir. Oluğa bağlanan moleküller genellikle DNA'nın küçük oluğuna bağlanan hilal şeklindeki moleküllerdir (Şekil 8). Molekül içi etkileşimlerle tipik olarak kararlı kılımlar [33].

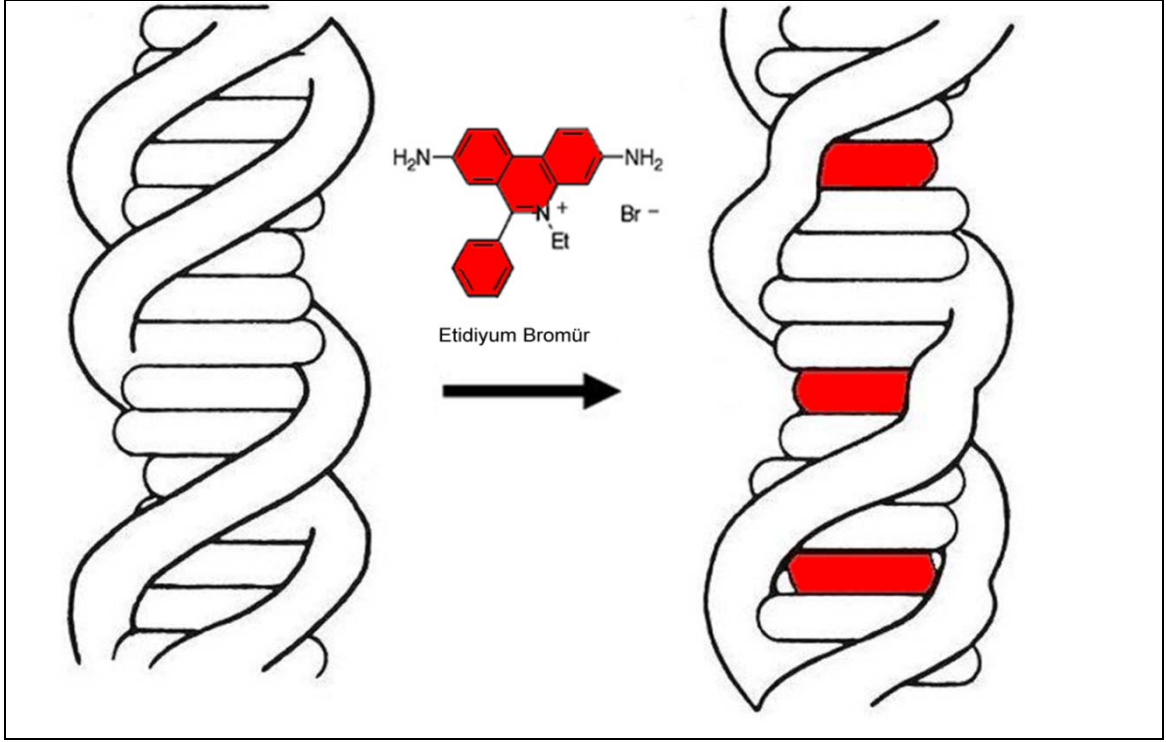
Belirgin bir biçimde, küçük oluğa bağlanan moleküller dönebilme özelliğine sahip bağlarla bağlanmış pirol, furan veya benzen gibi çeşitli aromatik halkalara sahiptirler. Bu durum uygun bir bükülme ile bileşiklerin, suyun oluktan çıkarılmasının ardından küçük oluğun kavisine girebilmesini sağlar. DNA'nın küçük oluğu genel olarak A ve T zengin bölgelerinde, G ve C bölgelerine nazaran daha dardır. Oluğa bağlanan moleküllerin interkalatörlerde olmayan bir yeteneği, bu moleküllerin oluk boyunca baz çiftlerine uyabilmek için genişlediği ve nükleik asitleri çok yüksek derecede sıra özgün tanıyabilme özelliğine sahip olduğudur [3].



Şekil 8. Oluğa bağlanan ajanlar; sırasıyla netropsin ve distamisinin kimyasal yapıları ve oluğa bağlanma şekilleri [29,32]

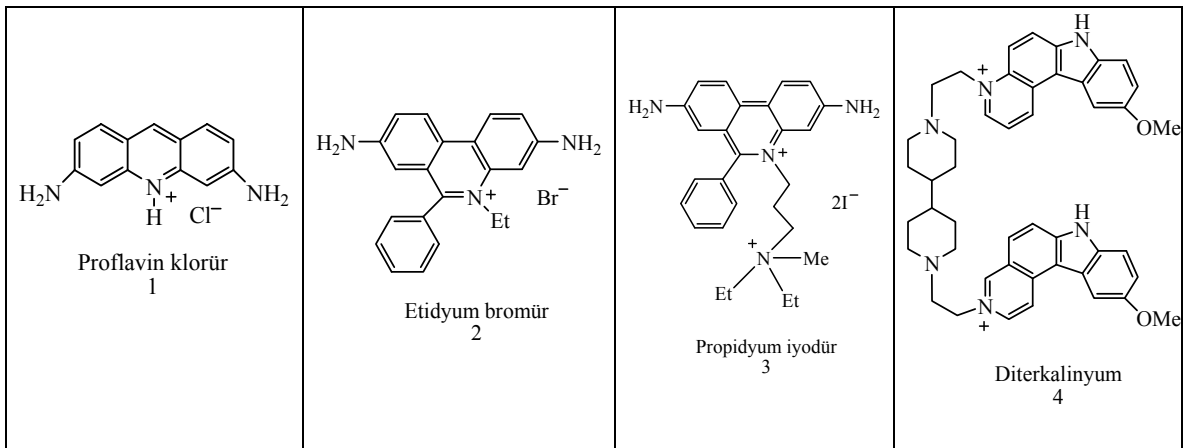
1.4.3. İnterkalasyon Etkileşimleri

1960'ların başlarında Lerman, düzlemsel aromatik katyonlarla DNA'nın etkileşimleri üzerine bir takım çalışmalara rehberlik etti ve kendisinin "interkalasyon" olarak adlandırdığı bir süreçle düzlemsel aromatik moleküllerin DNA'ya dik bir şekilde girerek kovalent bağlar oluşturmaksızın bağlanabileceğini açıkladı [27,34]. İnterkalasyon sürecinde, aromatik bileşiği bazlar arası boşluğa uydurmak için şeker-fosfat bağlarına ait bükülme (torsiyonel) açılarında değişiklikler meydana gelir. DNA omurgasındaki torsiyonel bağların rotasyonunun bir sonucu olarak interkalasyon bölgesinin oluşumu, interkalasyon bölgesindeki helikal dönmenin azalması ve çift sarmalın uzaması ile baz çiftlerinin ayrılmasına neden olur (Şekil 9) [27].



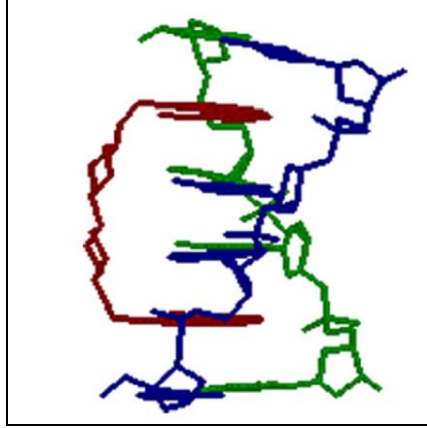
Şekil 9. Etidyum bromürün interkalasyonu [35]

Klasik interkalatörler, yan zincirlerinde ve/veya halka sistemlerinin kendisinde pozitif yükü yüklenmiş yapışık halkalı aromatik moleküllerdir. Tipik örnekleri proflavin klorür içeren akridinyum tuzları (1) ve fenantridinum tuzları, etidyum bromür (2) ve propidyum iyodürdür (3) (Şekil 10) [29].



Şekil 10. İnterkalasyon yapan ajanların temsili kimyasal yapıları [29]

İnterkalasyonun, baz çiftlerinin hidrojen bağlarına engel olmaksızın gerçekleştiği bilinir. DNA, interkalatörlerle doyurulduğu zaman, heliks üzerindeki her bir ikinci interkalasyon bölgesi boş kalır. “En yakın komşuyu hariç tutma” (nearest neighbourhood exclusion) prensibi, çift zincir DNA ile diterkaliniyum (4) kompleksinin interkalasyonu Şekil 11’da gösterilmiştir[29].



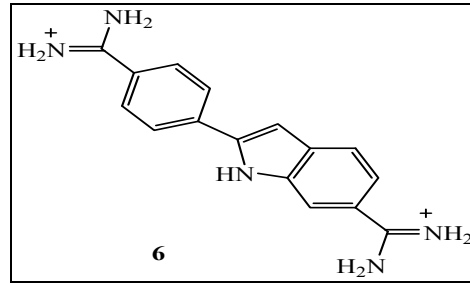
Şekil 11. Bis-interkalatör ilaç diterkalaniyumun kristal yapısının şekli [29]

1 ve 3’ün interkalasyonu küçük olukta gerçekleşirken, 4’un interkalasyonu büyük olukta gerçekleşir.

İnterkalasyonun meydana gelmesi için, baz çiftleri arasına giren düzlemsel ligand için bir kavite oluşturmak üzere DNA baz çifti 3.4 Å ayrılır. B-form DNA’nın normal bir dönüşü 36° dir (10 baz çiftinde 1 tam dönüş sağlar, 360°’nin bir dönüşüne 10 baz çifti). Ligandın oluğa sığdırmak için bu dönmede bir azalma meydana gelir. Örneğin 2’nin fenantrium halka sisteminin girmesi 36°’lik dönüş açısında bir azalmaya sebep olur. Böylece 26°’lik gevşeme açısı yaratılır. Diğer interkalatörler daha küçük gevşeme açısı gerektirebilir [29].

İnterkalasyon yapan kompleksler için bilinen yapısal verilerin zenginliğine rağmen interkalasyon güçlerinin orijini tam olarak anlaşılamamıştır. İnterkalasyonda genel olarak, hidrofobik bir molekülün –interkalatörün–, içinde bulunduğu hidrofilik ortamdan, baz çiftlerinin hidrofobik çevresine –interkalatörün– çekilmesi sonucu gerçekleştiği göz önünde tutulmaktadır. Aromatik interkalatör, bir katyon olduğunda kompleks kararlılığında bir artış gözlenir [29].

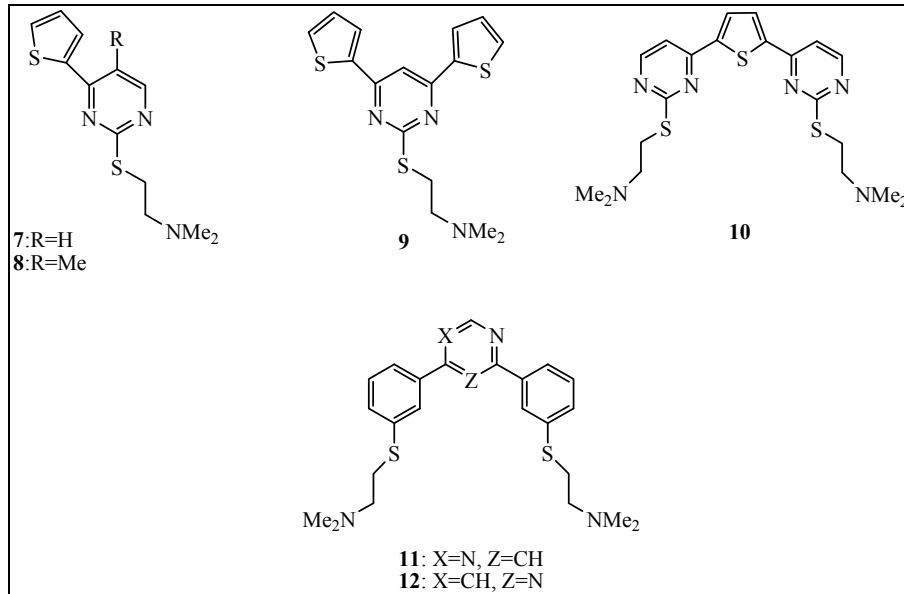
Klasik olmayan interkalasyonda interkalatörler, belirgin bir biçimde protonlanmış N atomları içeren veya halka sistemine bağlı protonlanmış yan zincirlere sahip olan bitişik poliaromatik sistemlerdir. DAPI (4',6–diamidino–2–fenilindol) (6) bileşikleri bu sınıf bir örnektir (Şekil 12). DAPI'nin bağlanma şeklinin DNA sıra bağımlı olduğu bulunmuştur. DAPI, küçük oluk bölgesinde üç ya da daha fazla ardışık AT baz çiftlerine çok kuvvetlice bağlanır. Bununla birlikte daha az ardışık AT baz çifti varsa veya özellikle saf GC bölgeleri mevcutsa bu defa, DAPI interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlanır [29].



Şekil 12. DAPI'nin kimyasal yapısı [29]

Yapılarına bağlı olarak katyonik ayrık poliaromatik bileşikler tercihen ya oluğa bağlanma ile ya da interkalasyon ile DNA'ya bağlanırlar.

Pirimidin türevleri (7–12) klasik olmayan interkalatörlerin örnekleridir (Şekil 13).



Şekil 13. Klasik olmayan interkalatörlerin kimyasal yapıları [29]

Özellikle 7 ve 8'nin her ikisi DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanır [29].

1.5. İnterkalatörlerin Yapılarının ve DNA ile Etkileşimlerinin Teorik İncelenmesi

İnterkalasyon sürecinin ve DNA–interkalatör komplekslerinin moleküler özelliklerinin hesaplanmasında teorik metodlar önemli ölçüde kullanılmaktadır.

