

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**NÜKLEOLİTİK SENZİM DİZAYNI ve NÜKLEİK ASİTLERLE ETKİLEŞİMİNİN
İNCELENMESİ**

Kimyager Nagihan SAĞLAM

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

“Yüksek Lisans (Kimya)”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

96795

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.08.2000

Tezin Savunma Tarihi : 31.08.2000

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Saadettin GÜNER

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Y. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Trabzon 2000

**TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖNSÖZ

“Nükleolitik Senzim Dizaynı ve Nükleik Asitlerle Etkileşiminin İncelenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya ve Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Lisans Üstü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen, bu çalışmanın yüksek lisans tezi olarak seçiminde ve gerçekleşmesinde değerli zamanlarını ayırarak bana yön veren, ayrıca benden düşünsel desteğini ve güler yüzünü hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Saadettin GÜNER’e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Sabriye DÜLGER’e, sayın hocalarım Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Doç. Dr. Serdar KARABÖCEK’e, Kimya ve Biyoloji bölümündeki değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve bundan sonra da olacaklarına inandığım aileme sevgilerimi sunar, çok teşekkür ederim.

Nagihan SAĞLAM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Nükleik Asitler ve Nükleik Asitlerle Etkileşimler.....	2
1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri.....	3
1.2.2. DNA-Protein Etkileşimleri ve Nükleolitik Enzimler.....	8
1.2.2.1. Nükleazlar.....	10
1.2.2.2. DNA Polimerazlar.....	11
1.2.2.3. Topoizomerazlar.....	14
1.2.3. DNA ile Küçük Moleküllerin Tersinir Etkileşimleri.....	15
1.2.3.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler.....	17
1.2.3.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri.....	19
1.2.3.3. İnterkalasyon Etkileşimleri.....	23
1.2.4. Nükleaz Enzimleri Dışındaki Nükleolitik Özellikli Moleküller.....	28
1.2.4.1. Doğal Nükleolitik Moleküller.....	28
1.2.4.2. Sentetik Kimyasal Nükleazlar.....	29
1.2.4.3. Kimyasal Nükleazların Kinetiği.....	33
1.2.5. Çalışmanın Bilimsel ve Pratik Önemi.....	34
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	35
2.1. Cihazlar.....	35
2.2. Kimyasal Maddeler.....	35
2.3. Model Suş ve Model Bileşikler.....	36
2.4. Luria-Bertani Besiyerinin Hazırlanması.....	36
2.5. Gece Kültürlerinin Hazırlanması.....	37

2.6. pCYTEXP Plazmid DNA'sının İzolasyonu	36
2.7. Çözeltilerin Hazırlanması	38
2.7.1. Elektroforetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
2.7.2. Spektroskopik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	39
2.8. Nükleolitik Aktivite Deneyleri.....	39
2.8.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Komplekslerin Nükleaz Etkinliklerinin İncelenmesi.	39
2.8.2. Nükleaz Etkinliği Gösteren Kompleksler İçin Uygun Şartların Belirlenmesi.....	40
2.8.2.1. İnkübasyon Zamanının Nükleaz Etkinliğine Etkisi.....	40
2.8.2.2. Kompleks Konsantrasyonlarının Nükleaz Etkinliğine Etkisi	41
2.8.2.3. Ortamın pH Değerinin Nükleaz Etkinliğine Etkisi	41
2.8.3. Spektroskopik Çalışmalar	42
3.BULGULAR.....	43
3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları	43
3.1.1. Kompleks-DNA Etkileşiminin Konsantrasyona Bağımlılığı.....	45
3.1.1.1. Uzun Reaksiyon Sürelerinde Kompleks Konsantrasyonlarının Etkisi	46
3.1.1.2. Kısa Reaksiyon Sürelerinde Kompleks Konsantrasyonlarının Etkisi	48
3.1.2. Kompleks-DNA Etkileşiminin Zamana Bağımlılığı	53
3.1.3. Kompleks-DNA Etkileşiminin pH Bağımlılığı.....	57
3.2. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi Çalışmaları	62
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	65
5. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Bu çalışmada yeni bir oksim ligandının homodinükleer bakır (K1), heterodinükleer bakır-mangan (K2) ve homotrinükleer bakır (K3) komplekslerinin nükleolitik özellikleri, nötral agaroz elektroforezi ve görünür bölge spektrofotometrisi yardımıyla araştırıldı. Her üç kompleksin de MMPP yokluğunda, ayrıca MMPP'nin de yalnız başına pCYTEXP plazmid DNA'sı üzerinde bir etki yapmadığı, dolayısıyla kompleks ve MMPP varlığında gözlenen aktivitenin komplekslerden kaynaklandığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Özellikle 0.1 μM 'dan daha düşük konsantrasyonlarda K1 ve K2 süpersarmal DNA üzerinde kırıklar oluşturmuş, 0.1 μM ve daha yukarısındaki konsantrasyonlarda ise doğrusal DNA formlarının baskın olduğu görülmüştür. K3 ise böyle bir nükleolitik aktiviteyi ancak 100 μM civarında sağlaması K3'ün diğer iki komplekse göre daha zayıf bir kimyasal nükleaz olabileceği sonucunu göstermektedir. Konsantrasyon bağımlı bu nükleolitik özellikler, komplekslerin etkin konsantrasyonlarında ve ilk 5 dakikalık reaksiyon sürelerinde süpersarmal DNA formunun tamamen kırık formuna dönüşmesi ve ilerleyen sürelerde bu form üzerinden doğrusal formun oluştuğunun gözlenmesi, her üç kompleksin de benzer mekanizmalarla etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Komplekslerin nükleolitik etkinliklerinin pH bağımlılıkları incelendiğinde yine K1 ve K2'nin oldukça benzer davranış gösterdikleri görülmüştür. K3 ise yine K1 ve K2'den daha farklı bir pH bağımlı nükleolitik etkinlik göstermiştir.