İnterkalatör bileşiklerin geometrilerinin, elektron yapılarının, konformasyonlarının ve DNA ile interkalasyon mekanizması ile oluşturdukları moleküler komplekslerin yapı ve kararlılığının kuantum kimyasal incelemeleri önemli araştırma konularıdır. Bu araştırmalar yüksek antitümör özelliklere sahip yeni bileşiklerin sentezinin maksada uygun bir şekilde gerçekleştirilmesi ve onların biyolojik etkisinin moleküler kökeninin anlaşılması için ayrı bir öneme sahiptir [36,37,38].

1.6. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Bu çalışma, yeni oksim tipi ligandların çeşitli Cu ve Ni komplekslerinin DNA ile etkileşimlerini incelemeyi amaçlamıştır.

Bu çalışma kapsamında;

- Cu ve Ni komplekslerinin oksidatif şartlar altında DNA'yı parçalayabilme yeteneklerinin olup olmadığı,
- Kompleks–DNA etkileşimlerinin; metal iyonuna, zamana, çeşitli ortam şartlarına ve kompleks konsantrasyonuna bağımlı olup olmadığı,
- Kompleks–DNA etkileşiminin özgün olup olmadığı, incelenmiştir.

Ayrıca kompleks–DNA etkileşiminin aydınlatılabilmesi için teorik moleküler modelleme çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma, ilerleyen zamanlarda bu komplekslerin DNA ile etkileşebilen birer anti–kanserojen ilaçlar olması yolunda atılan ilk adımdır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Cihazlar

Gece kültürlerinin büyütülmesinde Memmert Sv-1422 çalkalayıcı ve sabit sıcaklıklı su banyosu kullanıldı. İnkübasyon işlemleri, Nüve EN 400 kuru havalı inkübatör kullanılarak gerçekleştirildi. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında pH ölçümleri için WTW inoLab 720 model pH metre kullanıldı. Çözeltilerin karıştırılmasında, Velp RX model vorteks kullanıldı. Tartım işlemlerinin yapılmasında, Gec Avery VA/WA analitik terazi kullanıldı. Plazmid DNA izolasyonunda, çöktürme işlemleri Sigma 1-14 model mikrosantifürüjde yapıldı. Agaroz jellerin hazırlanmasında, Regal RDD-17 mikrodalga fırın kullanıldı. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyonları, Ati Unicam UV2-100 model çift ışın yollu ve hücre kalınlığı 10 mm kuvarz hücreli ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü.

Elektroforez işlemleri, Owl B1A model elektroforez cihazında Mevag IP-17 model güç kaynağı kullanılarak gerçekleştirildi. Agaroz jellerin görüntülerinin alınmasında Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanıldı.

Pipetleme işlemleri, Socorex Acura 825 model 0,5-2 µL, 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL hacimlerindeki pipetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sterilizasyon işlemleri için Tomy SS-325 model otoklav kullanılmıştır.

Moleküler modelleme çalışmalarında Hyperchem programı kullanılmıştır. Moleküllerin optimizasyonu Bio+Charm yöntemi ile yapılmıştır.

2.2. Kimyasal Maddeler

Merck A.G. (Darmstadt, Germany)'den sodyum hidroksit, sodyum klorür, potasyumdihidrojen fosfat ve bromfenol mavisi temin edildi.

Fluka Chemie (Steinheim, Germany)'den magnezyummonoperoksifalat, nikel (II) perklorat hegzahidrat ve dimetil formamid temin edildi.

Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'den etidyum bromür, gliserin, β-merkaptan etanol, etilendiamin tetra asetik asit, Trizma baz ve ksilen siyanol temin edildi.

Sigma–Aldrich Chemie (Steinheim, Germany)’den bakır (II) perklorat hegzahidrat temin edildi.

Lab. M. (Lancashire, UK)’dan tripton ve maya ekstrağı temin edildi.

J. T. Baker (Dewenter, Holland)’dan dipotasyum hidrojen fosfat temin edildi.

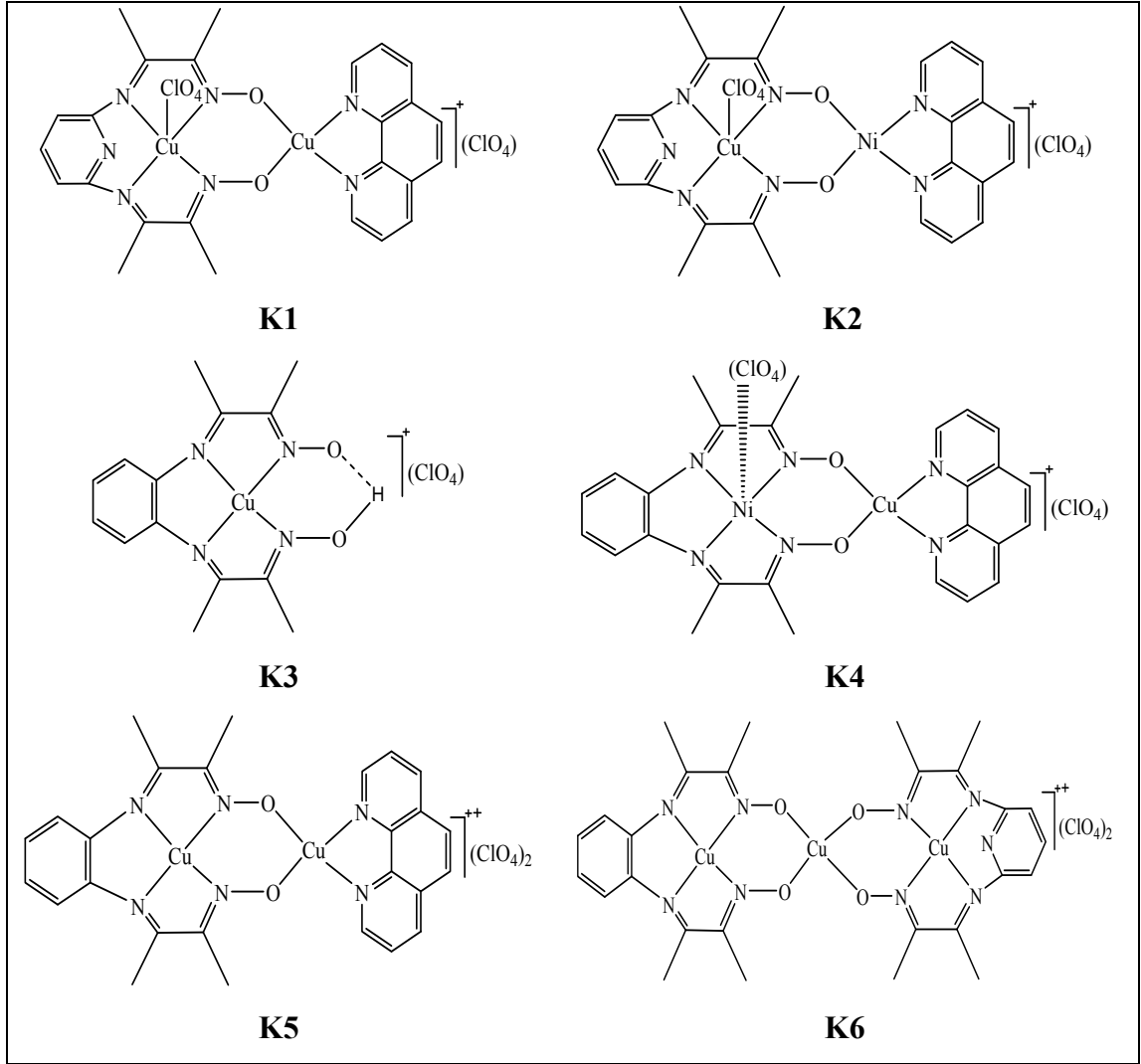
Lab. Kim. Perpa (Okmaydanı, İstanbul)’dan glasiyal asetik asit temin edildi.

pUC18 plazmid izolasyonunda Promega Corporation Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification Systems (Medison, USA) kiti kullanıldı.

2.3. Model Suş ve Bileşikler

In vitro çalışmalarda kullanılan *Eschericha coli* JM 101 suşu New England Biolabs’dan temin edildi. Bu suşun genotip özellikleri; F’ traD36 lac^q Δ (lacz) M15 pro A⁺B⁺/supE thi Δ (lac–proAB) (BIOLABS) şeklindedir. pUC18 plazmid DNA’sı Promega Corp. Medison USA’dan temin edildi.

In vitro çalışmalarda kullanılan nükleaz mimiğı olabilecek, (2E,3E)–3–[(6–{[(1E,2E)–2–(hidroksiimino)–1–metilpropiliden]amino}piridin–2–il)imino]bütan–2–on oksim ligandının bakır ve/veya nikel içeren homo dinükleer bakır (II) K1, hetero dinükleer bakır (II)–nikel (II) K2, ve 2–(hidroksiimino)–1–metilpropilidenaminofeniliminobütan–2–on oksim ligandının bakır ve/veya nikel içeren mononükleer bakır (II) K3, hetero dinükleer nikel (II)–bakır (II) K4, homo dinükleer bakır (II) K5, homo trinükleer bakır (II) K6 kompleksleri (Şekil 14), Prof. Dr. Serdar KARABÖCEK’in (K.T.Ü., Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü) çalışma grubu tarafından sentez edilmiştir [39,40].



Şekil 14. K1–K6 komplekslerinin kimyasal yapıları [39,40]

2.4. Luria–Bertani (LB) Besiyerinin Hazırlanması

1 L’de 10 g tripton, 5 g maya ekstrağı ve 5 g sodyum klorür içeren besiyerinin pH değeri sodyum hidroksit ile pH 7.5’e ayarlandı ve otoklavda 121 °C’de 1.1 atm basınç altında 15 dakika bekletilip steril edildi.

2.5. Gece Kültürlerinin Hazırlanması

pUC18 plazmidini içeren E.coli JM 101 suşu 5µg/mL oranında amfisilin içeren LB besiyerinin 3 mL’sine ekildi ve 37 °C’de 200 rpm’de çalkalayıcılı su banyosunda bir gece büyütüldü.

2.6. Çözeltilerin Hazırlanması

2.6.1. Elektroforetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Farklı pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0, 7.5) 250 mM potasyum fosfat tamponları şöyle hazırlandı; 43.5 g K_2HPO_4 1 L saf suda çözünerek dibazik fosfat çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 34 g KH_2PO_4 1 L saf suda çözünerek hazırlanan monobazik fosfat çözeltisiyle ayrı ayrı pH 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5 oluncaya kadar dibazik fosfat çözeltisi titre edildi.

Farklı pH'larda (pH 8.0, 8.5, 9.0, 10.0) 100 mM Tris–asetat tamponlarını hazırlamak için, 1 L saf suda 12.11 g trizma–bazın çözünmesi ile hazırlanan çözelti 1 L'de yaklaşık 5.7 mL glasiyal asetik asit içeren çözelti ile yukarıda belirtilen pH'lara ulaşıncaya kadar ayrı ayrı titre edildi.

Tris–asetik asit–EDTA (TAE) tamponu, 242 g trizma–baz, 57.1 mL glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)'nın saf su ile 1 L'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu çözelti daha sonra 1/50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

10 mM MMPP çözeltisi, 10 mL saf suda yaklaşık 0.05 g magnezyum mono peroksifitalatın çözünmesi ile hazırlandı. Yürütme boyası, %0.25 oranında bromofenolmavisi, %25 oranında ksilen siyanol ve %30 oranında gliserolün saf su içinde çözünmesi ile hazırlandı.

Sonlandırma çözeltisi, 1 M β –merkaptetanolden 10 μ L, %80'lik gliserolden 250 μ L, 0.5 M EDTA çözeltisinden (pH 8.0) 50 μ L ve yürütme boyasından 80 μ L alınıp saf su ile 1000 μ L'ye tamamlanarak hazırlandı.

Elektroforetik deneylerde kontrol olarak kullanılan bakır ve nikel tuzlarının saf sudaki çözeltileri şöyle hazırlandı. 100 mM bakır perklorat çözeltisi, yaklaşık 0.3700 g $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 'nun saf suda çözünüp, 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. 100 mM nikel perklorat çözeltisi, yaklaşık 0.3650 g $Ni_2(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 'nun saf suda çözünüp, 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Daha sonraki seyreltme işlemleri bu stoklar kullanılarak yapıldı.

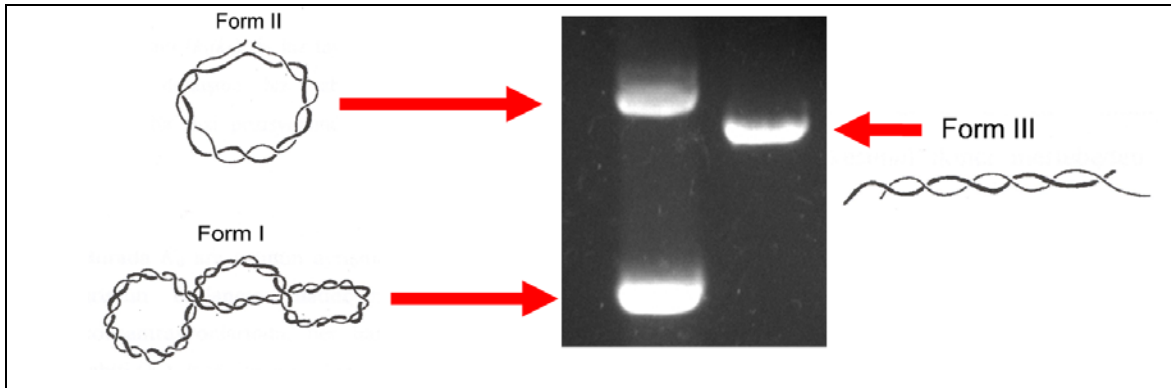
Elektroforetik çalışmalar için komplekslerin stok çözeltileri aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Komplekslerin 50 mM stok çözeltileri; K1'den 9.7 mg, K2'den 9.6 mg, K3'den 6.7 mg, K4'den 9.6 mg, K5'den 9.7 mg ve K6'dan 11.6 mg tartılıp, 250 μ L DMF'de çözünmeleri ile hazırlandı. Bütün seyreltme işlemleri bu stoklar kullanılarak yapıldı.

Elektroforetik çalışmalarda %1'lik nötral agaroz jeller kullanıldı ve bu jeller aşağıdaki gibi hazırlandı. 0.3 g agaroz tartılıp 30 mL TAE tamponu içine aktarıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 1 dakika kaynatıldı. Karışım 50–60 °C'ye kadar soğutulup içine 3 µL etidyum bromür çözeltisi ilave edilip elektroforez cihazının jel kabına dökülerek hazırlandı.

2.7. Nükleolitik Aktivite Deneyleri

2.7.1. Agaroz jel Elektroforezi ile Komplekslerin Nükleaz Etkinliklerinin İncelenmesi

Komplekslerin nükleaz aktiviteleri, agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edildi. Komplekslerin kesim etkinliği, süpersarmal DNA'yı (Form I), kırık form (Form II) ve lineer form (Form III) DNA'ya dönüştürme yetenekleri belirlenerek tespit edildi. Plazmid DNA, elektroforeze tabi tutulduğunda, bozulmamış süpersarmal form (Form I) için nispeten hızlı göç etme eğilimi gözlenecektir. Eğer DNA'nın bir zincirinde bir kesim meydana gelirse, süpersarmal form, daha yavaş hareket eden açık halkasal form (Form II) üretmek üzere gevşeyecektir. Eğer iki zincirde kesilirse Form I ve Form II arasında göç eden bir lineer form (Form III) üretilecektir [16,41,42] (Şekil 15).



Şekil 15. Sirküler DNA Formları ve agaroz jeldeki görüntüleri [21]

K1–K6 komplekslerinin farklı konsantrasyonlarda (0.1–1000 µM), sabit sıcaklıkta (37 °C), farklı pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0) ve farklı zaman aralıklarında (10–60 dakika) nükleaz etkinlikleri araştırıldı. Bu araştırma, reaksiyon karışımında bileşenlerin uygun nihai konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde, stok

kompleks çözeltilerinin 1 µL'sini, tampon çözeltilerin 2 µL'sini, ön yükseltgeyici (MMPP)'nin 1 µL'sini ve konsantrasyonu belirli plazmid DNA'nın 6 µL'sini içeren ve son hacmi 10 µL olan reaksiyon karışımlarında gerçekleştirildi.

Belirli konsantrasyon, pH ve reaksiyon peryotları için yapılan nükleaz aktivitesi deneylerinde reaksiyon süresi sonunda, reaksiyonu sonlandırmak için sonlandırma çözeltilisinden 5 µL ilave edildi. Sonlandırılan reaksiyon karışımları ve kontroller %1'lik nötral agaroz jellere yüklendi ve yaklaşık 30 dakika 100 Voltluk bir gerilim uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jellerin görüntüleri Kodak Gel Logic 200 Imaging System ile alındı.

2.7.2. Nükleaz Etkinliği Gösteren Kompleksler İçin Uygun Şartların Belirlenmesi

2.7.2.1. Kompleks Konsantrasyonlarının Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi

Bunun için K1–K6 komplekslerinin, pH 7.0'da, 37 °C'de ve 1 saatlik inkübasyon zamanında 0.1–1000 µM'lık konsantrasyon aralığında nükleolitik etkinlikleri incelendi. Her bir kompleksten 10 µL'lik final reaksiyon karışımına eşit miktarlarda (1 µL) kompleks çözeltisi katıp, 0.1–1000 µM aralığında nihai kompleks konsantrasyonunu sağlayabilmek için, ara stok çözeltiler hazırlandı ve reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında bu çözeltiler kullanıldı. Üzerine nihai konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde pH 7.0'daki 250 mM'lık potasyum fosfat tamponundan 2 µL, nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltilisinden 1 µL ve konsantrasyonu bilinen pUC18 plazmid DNA'sından 6 µL ilave edilip 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her bir reaksiyon karışımına 5 µL sonlandırma çözeltisi ilave edildi. Daha sonra reaksiyon karışımları %1'lik nötral agaroz jelinin kuyularına yüklendi. Kontrol olarak, iki ayrı kuyuya, içinde yürütme boyası bulunan pUC18 plazmid DNA'sı ve BamHI restriksiyon enzimi ile kesilen pUC18 plazmid DNA'sı yüklenmiştir. Jellere, yaklaşık 30 dakika 100 Voltluk bir gerilim uygulandı ve sonuçlar UV lambası altında gözlemlenip, jellerin görüntüleri alındı.

2.7.2.2. İnkübasyon Zamanının Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi

K1–K6 komplekslerinin pUC18 plazmid DNA'sını kestiği uygun konsantrasyonlar kullanılarak belirli pH ve sıcaklık değerinde farklı inkübasyon zamanlarındaki nükleolitik

aktiviteleri incelendi. K1, K2, K4, K5 ve K6 kompleksleri için nihai konsantrasyonu 10 μM , K3 kompleksi için ise nihai konsantrasyonu 25 μM olacak şekilde uygun reaksiyon karışımları hazırlandı. Reaksiyon karışımları nihai konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde 250 μM 'lık pH değeri 7.0 olan potasyum fosfat tamponundan 2 μL , nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltisinden 1 μL ve konsantrasyonu bilinen pUC18 plazmid DNA'sından 6 μL ilave edildikten sonra bu reaksiyon karışımları 37 °C'de 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalık zaman aralıklarında inkübasyona bırakıldı. Bu sürelerin sonunda her bir reaksiyon karışımına 5 μL sonlandırma çözeltisi ilave edildi. Daha sonra reaksiyon karışımları %1'lik nötral agaroz jelinin kuyularına yüklendi. Kontrol olarak iki ayrı kuyuya içinde yürütme boyası bulunan pUC18 plazmid DNA'sı ve BamHI restriksiyon enzimi ile kesilen pUC18 plazmid DNA'sı yüklenmiştir. Jellere yaklaşık 30 dakika 100 Voltluk bir gerilim uygulandı ve sonuçlar UV lambası altında gözlemlenip, jellerin görüntüleri alındı.

2.7.2.3. Reaksiyon Karışımının pH Değerinin Nükleaz Etkinliği Üzerine Etkisi

K1–K6 komplekslerinin pUC18 plazmid DNA'sını kestiği uygun konsantrasyonlarda, 37 °C'de ve 1 saatlik inkübasyon süresindeki nükleaz aktiviteleri farklı pH değerlerinde incelendi. K1, K2, K4, K5 ve K6 kompleksleri için nihai konsantrasyonu 10 μM ve K3 kompleksi için ise nihai konsantrasyonu 25 μM olacak şekilde uygun reaksiyon karışımları hazırlandı. Reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltisinden 1 μL , farklı pH değerlerini sağlamak amacıyla pH değeri 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5 olan 250 μM 'lık potasyum fosfat tamponlarından nihai konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde 2 μL , pH değeri 8.0, 8.5, 9.0 ve 10 olan 100 μM 'lık tris–asetat tamponlarından nihai konsantrasyonları 20 μM olacak şekilde 2 μL ve konsantrasyonu bilinen pUC18 plazmid DNA'sından 6 μL ilave edildi. Bu reaksiyon karışımları 37°'de 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir reaksiyon karışımına 5 μL sonlandırma çözeltisi ilave edildi. Daha sonra örnekler %1'lik nötral agaroz jelinin kuyularına yüklendi. Kontrol olarak iki ayrı kuyuya içinde yürütme boyası bulunan pUC18 plazmid DNA'sı ve BamHI restriksiyon enzimi ile kesilen pUC18 plazmid DNA'sı yüklenmiştir. Jellere yaklaşık 30 dakika 100 Voltluk bir gerilim uygulandı ve sonuçlar UV lambası altında gözlemlenip, jellerin görüntüleri alındı.

2.8. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Kuantum kimyasının metodlarının yardımı ile moleküler sistemlerin yük ve elektron yoğunluğunun dağılımını, moleküllerin elektrostatik potansiyelini, HOMO ve LUMO orbitallerinde elektron dağılımını hesaplamak ve onların bilgisayar grafiklerinin çizilerek bilgisayar ekranında görüntülemek mümkündür. Aynı zamanda DNA'nın büyük yada küçük oluğunda interkalatörlerin oryantasyonlarının ve etkileşimlerinin modelleri çizilebilir. Son zamanlarda, interkalatörlerin bağlanma sabitleri, bölge seçiciliği, molekül içi enerjileri, konformasyonel değişikliklerin ve molekül içi ligand–poli nükleotid etkileşim enerjileri özel algoritmaların yardımı ile hesaplanmaktadır [36,37,38].

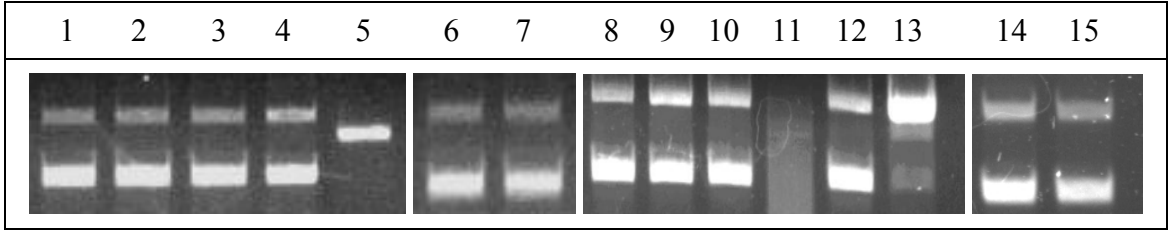
Moleküler modelleme çalışmaları, sentez edilen komplekslerin, NMR, IR ve UV-Vis spektroskopisi yöntemleriyle ortaya konulan geometrik yapısı dikkate alınarak, BIO+CHARM yöntemi ile HYPERCHEM programında yapılmıştır.

3. BULGULAR

In vitro çalışmalarda kullanılan nükleaz mimiği olabilecek (2E,3E)-3-[(6-[(1E,2E)-2-(hidroksiimino)-1-metilpropiliden]amino}piridin-2-il)imino]bütan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya nikel içeren, homo dinükleer bakır (II) K1, hetero dinükleer bakır (II)-nikel (II) K2 kompleksleri ile 2-(hidroksiimino)-1-metilpropilidenaminofenilimino bütan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya nikel içeren, mononükleer bakır (II) K3, hetero dinükleer nikel (II)-bakır (II) K4, homo dinükleer bakır (II) K5, homo trinükleer bakır (II) K6 komplekslerinin (Şekil 14) DNA ile olabilecek etkileşimleri, bir kooksidan olan magnezyummonoperoksifalat (MMPP) yokluğunda ve varlığında, pUC18 (2686 bp) plazmidinin süpersarmal formu kullanılarak gerçekleştirildi. Çeşitli kontrol deneyleri ile MMPP'nin, serbest ligandların, dimetil formamidin (DMF) (komplekslerin stok çözeltilerini hazırlanmasında çözücü olarak kullanılmıştır) ve perklorat metal tuzlarının (çalışılan tüm kompleksler perklorat tuzları halinde olduğundan dolayı) DNA'yı kesip kesmedikleri araştırılmıştır. Buna göre, MMPP, serbest ligandların ve DMF'nin DNA üzerinde yapısal bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. Perklorat tuzlarının 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda (kompleksler DNA'yı daha düşük konsantrasyonlarda kesebiliyorken) DNA'yı kestiği gözlemlenmiştir.

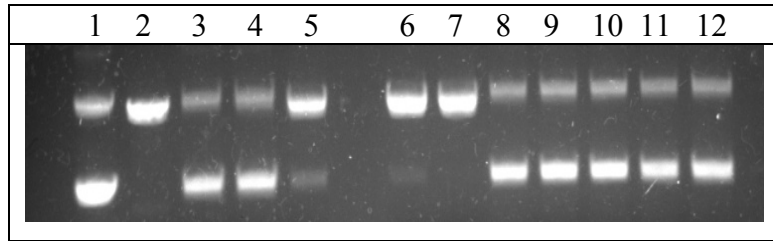
3.1. Agaroz Jel Elektrofrezisi Çalışmaları

Kompleks-DNA etkileşiminin varlığını ortaya koymak için çeşitli kontrol deneyleri yapıldı. Kontrol deneylerinde, DNA, kooksidan olan magnezyummonoperoksifalat (MMPP), ligand ve komplekslerde mevcut olan metallerin tuzlarının çözeltileri ile muamele edildi ve süpersarmal DNA'nın bağıl oranlarında değişmeye sebep olup olmadığı kontrol edildi. MMPP varlığında ve kompleks yokluğunda, DNA üzerinde herhangi bir elektrofretik değişim gözlenmedi. Komplekslerin DNA üzerinde değişim yaptıkları konsantrasyon değerlerinde bakır (II) klorat (T1) ve nikel (II) kloratın (T2) bir değişime sebep olmadığı gözlemlendi.