pCYTEXP DNA'sı üzerinde çalışılan komplekslerin nükleolitik etkinlikleri spektroskopi ile de tespit edilmiştir. Bu komplekslerin görünür bölge spektrumlarındaki bazı sinyallerde DNA ilavesi ile kaymaların olması ve absorbanstaki değişimler kompleksler ile DNA arasında bir interkalasyon ihtimalinin zayıf olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, dinükleer kompleksler (K1 ve K2) oldukça benzer kimyasal yapıları da dikkate alınarak birbirine yakın ve muhtemelen benzer mekanizmalarla nükleolitik etkinlik gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Daha çok bir fizibilite niteliğinde olmasına rağmen elde edilen sonuçların oksim esaslı DNA parçalayan moleküllerin ve antikanser maddelerin dizaynında yeni düşüncelerin ortaya çıkmasını sağlayacağı açıktır.

Anahtar Kelimeler:Oksim, Nükleik Asit, Bakır(II), Süpersarmal DNA, Nükleaz

SUMMARY

Design of Nucleolytic Synzymes and Their Interactions with Nucleic Acids

In this study, nucleolytic capabilities of the complexes of a novel oxime-type ligand, homodinuclear copper (K1), heterodinuclear copper-manganese (K2) and homotrimeric copper (K3) complexes were investigated by neutral agarose gel electrophoresis and visible spectrophotometry. All the complexes in the absence of MMPP had no nucleolytic activity on the pCYTEXP. Therefore, it is obvious that the observed nucleolytic activities in the presence of MMPP were originated from the nature of the complexes.

K1 and K2 especially at below 0.1 μM nick the supercoiled DNA however at their greater concentrations linear forms were dominant. K3, however, has shown such nucleolytic activity at approximately 100 μM indicating that its activity is weaker than the other two complexes. At efficient concentrations of the complexes, within the first 5 minutes of reaction period all the supercoiled form transformed to the nicked form and then linear forms were formed. These results show that all of the complexes perform their nucleolytic activities by similar mechanisms. K1 and K2 have also shown very similar pH-dependent nucleolytic profiles but different than K3.

The nucleolytic efficiencies of the examined complexes on the pCYTEXP DNA were also investigated by spectroscopy. Absorbance changes and very small shifts of some specific signals on the visible spectra of all the complexes indicate a weak possibility of intercalation with the DNA.

It can be concluded by taking the chemical structures of the complexes into consideration that the complexes K1 and K2 possess potential nucleolytic efficiencies by similar mechanisms. The results obtained in this preliminary study should give new ideas on the molecular design of DNA cleaving molecules and anticancer agents having oxime functionalities.

Key Words: Oxime, Nucleic Acid, Copper(II), Supercoiled DNA, Nuclease

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. DNA ve RNA nükleotitlerinin genel yapısı.....	3
Şekil 2. DNA ve RNA'da bulunan purin ve pirimidin bazlarının kimyasal yapıları.....	4
Şekil 3. Nükleotitlerin yapısı	4
Şekil 4. Bir RNA zincirinin küçük bir parçası.....	5
Şekil 5. DNA molekülünde uygun bazların birbirleri ile hidrojen bağları vasıtasıyla etkileşimleri sonucu oluşan çift zincirli sekonder yapı	6
Şekil 6. DNA'nın Watson-Crick modeli	7
Şekil 7. DNA moleküllerinin çeşitli halleri.....	8
Şekil 8. DNA'ya bağlanan Cro, λ repressör ve CAP proteinlerinin dimerik yapıları .	9
Şekil 9. <i>EcoRI</i> ve <i>HpaI</i> tarafından DNA sarmalının zincirlerinin karşılıklı olarak ve spesifik nükleotitlerden tanınması ve zıt yönde parçalanması.....	10
Şekil 10. DNA polimerazlar tarafından katalizlenen nükleotit zincir büyüme Reaksiyonu.....	12
Şekil 11. DNA polimeraz I'in 5'→3' ekzonükleaz ve 3'→5' ekzonükleaz Aktivitesi.....	13
Şekil 12. <i>E. coli</i> topoizomerez II (DNA giraz)'nin çemberimsi DNA'nın bağlanma sayısını değiştirmesinin şematik olarak gösterilişi	15
Şekil 13. DNA ile küçük moleküllerin etkileşim türlerinin şematik gösterilişi	16
Şekil 14. Çeşitli türden etkileşimlerle DNA'ya bağlanabilen moleküller.....	17
Şekil 15. Distamisinin kimyasal yapısı	21
Şekil 16. SN 6999 ve klorkinin kimyasal yapıları	22
Şekil 17. DNA ile interkalatif bağlanma yapabilen daunorubisin, doksorubisin, elliptisin ve mitoksantronun kimyasal yapıları	24
Şekil 18. Etidyum bromürün DNA ile interkalasyonu.....	25
Şekil 19. İnterkalasyon yolu ile DNA ile etkileşebilen platin kompleksleri	26
Şekil 20. Çeşitli bisinterkalatörlerin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 21. Bisinterkalasyon yapan bir daunorubisin türevinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 22. Bisinterkalatörlerin muhtemel bağlanma modelleri.....	28
Şekil 23. Sentetik bazı kimyasal nükleazların yapıları	30

Şekil 24. Plazmid DNA'nın süpersarmal, kırık ve doğrusal formları.....	33
Şekil 25. 3-{2-[2-(2-hidroksiimino-1-metil-propilideneamino)-etilamino]-etilimino}-butan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya mangan içeren homonükleer bakır (II) (K1), heterodinükleer bakır- mangan (K2) ve trinükleer bakır (II) (K3) komplekslerinin önerilen kimyasal yapıları.....	44
Şekil 26. K1 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	45
Şekil 27. K2 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	46
Şekil 28. K3 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	46
Şekil 29. K1 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi.....	47
Şekil 30. K2 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi.....	47
Şekil 31. K3 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi.....	48
Şekil 32. Komplekslerin MMPP varlığında düşük konsantrasyonlarının 10 dakikalık reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	49
Şekil 33. Komplekslerin MMPP varlığında yüksek konsantrasyonlarının 10 dakikalık reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	49
Şekil 34. K1 varlığında DNA formlarının dağılımı	50
Şekil 35. K2 varlığında DNA formlarının dağılımı	51
Şekil 36. K3 varlığında DNA formlarının dağılımı	52
Şekil 37. K1 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	53
Şekil 38. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağımlılığı.....	54
Şekil 39. K2 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	55
Şekil 40. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağımlılığı.....	56
Şekil 41. K3 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	56

Şekil 42. K1 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	57
Şekil 43. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	58
Şekil 44. K2 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi	59
Şekil 45. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	60
Şekil 46. K3 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi.....	60
Şekil 47. K3 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	61
Şekil 48. 330 µM K1 kompleksinin 1.2 µM DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponundaki etkileşimi	62
Şekil 49. 22.5 µM K2 kompleksinin 7.6 µM DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponundaki etkileşimi.....	63
Şekil 50. 225 µM K3 kompleksinin 7.6 µM DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponundaki etkileşimi	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Bazı kısıtlayıcı (restriksiyon) endonükleazlar ve bunların dizi özgünlükleri	11
Tablo 2. K1 varlığında DNA formlarının dağılımı	50
Tablo 3. K2 varlığında DNA formlarının dağılımı	51
Tablo 4. K3 varlığında DNA formlarının dağılımı	52
Tablo 5. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağımlılığı	53
Tablo 6. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağımlılığı	55
Tablo 7. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	58
Tablo 8. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	59
Tablo 9. K3 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı	61

SEMBOLLER DİZİNİ

A	: Adenin
Abs.	: Absorbans
C	: Sitozin
CAP	: Katabolit gen aktivator proteini
Cro	: Repressör ve diğer genlerin kontrolünü sağlayan protein
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozit trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
G	: Guanin
kb	: Kilo baz
Kd	: Ara ürün ayrışma sabiti
LB	: Luria-Bertani besiyeri
MMPP	: Monomağnezyum peroksifalat
Naz	: Nükleaz
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
PP _i	: Pirofosfat
RNA	: Ribonükleik asit
T	: Timin
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetikasit
tRNA	: Transfer ribonükleik asit
U	: Urasil
UV	: Ultraviyole
Å	: Angstrom