Şekil 16. Kontrol deneyleri. 1, DNA–ligand I; 2, DNA–ligand I+MMPP; 3, DNA–MMPP; 4, DNA; 5, DNA–BamHI; 6, DNA–ligand II; 7, DNA–ligand II+MMPP; 8, DNA–MMPP; 9, DNA+40 mM T1+40 mM T2; 10, DNA+40 mM T1; 11, DNA+40 mM T1+MMPP; 12, DNA+40 mM T2; 13, DNA+40 mM T2+MMPP; 14, DNA+DMF; 15, DNA+DMF+MMPP

Ligand I ve ligand II, MMPP varlığında ve yokluğunda DNA ile bir etkileşim göstermemiştir. Çözücü olarak kullanılan DMF'nin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA üzerinde elektroforetik bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda metal tuzları MMPP'siz ortamda bir nükleolitik aktivite gösterememişlerken, MMPP'li ortamda aktivite göstermişlerdir (Şekil 16). Bundan dolayı MMPP'li ortamda metal tuzlarının hangi konsantrasyon aralığında aktivite gösterdiğini anlamak için tekrar bir kontrol deneyi yapılmıştır.



Şekil 17. T1 ve T2 nin MMPP'li ortamda DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA; 2, DNA–BamHI; 3, 10 µM T1; 4, 25 µM T1; 5, 50 µM T1; 6, 75 µM T1; 7, 100 µM T1; 8, 10 µM T2; 9, 25 µM T2; 10, 50 µM T2; 11, 75 µM T2; 12, 100 µM T2

Şekil 17'dan görüldüğü üzere 1 saatlik reaksiyon süresinde T2'nin 100 µM konsantrasyona kadar DNA üzerinde hiçbir elektroforetik değişime sebep olmadığı görülmektedir. T1'in ise 50 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda süpersarmal DNA'yı tamamen form II ve form III e dönüştürdüğü görülmektedir.

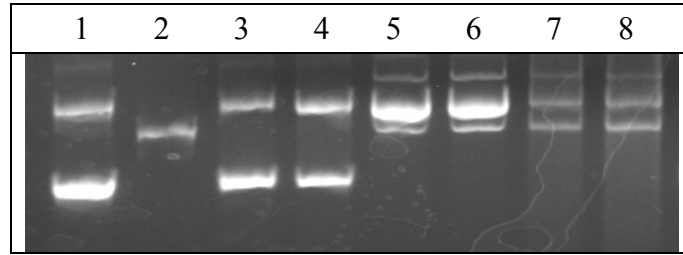
3.2. Komplekslerin Nükleolitik Aktivitelerinin İncelenmesi

3.2.1. K1'in Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.1.1. K1–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyonuna Bağımlılığı

K1 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 0.1–1000 μM konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 18'de, 125 ng/ μL DNA ile K1'in, 37 °C'de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH değeri 7.0'daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 18. K1 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0.1 μM K1; 4, 1 μM K2; 5, 10 μM K1; 6, 100 μM K1; 7, 500 μM K1; 8, 1000 μM K1

Şekil 18'de, MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince, K1'in 10 μM konsantrasyonda DNA'yı tamamen Form II ve Form III'e dönüştürdüğü görülmektedir. Ayrıca bu konsantrasyonda K1 kompleksinin DNA'yı, Form III ve Form II dışında Form II'den daha küçük DNA parçacıklarına dönüştürdüğü elektroforetik olarak gözlemlenmiştir. 500 μM ve 1000 μM gibi yüksek konsantrasyonlarda ise K1'in çözünürlük problemi göstermesi sebebiyle (kompleks bu konsantrasyonlarda çöktüğü için yükleme kuyusunda kaldığından dolayı) DNA'nın yapısal bir değişime maruz kalıp kalmadığı anlaşılamamaktadır.

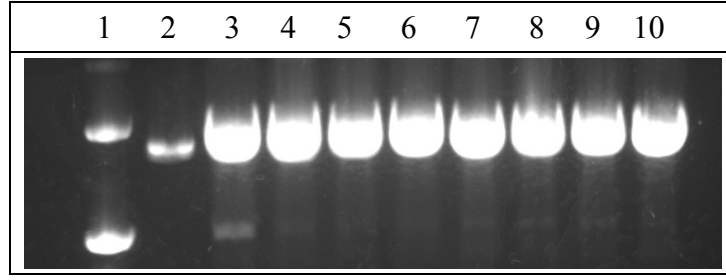
Yapılan kontrol deneyinde, T1'in yalnızca 50 μM ve üzeri konsantrasyon değerlerinde etkin bir nükleolitik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Böylelikle 10 μM

K1 konsantrasyonunda görülen yapısal değişimlerden kompleksin tamamen kendisinin sorumlu olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

3.2.1.2. K1–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K1 kompleksinin DNA ile etkileştiği en uygun konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği optimum pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 19’da, 250 ng/μL DNA ile K1’in (10 μM konsantrasyonda), 37 °C’de ve değişik pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon sürecinde gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 19. 10 μM K1 kompleksi ve MMPP varlığında DNA’nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH’ının etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0

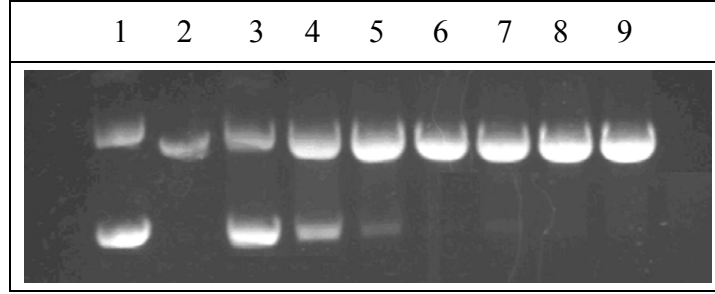
Şekil 19’da görüldüğü gibi, 10 μM K1 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA tamamen Form II’ye ve Form III’e dönüştürülmüştür. Ancak sadece pH değeri 6.0’da bir miktar DNA’nın Form I şeklinde dönüşmeden kaldığı görülmektedir.

K1 için elde edilen elektroforetik veriler ve kontrol deneyleri göz önüne alındığında, K1 için yapılan pH gradienti denemesinde, hemen hemen çalışılan her pH değerinde yüksek derecede bir nükleolitik aktivitenin varlığı ortaya çıkmıştır.

3.2.1.3. K1–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K1 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözlemlendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 20’de, 175 ng/μL DNA ile 10 μM K1 konsantrasyonunda, 37 °C’de ve pH 7.0’da 10’ar dakikalık artışlarla 0–60 dakika zaman aralığında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 20. K1 kompleksinin, belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

Şekil 20’den K1’in, 10. Dakikadan itibaren DNA’yı Form I’den, Form II ve Form III’e dönüştürmeye başladığı gözükmektedir. 20. Dakikadan sonra ise DNA’nın tamamen Form II ve Form III’e dönüştüğü saptanmıştır.

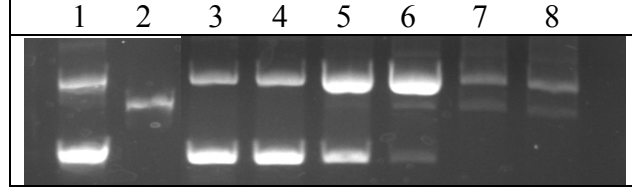
3.2.2. K2’nin Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.2.1. K2–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyonuna Bağımlılığı

K2 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 0.1–1000 μM konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi.

Şekil 21’de, 125 ng/μL DNA ile K2’nin, 37 °C’de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH 7.0’daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan

DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



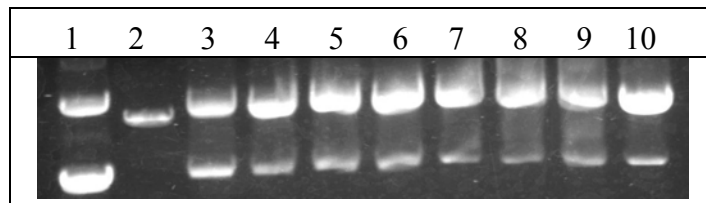
Şekil 21. K2 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, 0.1 µM K2; 4, 1 µM K2; 5, 10 µM K2; 6, 100 µM K2; 7, 500 µM K2; 8, 1000 µM K2

Şekil 21'de MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince K2'nin 10 µM konsantrasyonda nükleaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir. K2, yüksek konsantrasyonlarda K1 ile benzer çözünürlük problemleri göstermiştir.

3.2.2.2. K2-DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K2 kompleksinin DNA ile etkileştiği en uygun konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği en uygun pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 22'de, 250 ng/µL DNA ile K2'nin (10 µM konsantrasyonda), 37 °C'de ve değişen pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon süresince gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 22. 10 µM K2 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10

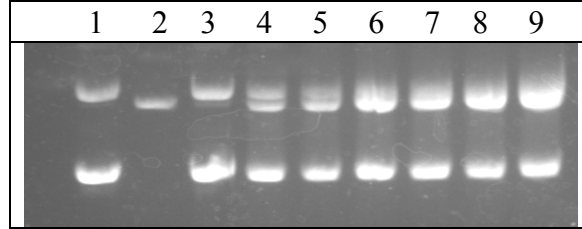
Şekil 22'de görüldüğü üzere, 10 μM K2 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA'nın büyük bir çoğunluğu Form II'ye ve Form III'e dönüşmüş, bir kısımda Form I olarak kalmıştır.

K2 için elde edilen elektroforetik veriler ve kontrol deneyleri göz önüne alındığında, K2 için yapılan pH gradienti denemesinde, hemen hemen çalışılan her pH değerinde nükleolitik aktivitenin varlığı ortaya çıkmıştır.

3.2.2.3. K2–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K2 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözleendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 23'de, 175 ng/ μL DNA ile 10 μM K2 konsantrasyonunda 37 °C'de ve pH 7.0'da 10'ar dakikalık artışlarla 0–60 dakika zaman aralıklarında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 23. K2 kompleksinin belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

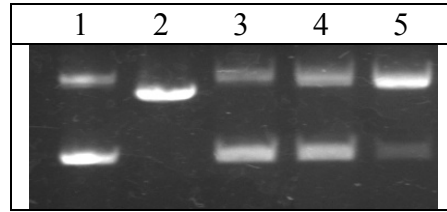
Şekil 23'de, 10 μM K2 mevcudiyetinde ve pH 7.0'da yapılan zaman gradienti denemesinde, 10. Dakikadan itibaren DNA'nın, Form I'den Form II ve Form III'e dönüşümünün başladığı görülmektedir.

3.2.3. K3'ün Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.3.1. K3–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı

K3 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 1–25 μM konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi.

Şekil 24'de 125 ng/ μL DNA ile K3'ün, 37 °C'de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH 7.0'daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



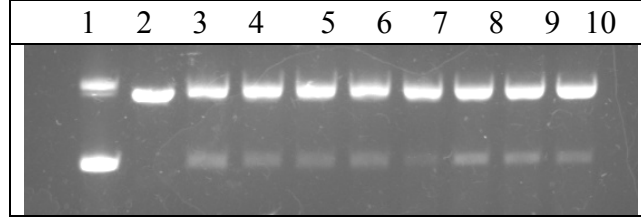
Şekil 24. K3 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 1 μM K3; 4, 10 μM K3; 5, 25 μM K3

Şekil 24'de MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince K3'ün 25 μM konsantrasyonda nükleolitik aktivite gösterdiği görülmektedir.

3.2.3.2. K3–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K3 kompleksinin DNA ile etkileştiği konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği en uygun pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 25'de, 250 ng/ μL DNA ile K3'ün (25 μM konsantrasyonda), 37 °C'de ve değişen pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon süresince gerçekleştirilen reaksiyonla oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 25. K3 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0

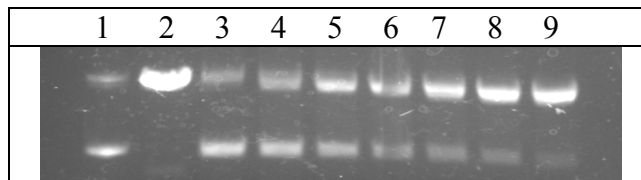
Şekil 25'de, 25 μ M K3 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA'nın büyük bir çoğunluğu Form II'ye ve Form III'e dönüşmüş, bir kısmı da Form I olarak kalmıştır.

K3 için elde edilen elektroforetik veriler ve kontrol deneyleri göz önüne alındığında, K3 için yapılan pH gradienti denemesinde, hemen hemen çalışılan her pH değerinde nükleolitik aktivitenin varlığı ortaya çıkmıştır.

3.2.3.3. K3-DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K3 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözleendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 26'da, 175 ng/ μ L DNA ile 10 μ M K3 konsantrasyonunda 37 °C'de ve pH 7.0'da 10'ar dakikalık artışlarla 0-60 dakika zaman aralıklarında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 26. K3 kompleksinin belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

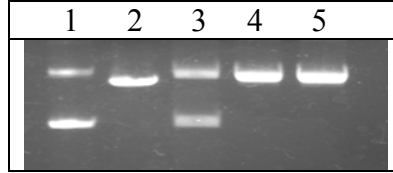
Şekil 26'da 10 μ M K3 mevcudiyetinde ve pH 7.0'da yapılan zaman gradienti denemesinde, 20. Dakikadan itibaren DNA'nın Form I'den Form II ve Form III'e dönüşümünün başladığı görülmektedir. Fakat bu değişim önceki komplekslere nazaran biraz daha yavaş olmaktadır. 60. Dakikada DNA'nın tamamen Form II ve Form III'e dönüştüğü saptanmıştır.

3.2.4. K4'ün Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.4.1. K4–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağlılığı

K4 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 1–25 μ M konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi.