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yaklaşık son 20 yıl içinde deoksiribonükleik asit (DNA) makromolekülü ile hücre proteinlerinin genetik bir program dahilinde nasıl bir iletişim kurdukları konusu üzerine ilgi oldukça artmıştır. Bunun sebeplerinden birisi de canlı organizmaların büyüme ve gelişme düzenlerini ve mekanizmalarını ortaya koymaktır. Pek çok proteinin nükleik asitlerle kovalent olmayan yollarla etkileştikleri bilinmektedir. Bu etkileşimlerde proteinler ya ökaryotik kromatinde görev yapan histonlar şeklinde yapısal elemanlar olarak ya da DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve rekombinasyonu gibi oldukça önemli biyolojik işlemlerde görev yapan kompleks hücre sistemlerinin birer elemanı olarak rol oynarlar. DNA-histon etkileşimleri daha ziyade histon moleküllerindeki bazik pozitif yüklü amino asit yan zincirleri ile nükleik asit zincirinin negatif yüklü şeker-fosfat iskeleti arasında gerçekleşirler. Ancak, kalıtım ve genetik bilginin seçimli bir şekilde okunması için gerekli olan proteinlerin DNA ile etkileşimleri ise oldukça dizi-bağımlıdır. Bu dizi-bağımlı etkileşimler ise polipeptit zinciri ile DNA molekülünün küçük (minor) ve büyük (major) oluklarındaki baz çiftlerinin dışarı doğru uzanan kısımları arasında doğrudan temas ile gerçekleşirler (Papavassiliou, 1995). DNA moleküllerinin proteinlerle olan teması, DNA'da mevcut olan nükleotit dizisine de bağımlı olmak üzere hidrojen bağı, van der Waals, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerle sağlanır. Proteinlerle bu türden doğrudan etkileşimlere bağlı olarak DNA zincirlerinde bükülme veya eğilme olarak tanımlanan çeşitli konformasyonel değişimler gerçekleşir (Lehninger, vd., 1993). DNA yapısını ve konformasyonunu sağlayan deoksiriboz konformasyonu ve fosfat-fosfat mesafesi (oluk hacmi) gibi pek çok parametre proteinlerle olan etkileşimler sonucu önemli derecede değişime uğrar.

Proteinlerle etkileşimlerinin bir sonucu olarak nükleik asitler üzerinde gerçekleşen yapısal değişimlerin belirlenmesi protein-DNA komplekslerinin biyolojik fonksiyonlarının ve mekanizmalarının aydınlatılması açısından oldukça önem arz eder. Bu moleküler yapıların ve değişikliklerin ortaya konması kristalografik ve/veya NMR analizlerini gerektirir. Ancak son yıllarda DNA iskeletini doğrudan veya dolaylı olarak kırma yeteneğine sahip olan enzim gibi katalitik özellik gösteren kimyasal maddelerin

geliştirilmesi ve uygulanması ile çeşitli DNA-protein sistemlerinin detaylı yapısal resimleri elde edilebilmiştir. “Ayakizi analizi” olarak tanımlanan bu teknikte protein ile etkileşmiş DNA bir kimyasal nükleaz ile daha küçük parçalara ayrılır ve bu oligonükleotit parçaları jel elektroforezi ile analiz edilip böylece DNA-protein kompleksinin oluşumunda özel öneme sahip DNA bölgeleri tespit edilir (Sigman, Chen, 1990; Papavassiliou, 1995).

Nükleik asitler proteinler yanında; su, küçük organik moleküller, metal iyonları ve komplekslerini de içeren pek çok kimyasal tür ile dönüşümlü olarak etkileşirler. Bu dönüşümlü etkileşimler DNA yapı ve fonksiyonu için oldukça önemlidirler ve nükleik asitlerin çeşitli konformasyonlarının kararlı yapılması bu moleküllerle sağlanır. Dolayısıyla DNA ile etkileşen suyun konsantrasyonu, tuz konsantrasyonundaki (iyonik güç) değişimler ve organik moleküllerle etkileşimler sonucu nükleik asitlerde olağanüstü yapısal değişimler olur (Blackburn, Gait, 1990).

Günümüzde kanser ile bazı viral hastalıklara karşı uygulanan ilaç geliştirme ve kemoterapi işlemlerinde kullanılan çeşitli ilaçlar, karsinojenler ve kompleks antibiyotikler genellikle nükleik asitlerle dönüşümlü etkileşirler. DNA ile etkileşen daunorubisin gibi doğal antibiyotikler ve mitoksantron gibi sentetik ilaçlar çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleik asitlerle etkileşimlerin araştırılmasında mevcut ilaçların etki şeklini anlamak ve daha etkin ilaçların geliştirilmesini sağlamak sürücü güç olmuştur. Nükleik asitleri tanıyan ilaçlar ve yüksek düzeyde dizi özgünlüğü gösteren potansiyel nükleazlar olarak sentetik oligopeptitler ve oligonükleotitlerin dizayn edilmesi oldukça ilgi çekmektedir. Küçük moleküllerle etkileşiminin basitliğinden dolayı nükleik asitlere bağlanma özgünlüğü, ligandla-indüklenmiş konformasyonel değişimler, bağlanmada kooperativitenin moleküler temeli, aromatik amino asit yan zincirlerinin nükleik asit bazları ile etkileşimi ve diğer nükleik asit etkileşimlerinin özellikleri konusunda oldukça kapsamlı bilgiler elde edilmiştir (Barton, 1986; Blackburn, Gait, 1990; Krugh, 1994; Kaim, Schwederski, 1994).

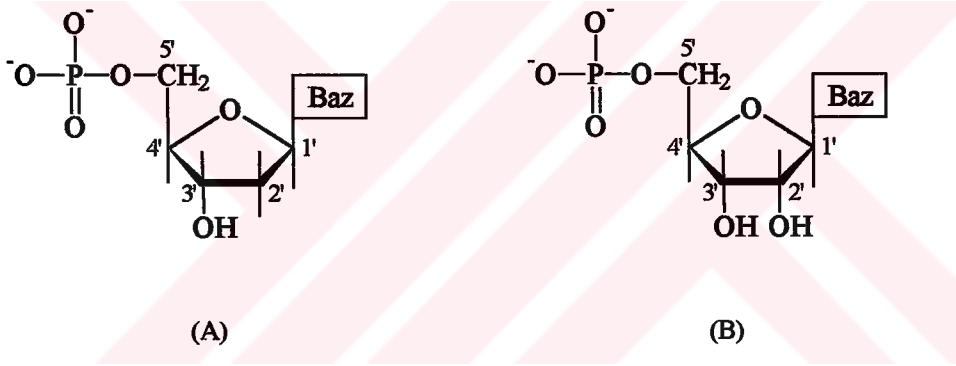
1.2. Nükleik Asitler ve Nükleik Asitlerle Etkileşimler

Genetik madde hücre fonksiyonu için oldukça önemlidir ve hücrenin yapısı, fonksiyonu ve çoğalması için gerekli olan bir takım temel hücre gereksinimlerini yerine getirecek bilgileri içermek zorundadır. Bu bilgi genetik maddenin nükleotit bazı olarak tanımlanan yapı bloklarından kodlanmaktadır. Genetik maddenin doğru bir şekilde

kopyalanması mümkün olmalıdır. Hücrelerin yapısı ve fonksiyonu için gerekli molekülleri üretmek için genetik maddede kodlanan bilgi deşifre edilebilir olmalıdır. DNA ve ribonükleik asit (RNA) bütün bu temel gereksinimleri karşılamaktadır (Lehninger, vd., 1993).

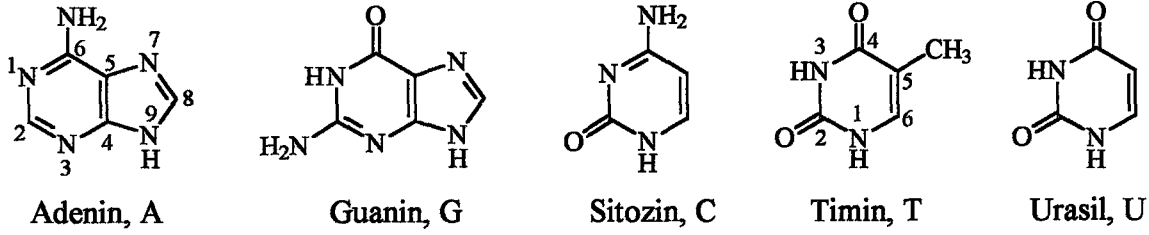
1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri

DNA ve RNA şeklindeki nükleik asitler monomerik nükleotit ünitelerinden oluşturulan lineer polimerik makromoleküllerdir. Bir nükleotit üç bileşenden oluşur. Bunlar; bir purin veya pirimidin türevi olan azot içeren bir baz, bir pentoz şekeri ve bir veya birden fazla fosfat grubudur. Bu polimerik yapılarda heterohalkalı purin veya pirimidin bazları, bir fosfat veya polifosfat grubuna fosfoester köprüsü ile bağlı bir pentoz şekerine bir glikozil bağı ile bağlıdır (Şekil 1) (Lehninger, vd., 1993).



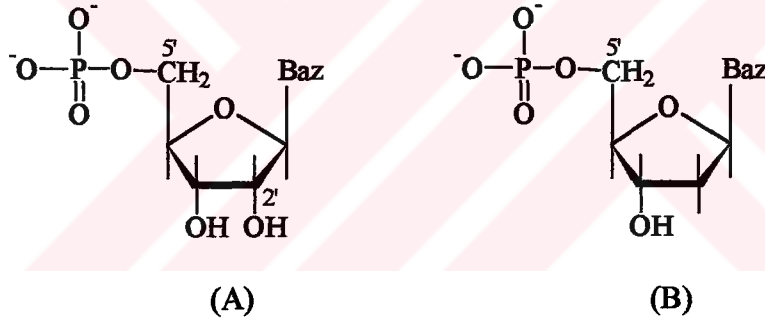
Şekil 1. DNA ve RNA nükleotitlerinin genel yapısı. A) Deoksiribonükleozit 5'-monofosfat (DNA'nın monomerik ünitesi), B) Ribonükleozit 5'-monofosfat (RNA'nın monomerik ünitesi)

Azot içeren purinler adenin (A) ve guanin (G) iken, pirimidinler ise sitozin (C), timin (T) ve urasil (U)'dir (Şekil 2). DNA molekülleri bu bazlardan adenin, guanin, sitozin ve timini; RNA molekülleri ise adenin, guanin, sitozin ve urasili içerir. Bu bazlar nükleik asitlerdeki temel bazlar olmasına rağmen bazı mikroorganizma, bakteri ve virüs transfer RNA (tRNA) moleküllerinde az miktarlarda da olsa bazı purin ve pirimidin türevleri bulunmaktadır. DNA molekülündeki bazlar ve baz sıraları genetik bilgiyi belirler ve fonksiyonel bir biyolojik molekülün sentezi için gerekli olan bilgiyi içeren DNA parçasına "gen" denir (Lehninger, vd., 1993).