Şekil 27'de, 250 ng/ μ L DNA ile K4'ün, 37 °C'de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH 7.0'daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



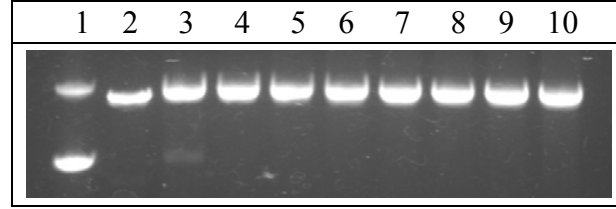
Şekil 27. K4 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 1 μ M K4; 4, 10 μ M K4; 5, 25 μ M K4

Şekil 27'de MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince K4'ün 10 μ M konsantrasyonda nükleaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir.

3.2.4.2. K4–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K4 kompleksinin DNA ile etkileştiği konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği en uygun pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 28’de, 250 ng/μL DNA ile K4’ün (10 μM konsantrasyonda), 37 °C’de ve değişen pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon süresince gerçekleştirilen reaksiyonla oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



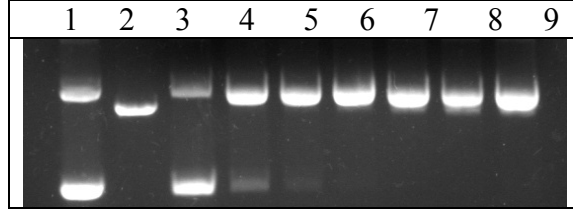
Şekil 28. 10 μM K4 kompleksi ve MMPP varlığında DNA’nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH’ının etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10

Şekil 28’den görüldüğü üzere, 10 μM konsantrasyonda K4 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA tamamen Form II’ye ve Form III’e dönüştürülmüştür.

3.2.4.3. K4–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K4 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözleendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 29’da, 250 ng/μL DNA ile 10 μM K4 konsantrasyonunda 37 °C’de ve pH 7.0’da 10’ar dakikalık artışlarla 0–60 dakika zaman aralıklarında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 29. K4 kompleksinin belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

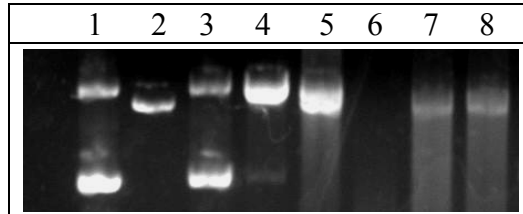
Şekil 29’da, 10. Dakikadan itibaren, DNA’nın, Form I’den Form II ve Form III’e dönüşmeye başladığı görülmektedir. 20. Dakikadan sonra ise DNA’nın tamamen Form II ve Form III’e dönüştüğü saptanmıştır.

3.2.5. K5’in Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.5.1. K5–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı

K5 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 0.1–1000 μM konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi.

Şekil 30’da 175 ng/ μL DNA ile K5’in, 37 °C’de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH 7.0’daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen lektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



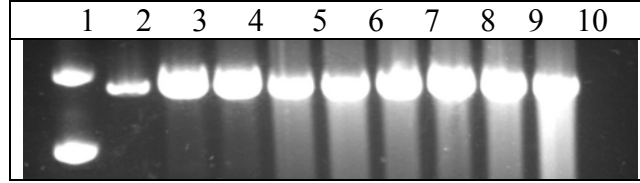
Şekil 30. K5 kompleksinin MMPP varlığında DNA’nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, 0.1 μM K5; 4, 1 μM K5; 5, 10 μM K5; 6, 100 μM K5; 7, 500 μM K5; 8, 1000 μM K5

Şekil 30'da, MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince, K5'in, 1 μ M, ve 10 μ M konsantrasyonlarında, DNA'yı tamamen Form II ve Form III'e dönüştürdüğü görülmektedir.

3.2.5.2. K5–DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K5 kompleksinin DNA ile etkileştiği en uygun konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği en uygun pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 31'de, 250 ng/ μ L DNA ile K5'in 10 μ M konsantrasyonda (diğer komplekslerle karşılaştırma yapılabilmesi için 10 μ M konsantrasyon değeri seçilmiştir), 37 °C'de ve değişen pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon süresince gerçekleştirilen reaksiyonla oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



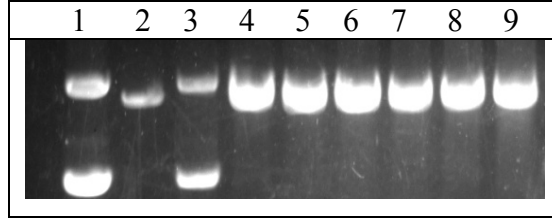
Şekil 31. 10 μ M K5 kompleksi ve belirli konsantrasyonda MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'ının etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10.0

Şekil 31'de görüldüğü üzere, 10 μ M konsantrasyonda K5 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA'nın tamamen Form II'ye ve Form III'e dönüştüğü görülmektedir.

3.2.5.3. K5–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K5 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözlemlendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 32’de, 175 ng/μL DNA ile 10 μM K5 konsantrasyonunda 37 °C’de ve pH 7’de 10’ar dakikalık artışlarla 0–60 dakika zaman aralığında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 32. K5 kompleksinin, belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

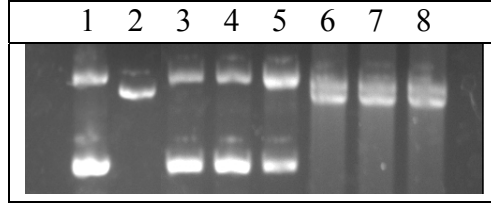
Şekil 32’de K5’in 10. Dakikadan itibaren DNA’yı tamamen Form II ve Form III’e dönüştürdüğü saptanmıştır.

3.2.6. K6’nın Nükleolitik Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.6.1. K6–DNA Etkileşiminin Kompleks Konsantrasyona Bağımlılığı

K6 kompleksinin DNA ile etkileşebileceği en uygun konsantrasyon değerini bulmak için konsantrasyon gradienti denemesi, 0.1–1000 μM konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 33’de, 175 ng/μL DNA ile K6’nın, 37 °C’de 60 dakikalık reaksiyon periyodunda ve pH 7.0’daki fosfat tamponunda gerçekleştirilen reaksiyonu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



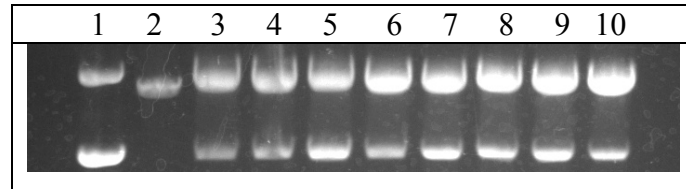
Şekil 33. K6 kompleksinin MMPP varlığında DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, 0.1 μM K6; 4, 1 μM K6; 5, 10 μM K6; 6, 100 μM K6; 7, 500 μM K6; 8, 1000 μM K6

Şekil 33'de MMPP varlığında ve 1 saatlik reaksiyon süresince, K6'nın 10 μM konsantrasyonunda nükleaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir.

3.2.6.2. K6-DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı

K6 kompleksinin, DNA ile etkileştiği en uygun konsantrasyon değerinde kompleksin DNA ile etkileşebileceği en uygun pH değerini bulmak için pH gradienti denemesi pH 6.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir.

Şekil 34'de, 250 ng/ μL DNA ile K6'nın (10 μM konsantrasyonda), 37 °C'de ve değişen pH değerlerinde 60 dakikalık reaksiyon süresince gerçekleştirilen reaksiyonu sonucu oluşan DNA formlarının, 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



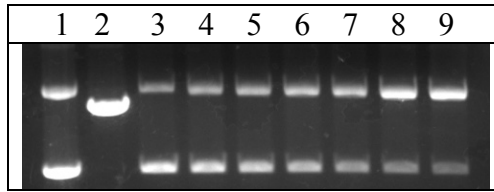
Şekil 34. K6 kompleksi ve MMPP varlığında, DNA'nın süpersarmal yapısı üzerine ortamın pH'nın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA-BamHI (kontrol); 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10

Şekil 34'de görüldüğü üzere, 10 μ M K6 kompleksi ve MMPP varlığında çalışılan tüm pH değerlerinde nükleolitik aktivite gözlenmiştir ve DNA'nın büyük bir çoğunluğu Form II'ye ve Form III'e dönüşmüş, bir kısmı da Form I olarak kalmıştır.

3.2.6.3. K6–DNA Etkileşiminin Zaman Bağımlılığı

K6 kompleksinin DNA ile etkileşip etkin bir nükleolitik aktivitenin gözlemlendiği zaman dilimini saptamak için 0 dakika ile 60 dakika zaman aralıklarında zaman gradienti denemesi yapılmıştır.

Şekil 35'de 175 ng/ μ L DNA ile 10 μ M K6 konsantrasyonunda 37 °C'de ve pH değeri 7.0'da 10'ar dakikalık artışlarla 0–60 dakika zaman aralıklarında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu oluşan DNA formlarının 100 Voltluk bir potansiyelde 30 dakika yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



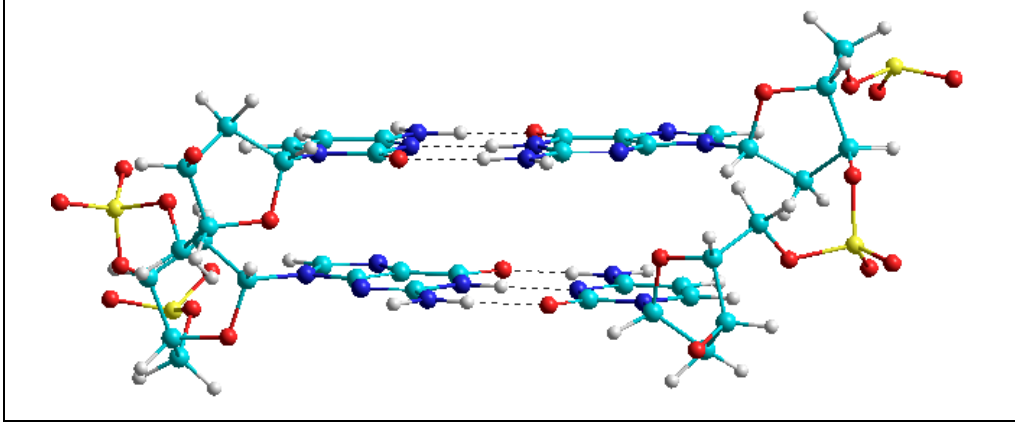
Şekil 35. K6 kompleksinin, belirli konsantrasyon ve pH değeri nükleaz aktivitesi üzerine zamanın etkisi. 1, DNA (kontrol); 2, DNA–BamHI (kontrol); 3, 0. Dakika; 4, 10. Dakika; 5, 20. Dakika; 6, 30. Dakika; 7, 40. Dakika; 8, 50. Dakika; 9, 60. Dakika

Şekil 35'de, K6'nın 20. Dakikadan itibaren DNA'yı Form I'den Form II'ye dönüştürmeye başladığı gözükmektedir.

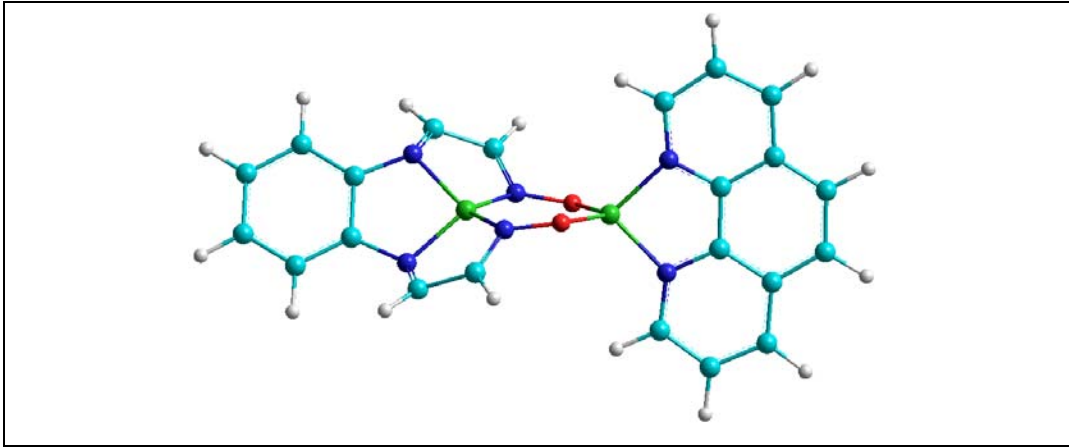
3.3. Komplekslerin Moleküler Modelleme Çalışmaları

Komplekslerin moleküler modelleme çalışmaları, komplekslerin yapılarının benzerliği nedeniyle sadece K5 ve K6 kompleksleri üzerinde araştırılmıştır. Öncelikle komplekslerin etkileşeceği DNA'nın moleküler modellemesi yapılmıştır. Bu modelde d(GpC)² dinükleotidi (Şekil 36) kullanılmıştır. Daha sonra K5 (Şekil 37) ve K6 (Şekil 38)

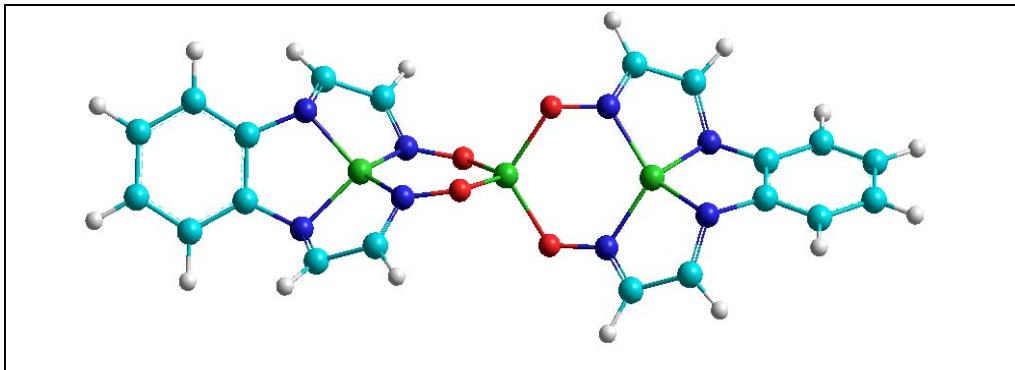
komplekslerinin modelleri yapıp $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidi ile olası etkileşimi modellenmiştir.