Şekil 2. DNA ve RNA'da bulunan purin ve pirimidin bazlarının kimyasal yapıları

Nükleotitler bazlar yanında D-riboz veya D-2-deoksiriboz adı verilen iki tür şeker bileşeninden birini de içerirler. D-2-deoksiriboz molekülünün 2 pozisyonunda hidroksil grubu yerine bir hidrojen atomu bulunur. RNA molekülleri riboz, DNA molekülleri ise deoksiriboz moleküllerini içerirler. Bir nükleotit molekülü ribozun veya deoksiribozun genellikle 5' pozisyonundaki alkol grubu ile esterleşmiş bir veya daha fazla fosfat grubu içerir (Şekil 3).

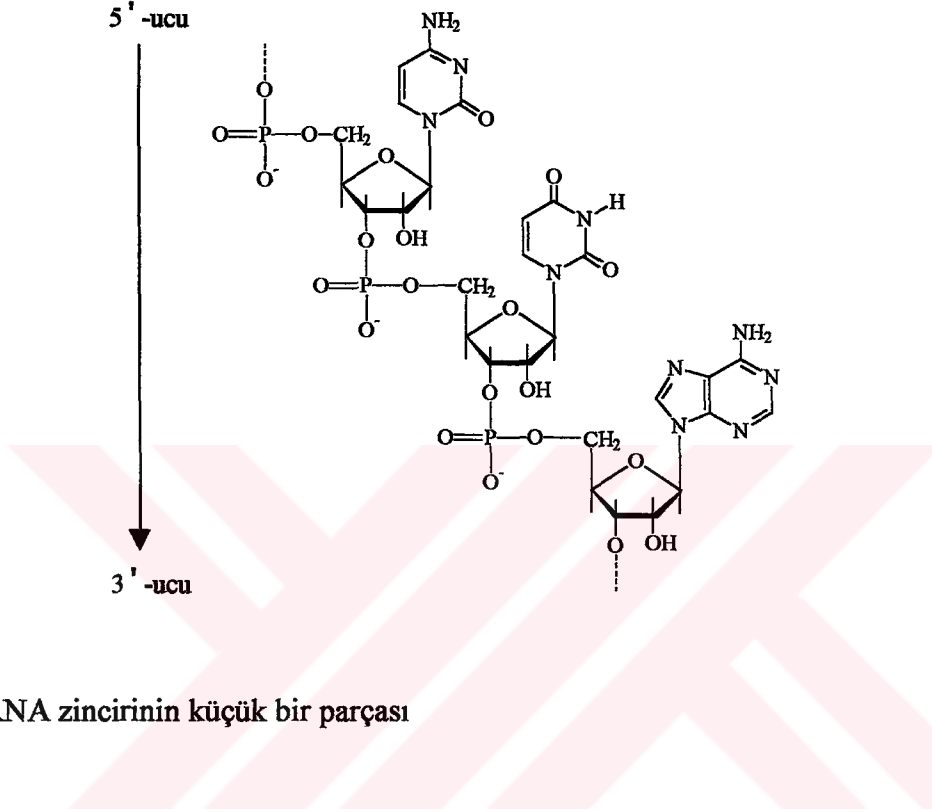


Şekil 3. Nükleotitlerin yapısı. A) Ribonükleozit 5'-fosfat, B) Deoksiribonükleozit 5'-fosfat

Genetik bilgi DNA moleküllerinin primer yapısında depolanır. Nükleik asitlerin primer yapısı nükleotit sırası ve nükleotit monomerlerin 5'→3' yönünde kovalent bağlarla birbirine bağlanmaları ile oluşur. Primer yapıdaki kovalent fosfodiester bağları ardarda gelen nükleotidleri birbirine bağlar. Spesifik olarak bir nükleotit birimindeki 5'-hidroksil grubu bir sonraki nükleotidin 3'-hidroksil grubu ile fosfodiester bağları vasıtasıyla birleştirilir (Şekil 4) (Lehninger, vd., 1993).