Şekil 36. $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidinin moleküler modellemesi

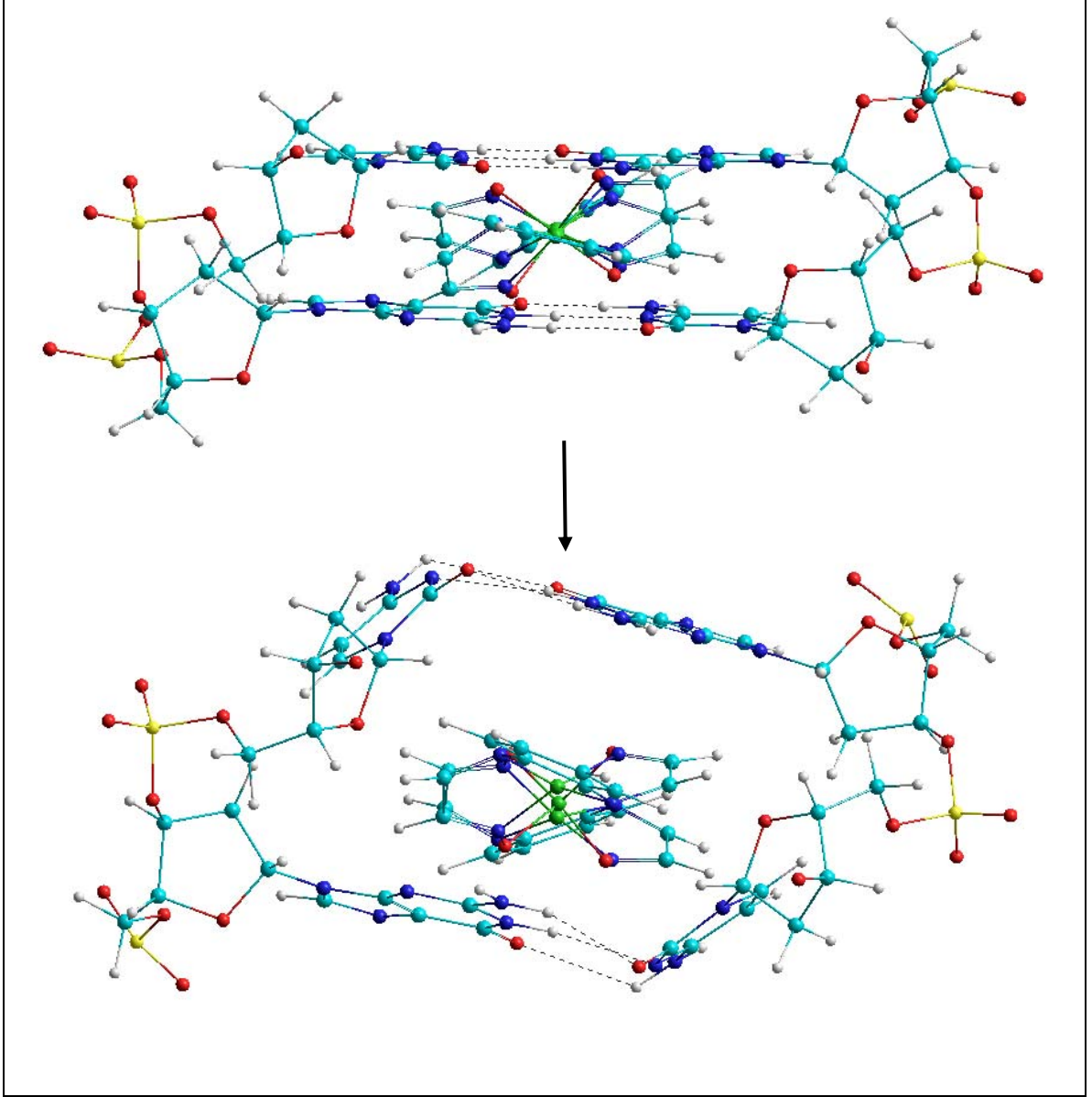


Şekil 37. K5 kompleksinin moleküler modellemesi



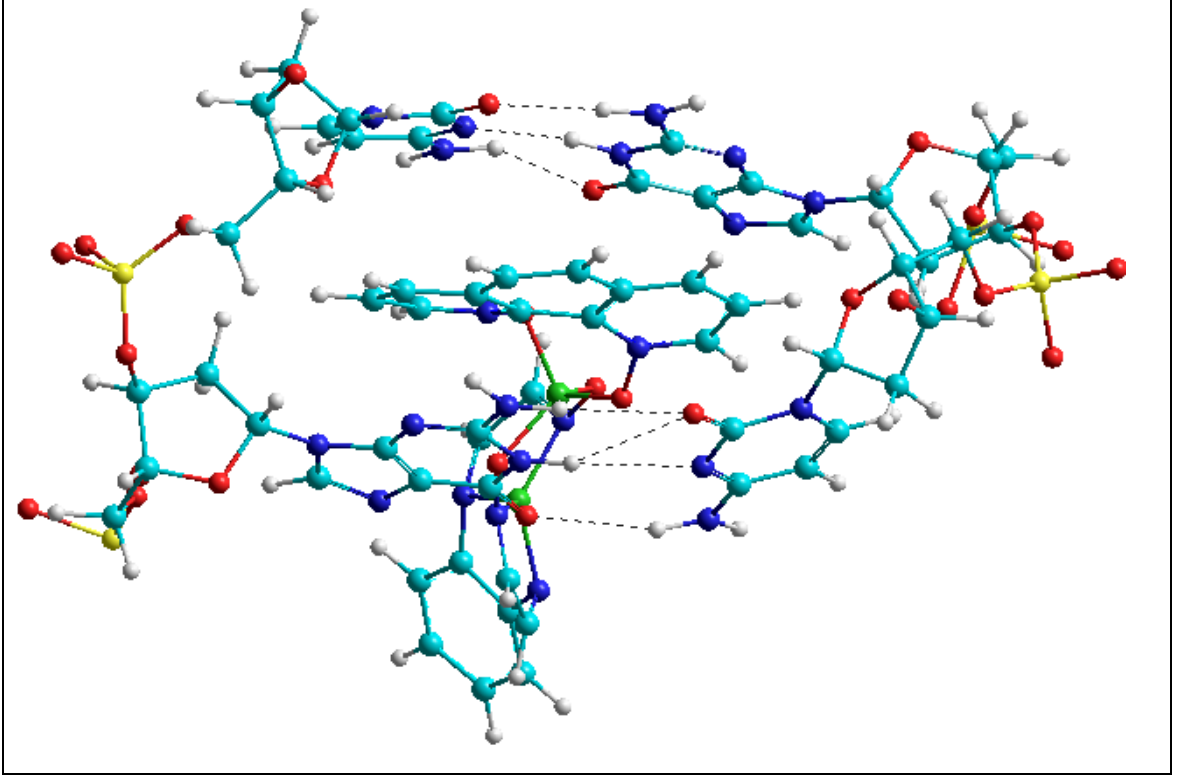
Şekil 38. K6 kompleksinin moleküler modellemesi

K6 kompleksi ve $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidinin etkileşimi, öncelikle kompleksin interkalasyon yapabilecek bir konumda $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidine yaklaşır sonrasında interkalasyon yaparak $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidinin konformasyonunu bozması ile gerçekleşir.

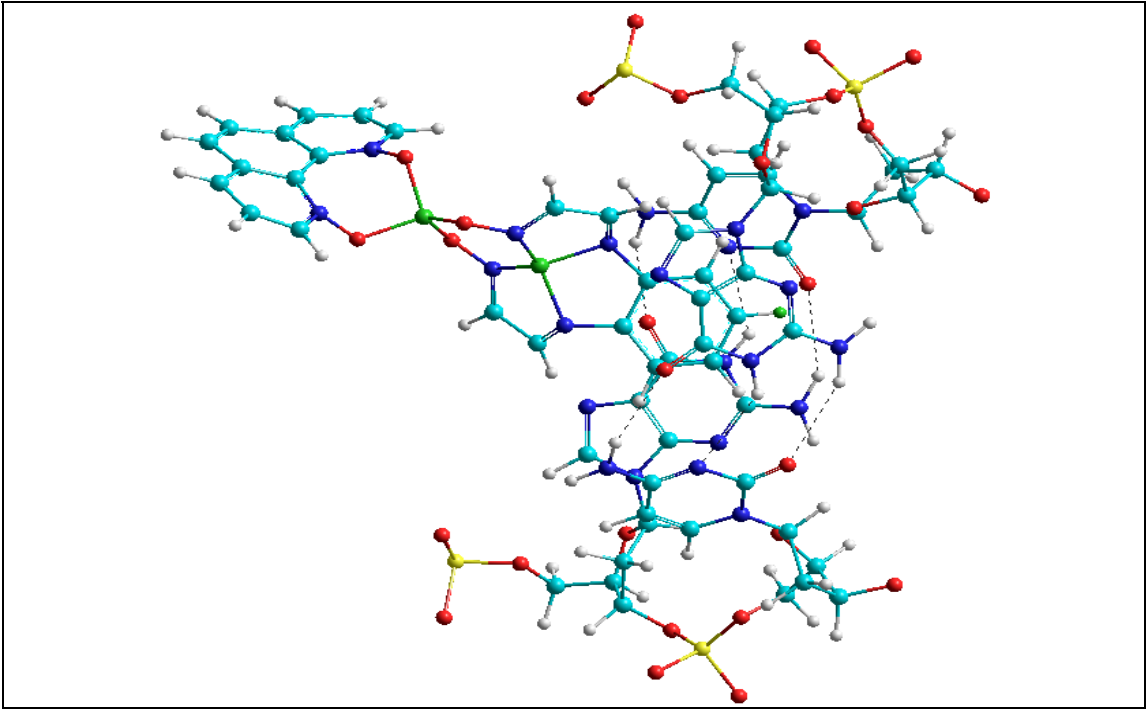


Şekil 39. K6 kompleksinin interkalasyonu

K5 kompleksi ve $d(\text{GpC})^2$ dinükleotidinin etkileşimi, K6 kompleksinin etkileşimi ile temelde aynıdır. Fakat K5 kompleksinin iki farklı ligand grubu olduğu için bu iki grubun ayrı ayrı interkalasyon yapacakları muhtemeldir.



Şekil 40. K5 kompleksinin Fenantrolin grubunun interkalasyonu

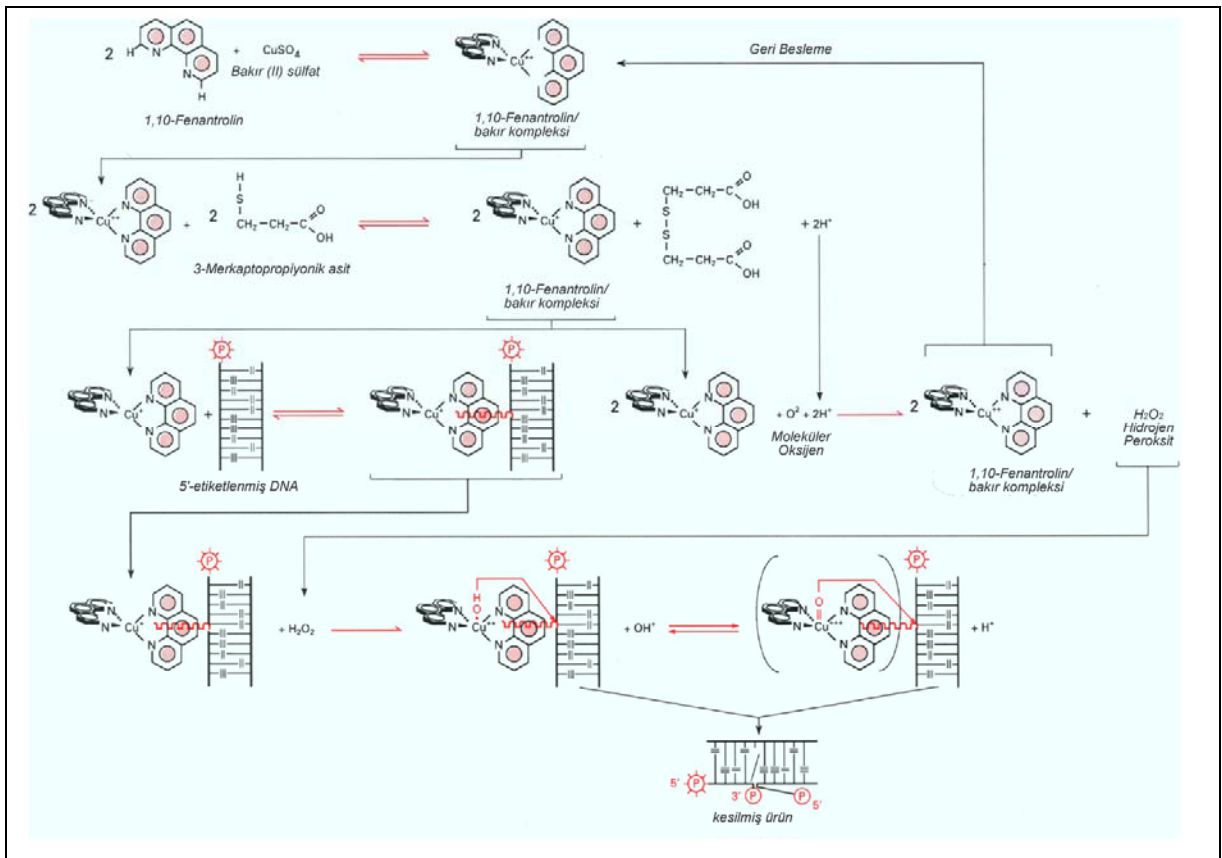


Şekil 41. K5 kompleksinin oksim ligandının interkalasyonu

3.4. DNA Kesiminin Mekanizması

Kimyasal nükleazlar, fizyolojik şartlar altında nükleik asitlerin riboz veya deoksiriboz birimlerine saldırarak onları kesen redoks aktif koordinasyon kompleksleri olarak tanımlanırlar. 1,10-fenantrolin bakır (I) kompleksi ($[(OP)_2Cu^+]$) nükleolitik etkinliği açıklanan ilk koordinasyon kompleksidir [44].