Hem DNA hem de RNA zincirleri hidrofiliktir. Şeker birimlerindeki hidroksil grupları su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturur. Polar zincirdeki fosfat grupları düşük pK_a değerine sahip olduklarından pH 7'de tamamen iyonize halde bulunurlar ve negatif

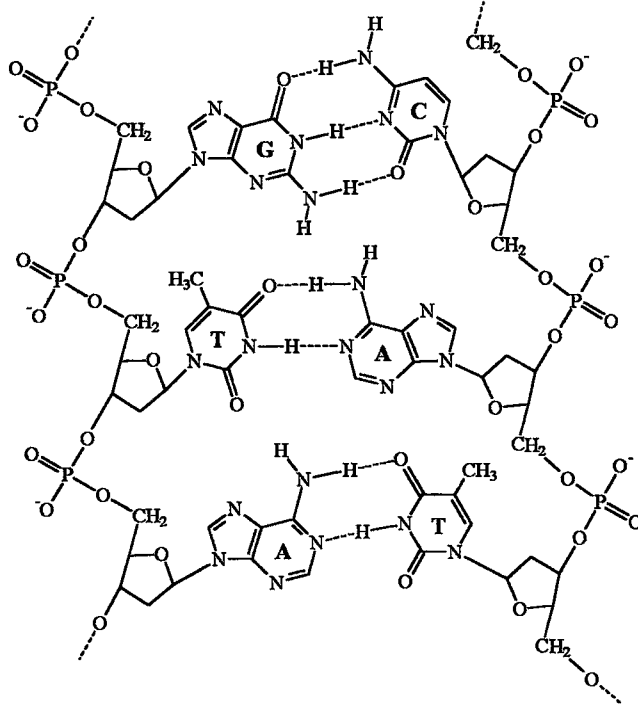
olarak yüklenirler. Bu negatif yükler özellikle proteinlerin, metal iyonlarının ve poliaminlerin pozitif yükleri ile iyonik etkileşimler yaparak nötralleşirler (Lehninger, vd., 1993).



Şekil 4. Bir RNA zincirinin küçük bir parçası

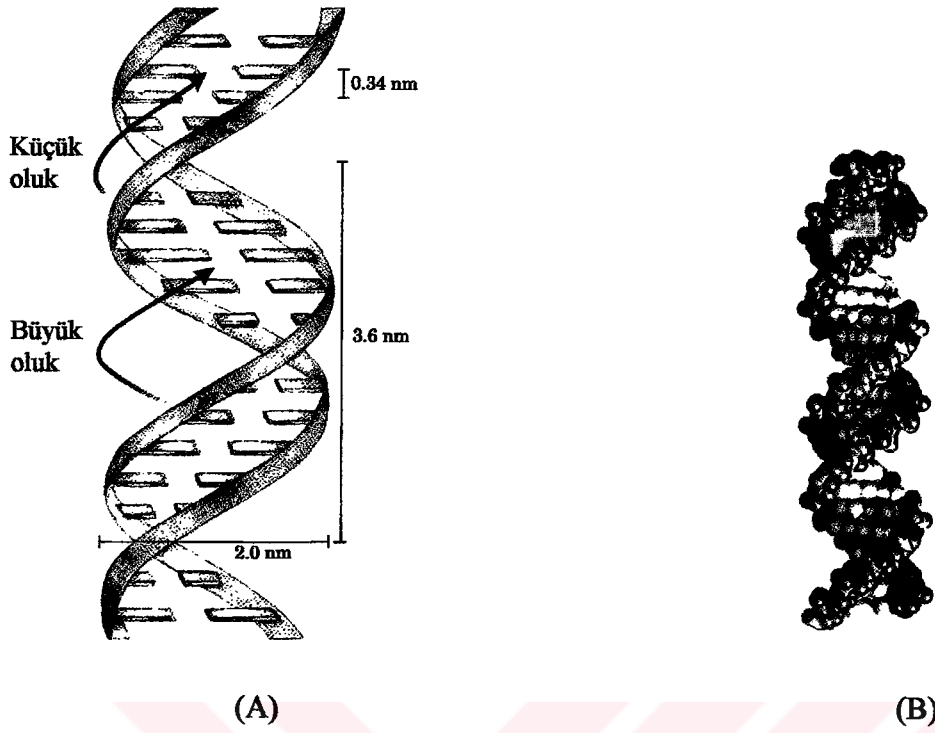
Her canlı hücresinde adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarından belirli miktarlarda bulunmaktadır. Uygun bazlar hidrojen bağları ile birbirlerine bağlanarak eşleşirler. Sekonder yapının meydana gelmesinde baz eşleşmeleri en büyük etkidir. DNA moleküllerinde birbirleriyle eşleşen bazlar, A=T ve G≡C çiftleridir (Şekil 5).

Purin ve pirimidin halkaları aromatikdir ve düzlemsel yapıya sahip olduklarından baz eşleşmesi ile meydana gelen sistemin de tümü düzlemseldir. Bazların arasındaki hidrojen bağlarının uzunluğu yaklaşık 0.30'nm dir. Burada oluşan hidrojen bağları, diğer bileşiklerin verdikleri hidrojen bağlarından daha karardır. Sisteme azot atomlarından bağlanan riboz halkaları da düzlemseldir. Ancak riboz halka düzlemi ile hidrojen bağlı eşleşmiş baz düzlemi arasında yaklaşık 90°'lik açı vardır. Yani bu iki düzlem yaklaşık olarak birbirlerine diktir (Lehninger, vd., 1993).