1,10-fenantrolin bakır (I) kompleksinin nükleolitik aktivitesi için oksidatif kesimin kinetik mekanizması Şekil 42’de şematize edilmiştir [6].



Şekil 42. 1,10-fenantrolin kompleksinin nükleolitik aktivitesinin kinetik mekanizmasının şematik gösterimi [6]

Birinci basamak, 1,10-fenantrolin bakır iyonu koordinasyon kompleksinin oluşumudur. DNA kesim süreci bir tiyolün (burada 3-merkaptopropiyonik asit) veya askorbik asitin hedef DNA'yı içeren reaksiyon karışımına katılması ile başlatılır. Bu şartlar altında, bir süperoksit arabirimi yolu ile H_2O_2 üretmek için moleküler oksijen tarafından yükseltgenen $[(OP)_2Cu^{++}]$ kompleksi $[(OP)_2Cu^+]$ kompleksine indirgenir. H_2O_2 kimyasal

nükleaz aktivitesi için olmazsa olmaz bir ko-reaktanttır. Hidrojen peroksit ya reaksiyon ortamında bakır kompleksinin moleküler oksijen tarafından yükseltgenmesi ile oluşur ya da dışarıdan eklenebilir. Oluşan tetrahedral bakır kompleksi, DNA'nın minör oluşuna bağlanır ve ovalent olmayan bir ara ürün üzerinden DNA kesim reaksiyonu gerçekleşir [6].

Benzer şekilde fenantrolin içeren bakır komplekslerinin DNA kesim mekanizmalarının oksidatif mekanizma üzerinden yürüdüğünü belirten çalışmalar [6, 43, 44, 45, 46] mevcuttur.

Yapılan agaroz jel elektroforezi ve moleküler modelleme çalışmaları göz önüne alındığında ve oksidatif kesim için önerilen bu mekanizmalarla karşılaştırıldığında K1-K6 komplekslerinin de DNA'yı oksidatif bir mekanizma ile kestiği sonucuna varılabilir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, (2E,3E)-3-[(6-[(1E,2E)-2-(hidroksiimino)-1-metilpropiliden] amino}piridin-2-il)imino]bütan-2-on oksim ligandının iki farklı bakır ve/veya nikel içeren homo dinükleer bakır (II) (K1), hetero dinükleer bakır (II)-nikel (II) (K2), komplekslerinin ve 2-(hidroksiimino)-1-metilpropilidenaminofeniliminobütan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya nikel içeren mononükleer bakır (II) (K3), hetero dinükleer nikel (II)-bakır (II) (K4), homo dinükleer bakır (II) (K5), homo trinükleer bakır (II) (K6) komplekslerinin nükleolitik özellikleri, nötral agaroz jel elektroforezi yöntemi ile ortaya konmuştur. Bu yöntem kullanılarak fenantrolin grupları içeren mononükleer bakır (II), homodinükleer bakır (II), heterodinükleer bakır (II)-nikel (II) / bakır (II)-mangan (II) komplekslerinin nükleolitik aktivitelerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur [47, 48, 49]. Ayrıca fenantrolin içeren fotoaktif Rutenyum (II) komplekslerinin de nükleolitik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [46]. Bunlara ilaveten, çeşitli amino asitlerle bakır (II)'nin oluşturduğu komplekslerin DNA'yı kestiği bildirilmiştir [51, 52, 53].

Komplekslerin nükleolitik aktivitesi pUC18 plazmid DNA'sı kullanılarak yapılmıştır. Benzer komplekslerle yapılan çalışmalarda, pCYTEXP [54], pUC19 [49, 52], pB II KS⁺[55], pBR322, [56,57] ve pBluescript [58] gibi farklı plazmid DNA'lar kullanılmıştır.

Nükleolitik aktivite deneyleri, önyükseltgeyici monomagnezyumperoksifitalat (MMPP) varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. MMPP yokluğunda gerçekleştirilen deneylerde kompleksler nükleolitik aktivite göstermemişlerdir. MMPP varlığında ise bütün kompleksler etkin bir şekilde DNA'yı kesmişlerdir. Benzer şekilde MMPP'li ortamda oksim tipi ligandların komplekslerinin nükleolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir [48]. Önyükseltgeyici olarak askorbik asit [56], merkaptopropiyonik asit (MPA) [49], H₂O₂'nin [59] kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır.

Nükleolitik aktivitenin kompleks konsantrasyonuna bağımlılığı çalışmaları sonucunda, homodinükleer bakır (II) ve heterodinükleer Cu (II)-Ni (II) kompleksleri ve homotrinükleer Cu (II) kompleksleri (K1, K2, K4, K5, K6) 10 µM konsantrasyonda DNA'yı keserken, mononükleer bakır (II) kompleksi (K3) 25 µM konsantrasyonda DNA'yı kestiği görülmüştür. Benzer bir şekilde dinükleer bakır (II) kompleksi Cu^{II}₂(N₄S₄) (N₄S₄:1,2,4,5-tetrakis(1'-amino-3'-bütil)benzen)'in mononükleer analoglarından daha büyük bir oranda DNA kesimine sebep olduğu bildirilmiştir [60]. Sağlam'a [48] göre

oksim tipi homodinükleer bakır (II) ve heterodinükleer bakır (II)–mangan (II) kompleksleri MMPP’li ortamda 0.1 μM konsantrasyon değerinde nükleolitik aktivite göstermişlerdir. Fakat homotrinükleer bakır (II) kompleksi 300 μM konsantrasyon değerinde nükleolitik aktivite göstermiştir. Başka bir çalışmada, Ruiz [61], askorbat / H_2O_2 ortamında 9 μM ve 12 μM konsantrasyon değerlerinde bakır (II) komplekslerinin nükleolitik aktivitesinin varlığını ortaya koymuştur. K1, K2, K4, K5 ve K6 kompleksleri Sağlam’ın [48] çalışmasında kullanılan komplekslerle karşılaştırıldığında; homodinükleer ve heteronükleer bakır (II)–mangan (II) komplekslerinin K1, K2 ve K4 komplekslerine nazaran yaklaşık 100 kat, K5 kompleksine nazaran ise 10 kat düşük konsantrasyonda nükleaz aktivitesi gösterdiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte homotrinükleer bakır (II) kompleksi K6 kompleksine nazaran 30 kat yüksek konsantrasyonda nükleaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir. K3 kompleksi, Ruiz’in [50] çalışmasında kullanılan komplekslere nazaran yaklaşık 2 kat yüksek konsantrasyonda nükleaz aktivitesi göstermiştir. Öte yandan Wang [62], çalışmasında, mononükleer bakır (II) kompleksinin 40 μM ve 60 μM konsantrasyon değerlerinde nükleaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Böylelikle, K3 kompleksinin, Wang’ın [62], çalıştığı komplekslere göre yaklaşık 2 kat düşük konsantrasyonda nükleaz aktivitesi gösterdiği söylenebilir.

Nükleolitik aktivitenin reaksiyon ortamının pH değerine bağımlılığı çalışmaları pH 6.0–10.0 aralığında gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, komplekslerin tamamının, çalışılan her pH değerinde nükleolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle komplekslerin nükleolitik aktivitelerinin pH’ya bağımlı olmadığı sonucuna varılabilir. Benzer bir durum Song’un [46] çalışmasında nikel (II) kompleksi için de görülmüştür. Çalışılan tüm pH değerlerinde, süpersarmal DNA’nın kırık ve lineer forma dönüştüğü görülmüştür. Sağlam [48] yaptığı çalışmalarla homodinükleer bakır (II) ve heterodinükleer bakır (II)–mangan (II) komplekslerinin nükleolitik aktivitesinin pH artıka azaldığını ortaya koymuştur. Fakat trinükleer bakır (II) kompleksinde ise böyle bir değişim görülmemiştir.

Nükleolitik aktivitenin zamana bağımlılığı incelendiğinde K1, K2, K4 ve K5 komplekslerinin 10. Dakika ve sonrasında tüm süpersarmal DNA’ları kırık ve lineer forma dönüştürdüğü görülmüştür. K3 ve K6 ise nükleolitik aktivitelerini sırasıyla, 20. Dakika ve 30. Dakikadan itibaren göstermeye başladıkları saptanmıştır. Dülger [54], yaptığı çalışmada homotetranükleer bakır (II) ve heterotetranükleer bakır (II)–mangan (II) için bu süreleri 3 dakika ve 5 dakika olarak saptamıştır. Sağlam [48] ise, homonükleer bakır (II) ve

heterodinükleer bakır (II)–mangan (II) için 5 dakika, homotrinükleer bakır (II) kompleksi için 10 dakika olarak saptamıştır. Hirohima [59], fenantrolin türevli bakır (II) kompleksleriyle yaptığı çalışmalarda, 15 dakikalık inkübasyon zamanında komplekslerin süpersarmal DNA'yı kırık forma dönüştürdüğünü saptamıştır. Hirohima [59], bu süreyi 30 dakikaya çıkardığında kırık form DNA'nın yanında lineer formda DNA'ların varlığı görülmüştür. Wang [62], 40 μ M kompleks konsantrasyonunda 30, 60 ve 120 dakikalık inkübasyon zamanlarında yaptığı çalışmalarda 30. Dakikada süpersarmal DNA'nın kırık forma dönüştüğünü görmüştür. 60. Dakikada ise kırık formun yanında lineer formda DNA'lara rastlanmıştır. 120. Dakikada ise süpersarmal DNA formlarının çoğunun kırık ve lineer forma dönüştüğü fakat bir kısım süpersarmal DNA'nın dönüşmeden kaldığı görülmektedir.

Komplekslerin geometrik optimizasyonu BIO+CHARM yöntemi ile yapılmıştır. Yapılan modelleme çalışmaları, komplekslerin interkalasyon yaparak DNA'yı kestiğini ortaya koymaktadır. Benzer modelleme çalışmaları elliptisin alkaloidi ve türevleri için de yapılmıştır [63].

Gerçekleştirilen agaroz elektroforezi ve moleküler modelleme çalışmalarının sonuçları ve Fenantrolin gruplarını içeren bakır komplekslerinin DNA'yı oksidatif olarak kestiğini ortaya koyan çalışmalara [6, 44, 43, 46, 45] dayanarak K1–K6 komplekslerinin oksidatif mekanizma ile DNA'yı kestiğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, tüm komplekslerin interkalasyon yaparak, oksidatif bir mekanizma sonucu DNA'yı kestiği, aynı şartlar altında K2 ve K6 komplekslerinin diğer komplekslere nazaran daha zayıf bir şekilde süpersarmal DNA'yı kırık ve lineer forma dönüştürdüğü, di- ve tri- nükleer komplekslerin, mono nükleer analoglarına nazaran daha düşük konsantrasyonlarda DNA'yı oksidatif olarak kestiği ve böylelikle bu komplekslerin nükleaz olarak kullanılacakları sonuçlarına varılabilir.

5. ÖNERİLER

Bu sonuçlar bize bu komplekslerin birer antikanser ilaç olabileceği yönünde fikir vermiştir. Böylelikle daha ileri çalışmalarla bu komplekslerin anti-kanser ilaç olabilme yetenekleri araştırılabilir.

Ayrıca bu komplekslerin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral ve anti-oksidan özelliklerine sahip olup olmadıkları yeni araştırmalar için konu olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Güner, S., *Biyokimya-1*, K.T.Ü. Basımevi, Trabzon, 2007.
2. Lu, X., Wang, L., Liu, H., Wang, R. ve Chen, J., Studies on the Interaction Between Antibiotics and DNA, *Talanta*, 73 (2007) 444–450.
3. Blackburn G. M., Gait, M. J., *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2. Baskı, Oxford Univ. Press, Oxford, UK, (1997).
4. Yoshimasu M., Honda M., Mikawa T., Shibata T., ve İto Y., *NMR Approaches To Investigate Protein–Protein And Protein–Nucleic Acid Complexes*, RIKEN Review, 46, 32–35.
5. Luo, S. Z., Li, Y. M., Qiang, W., Abe, H., Nemoto, T., Qin, X. R. ve Nakanishi, H., *Detection of Specific Noncovalent Interaction of Peptide with DNA by MALDI–TOF*, American Society for Mass Spectrometry, 15 (2004) 28–31.
6. Papavassiliou, A. G., *Chemical Nucleases as Probes for Studying DNA–Protein Interactions*, Biochem. J, 305 (1995) 345–357.
7. Geyer, H., Geyer, R. ve Pingoud, V., *A Novel Strategy for the Identification of Protein–DNA Contacts by Photocrosslinking and Mass Spectrometry*, Nucleic Acid Research, 16 (2004) 1–8.
8. Dryden, D. T. F., *DNA Mimicry by Proteins and the Control of Enzymatic Activity on DNA*, TRENDS in Biotechnology, 24, 8 (2006) 378–382.
9. Nishino, T., İshino, Y. ve Morikawa, K., *Structure–Specific DNA Nucleases: Structural Basis for 3D Scissors*, Current Opinion in Structural Biology, 16 (2006) 60–67.
10. Neves, A., Terenzi, H., Horner, R., Horn Jr. A., Szpoganicz, B. ve Sugai, J., *Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a Dinuclear Iron(III) Complex*, Inorganic Chemistry Communications, 4 (2001) 388–391.
11. Nishino, T. ve Morikawa, K., *Structure and Function of Nucleases in DNA Repair: Shape, Grip and Blade of the DNA Scissors*, Oncogene, 21 (2002) 9022–903.
12. Mishra, N. C. 2002. *Nucleases: Molecular Biology and Applications*
http://media.wiley.com/product_data/excerpt/10/04713946/0471394610.pdf 23 Nisan 2008.
13. Zhu, L., Jin, Y., Li, X., Wang, J., Kong, D., Mi, H., Liao, D. ve Shen, H., *Synthesis, Structure and DNA Cleavage Activity of Two 4,40-dimethyl-2,20-bipyridyl Manganese(II) Complexes*, Inorganica Chimica Acta, 361 (2008) 29–35.

14. Uma, V., Kanthimathi, M., Subramanian, J. ve Nair, B. U., A New Dinuclear Biphenylene Bridged Copper(II) Complex: DNA Cleavage Under Hydrolytic Conditions, Biochimica et Biophysica Acta, 1760 (2006) 814–819.
15. An, Y., Liu, S. D., Deng, S. Y., Ji, L. N. ve Mao, Z. W., Cleavage of Double–Strand DNA by Linear and Triangular Trinuclear Copper Complexes, Journal of Inorganic Biochemistry, 100 (2006) 1586–1593.
16. Liu, F. Q., Wang, Q. X., Jiao, Kui., Jian, F. F., Liu, G. Y. ve Li, R. X., Synthesis, Crystal Structure, and DNA–Binding Properties of a New Copper(II) Complex Containing Mixed–Ligands of 2.2'–bipyridine and p–methylbenzoate, Inorganica Chimica Acta, 359 (2006) 1524–1530.
17. Kumar, R. S., Arunachalam, S., Periasamy, V. S., Preethy, C. P., Riyasdeen, A. ve Akbarsha, M. A., DNA Binding and Biological Studies of Some Novel Water–Soluble Polymer–Copper(II) –phenanthroline Complexes, European Journal of Medicinal Chemistry, xx (2007) 1–10.
18. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b1/A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png/800px-A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png, 23Nisan 2008.
19. Brutlag D., 2000. Biochemistry 201, Advanced Molecular Biology <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/Topology.pdf> 23Nisan 2008.
20. Härd, T., NMR Studies of Protein–Nucleic Acid Complexes: Structures, Solvation, Dynamics and Coupled Protein Folding, Quarterly Reviews of Biophysics, 32 (1999) 57–98.
21. Sağlam N., Nükleolitik Senzim Dizaynı ve Nükleik Asitlerle Etkileşiminin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2000.
22. Hingorani, M. M. ve O'Donnell, M., DNA Polymerase Structure and Mechanisms of Action, Current Organic Chemistry, 4 (2000) 887–913.
23. Rothwell, P. J. ve Waksman, G., Structure and Mechanism of DNA Polymerases, Advances in Protein Chemistry, 71 (2005) 401–440.
24. Voet, D. ve Voet, J. G., Biochemistry, Third Edition, John Wiley & Sons inc., USA, 2004.
25. Champoux, J. J., DNA Topoisomerases: Structure, Function and Mechanism, Annu. Rev. Biochem., 70 (2001) 369–413.
26. Berger, J. M., Structure of DNA Topoisomerases, Biochimica et Biophysica Acta, 1400 (1998) 3–18.
27. Braña, M. F., Cacho, M., Gradillas, A., Teresa, B. P. ve Ramos, A., Intercalators as Anticancer Drugs, Current Pharmaceutical Design, 7 (2001) 1745–1780.

28. Bischoff, G. ve Hoffmann, S., DNA–Binding of Drugs Used in Medicinal Therapies, Current Medicinal Chemistry, 9 (2002) 321–348.
29. Strekowski, L. ve Wilson, B., Noncovalent Interactions with DNA:An Overview, Mutation Research, 623 (2007) 3–13.
30. Bloomfield A. V., Crothers, D. M., Tinoco JR, Í., Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions, University Science Books, Sausalito, California, USA 2000.
31. Anastassopoulou, J., Metal–DNA Interactions, Journal of Molecular Structure, 651,653 (2003) 19–26.
32. Neidle, S., DNA Minor–Groove Recognition by Small Molecules, Nat. Prod. Rep., 18 (2001) 291–309.
33. Palchaudhuri, R. ve Hergenrother, P. J., DNA as a Target for Anticancer Compounds: Methods to Determine the Mode of Binding and the Mechanism of Action, Current Opinion in Biotechnology, 18 (2007) 1–7.
34. Martinez, R. ve Garcia, L. C., The Search of DNA–Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work, Current Medicinal Chemistry, 12 (2005) 127–151.
35. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/90/DNA_intecalation.jpeg, 23 Nisan 2008.
36. Pindur U., Haber M. ve Sattler K., Antitumor Active Drugs as Intercalators of Deoxyribonucleic Acid, Journal of Chemical Education, 70 (1993) 263-272.
37. Rappe A.K., Casevit C.J., Molecular Mechanis Across Chemistry, University Science Boks, California, 1996.
38. Cramer C.J., Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models, Jonh Wiley, 2004.
39. Karaböcek, N. , Armutcu, A. ve Karaböcek, S., Synthesis and structural studies of (2E, 3E)–3–[(6–{[(E,2E)–2–(hydroxyimino)–1–methylpropylidene] amino} pyridin–2–yl)imino]butan–2–one Oxime, Ligand and its mono–, di– and trinuclear Copper(II) Complexes, Transition Metal Chemistry, 31 (2006) 938–942.
40. Karaböcek, S. , Karaböcek, N. ve Armutcu, A., Synthesis and structural studies of 2–(hydroxyimino) – 1 – methylpropylideneaminophenyliminobutan – 2 – one Oxime, Ligand and its Complexes with Cu^(II) and Ni^(II), Transition Metal Chemistry, 31 (2006) 459–464.
41. Thomas A. M., Nethaji M., Mahadevan S. ve Chakravarty A. R., Synthesis, Crystal Structure, and Nuclease Activity of Planar mono–heterocyclic Base Copper(II) Complexes, Journal of Inorganic Biochemistry, 94 (2003) 171–178.

42. Song, Y., Wu, Q., Yang, P., Luan, N., Wang, L. ve Liu, Y., DNA Binding and Cleavage Activity of Ni(II) Complex with all-trans Retinoic Acid, Journal of Inorganic Biochemistry, 100 (2006) 1685–1691.
43. Pogozelski, W. W. ve Tullius, T. D., Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety, Chem. Rev., 98, (1998) 1089–1107.
44. Sigman, D. S., Chemical Nucleases, Biochemistry, 29 (1990) 9097–9105.
45. Thederahn, T. B., Kuwabara, M. D., Larsen, T. A. ve Sigman, D. S., Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Copper: Kinetic Mechanism, J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) 4941–4946.
46. Pope, L. M., Reich, K. A., Graham, D. R. ve Sigman D. S., Products of DNA Cleavage by the 1,10-Phenanthroline-Copper Complex, The Journal Of Biological Chemistry, 257 (1982) 12121–12128.
47. Saglam N., Colak A., Serbest K., Karaböcek S. ve Güner S., DNA Hydrolysis By Homo- and Heteronuclear Cu(II)-Ni(II) Complexes Of Two Diester-type Ligands, Monatshefte für Chemie, 135 (2004) 1023–1031.
48. Saglam N., Colak A., Serbest K., Dülger S., Güner S., Karaböcek S. ve Beldüz A. O., Oxidative Cleavage of DNA by homo- and Heteronuclear Cu(II)-Mn(II) Complexes of an oxime-type ligands, BioMetals, 15 (2002) 357–365.
49. Thomas A. M., Naik A. D., Nethaji M. ve Chakravarty A. R., Synthesis, Crystal Structure and Photo-Induced DNA Cleavage Activity of Ternary Copper(II)-Thiosemicarbazone Complexes Having Heterocyclic Bases, Inorganica Chimica Acta, 357 (2004) 2315–2323.
50. Liu Y., Chao H., Yuan Y., Yu H. ve Ji L., Ruthenium(II) Mixed-Ligand Complexes Containing 2 - (6-methyl-3-chromonyl) imidazo [4,5-f] [1,10] - phenanthroline: Synthesis, DNA-binding and photocleavage studies, Inorganica Chimica Acta, 359 (2006) 3807–3814.
51. Reddy P. R., Rao K. S. ve Satyanarayana B., Synthesis and DNA Cleavage Properties of Ternary Cu(II) Complexes Containing Histamine and Amino Acids, Tetrahedron Letters, 47 (2006) 7311–7315.
52. Rao R., Patra A. K. ve Chetana P. R., Synthesis, Structure, DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-leucine/isoleucine) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases, Polyhedron, 27 (2008) 1343–1352.
53. Rao, R., Patra, A. K. ve Chetana P.R., DNA Binding and Oxidative Cleavage Activity of Ternary (L-proline) Copper(II) Complexes of Heterocyclic Bases, Polyhedron, 26 (2007) 5331–5338.

54. Dülger S., Saglam N., Beldüz A. O., Güner S. ve Karaböcek S., DNA Cleavage by Homo- and Heteronuclear Cu(II)–Mn(II) Complexes with Tetrathioether–Tetrathiol Moiety, BioMetals, 13 (2000) 261–265.
55. Fernandes, C., Parrilha, G. L., Lessa, J. A., Santiago, L. J. M., Kanashiro, M. M., Boniolo, F. S., Bortoluzzi, A. J., Vugman, N. V., Herbst, M. H. ve Horn Jr., A., Synthesis, Crystal Structure, Nuclease and *in vitro* Antitumor Activities of a New Mononuclear Copper(II) Complex Containing a Tripodal N₃O Ligand, Inorganica Chimica Acta, 359 (2006) 3167–3176.
56. Selvakumar B., Rajendiran V., Maheswari P. U., Evans H. S. ve Palaniandavar M., Structures, Spectra, and DNA-binding Properties of Mixed Ligand Copper(II) Complexes of Iminodiacetic Acid: The Novel Role of Diimine co-ligands on DNA Conformation and Hydrolytic and Oxidative Double Strand DNA Cleavage, Journal of Inorganic Biochemistry, 100 (2006) 316–330.
57. Ferrari M. B., Bisceglie F., Pelosi G. ve Tarasconi P., Heterocyclic Substituted Thiosemicarbazones and their Cu(II) Complexes: Synthesis, Characterization and Studies of Substituent Effects on Coordination and DNA Binding, Polyhedron, 27 (2008) 1361–1367.
58. Silveira V. C., Luz J. S., Oliveira C. C., Graziani I., Ciriolo M. R. ve Ferreira A. M. C., Double-strand DNA Cleavage Induced by Oxindole–Schiff Base Copper(II) Complexes with Potential Antitumor Activity, Journal of Inorganic Biochemistry, 102 (2008) 1090–1103.
59. Hirohama T., Kuranuki Y., Ebina E., Sugizaki T., Aarii H., Chikira M., Selvi P. T. ve Palaniandavar M., Copper(II) Complexes of 1,10-phenanthroline-derived Ligands: Studies on DNA Binding Properties and Nuclease Activity, Journal of Inorganic Biochemistry, 99 (2005) 1205–1219.
60. Liu C., Wang M., Zhang T. ve Sun H., DNA Hydrolysis Promoted by di- and multi-Nuclear Metal Complexes, Coordination Chemistry Reviews, 248 (2004) 147–168.
61. Ruiz P., Ortiz R., Perello L., Alzuet G., Alvarez M. G., Gonzalez M. L. ve Ruiz F. S., Synthesis, Structure, and Nuclease Properties of Several Binary and Ternary Complexes of Copper(II) with Norfloxacin and 1,10 Phenanthroline, Journal of Inorganic Biochemistry, 101 (2007) 831–840.
62. Wang, X., Chao, H., Peng, B. ve Ji, L., Synthesis, DNA Binding and Oxidative Cleavage Studies of an Asymmetric Tridentate Copper(II) complex, Transition Metal Chemistry, 32 (2007) 125–130.
63. Abbasoğlu, R. ve Yılmaz, S. S., The Quantum Chemical Investigation of Antitumor Ellipticine Alkaloid and Its Derivatives, Proceedings of ICNP-2002, Trabzon/TÜRKİYE, 286–289.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Arsin Merkez İlkokulu'nda, ortaokulu Trabzon Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda ve liseyi Trabzon Fatih Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında K.T.Ü. Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2005 yılında lisans öğrenimini tamamlayıp Kimyager ünvanı ile mezun oldu. 2006 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına girdi. Yabancı Dili İngilizcedir.