Şekil 5. DNA molekülünde uygun bazların birbirleri ile hidrojen bağları vasıtasıyla etkileşimleri sonucu oluşan çift zincirli sekonder yapı

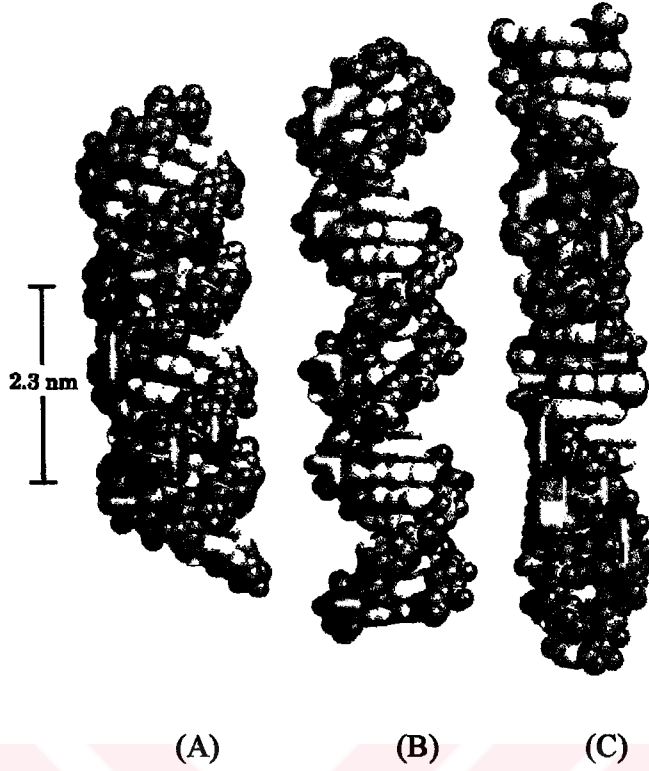
Watson ve Crick, DNA'nın x-ışınları fotoğraflarını inceleyip, DNA hakkında mevcut diğer bilgileri de göz önüne alarak çift zincirli DNA'nın tersiyer yapısı hakkında bir uzay modeli önermişlerdir (Watson, 1953). Bu modele göre DNA molekülü bir çift sarmal halinde iki uzun deoksiribonükleotit zincirinden oluşmaktadır. Bu çift zincirde fosfat-deoksiriboz iskeleti hidrofilik olduğundan sulu ortam ile etkileşecek şekilde çift sarmalın dışında yer alır. Birbirleri ile hidrojen bağlarıyla eşleşen purin ve pirimidin bazları ise sarmalın iç kısmında, sarmalın uzun eksenine dik bir düzlem üzerinde ve her bir eşleşmiş baz çifti birbiri üzerine istiflenmiş olarak düzenlenirler. Böyle bir istiflenme ise eşleşmiş bazların kuvvetli van der Waals etkileşimleri yapmalarını sağlar. Ayrıca, sarmalda yer alan iki zincir birbirine göre antiparalel olarak yönelmişlerdir. Bu düzende, her iki zincirdeki purin ve pirimidin bazları aralarındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulurlar ve birbirine bağlı bu iki DNA iplikçiği uzayda sağ-sarmal şeklinde bükülmüştür. Diğer DNA türleri de bulunduktan sonra bu DNA yapısına B-DNA denilmiştir. Bu çift iplikli sarmalda, biri küçük diğeri büyük olmak üzere iki sarmal oluşu vardır. Büyük sarmal oluşu 3.4 nm'dir, 10 deoksiribonükleotit birimi içerir ve sarmalın çapı 2.0 nm'dir (Şekil 6) (Lehninger, vd., 1993).



Şekil 6. DNA'nın Watson-Crick modeli. A) Sarmalın şematik gösterimi, B) Sarmalın 3-boyutlu gösterimi

Bu B-DNA halinin dışında A-DNA ve Z-DNA olarak tanımlanan iki hali daha vardır (Şekil 7). A-DNA sağ-sarmal yapıdadır ve bir sarmal adımında 11 deoksiribonükleotit bulunur. Küçük ve büyük sarmal olukları birbirine B-DNA'dakinden daha yakındır. B-DNA'da baz eşleşme düzlemleri sarmal eksenine dik durumda iken, A-DNA'da aralarında yaklaşık 20°'lik bir açı vardır. Böylece, B-DNA'da eşleşmiş bazlar sarmalın merkezinde bulunurken, A-DNA'da merkezden kenarlara doğru kaymış durumdadır. Z-DNA ise sol sarmal yapıdadır ve bir sarmal adımında 12 deoksiribonükleotit birimi bulunur (Lehninger, vd. 1993).

Ökaryotlarda DNA'lar nükleoproteinler halinde proteinlerle bağlanmış haldedir. Bu yapılarda RNA'lar da bulunur ve buna "kromatin" denir. Kromatinlerin oluşturduğu kuaterner yapılara "kromozom" denilir ve nükleusta bulunur. Prokaryotlarda ise DNA çift sarmalı küçük bir RNA üzerine sarılmış ve bir ucundan hücre membranına bağlanmış durumdadır ve belirli bir düzene sahip olmaksızın sitoplazmada bulunur.



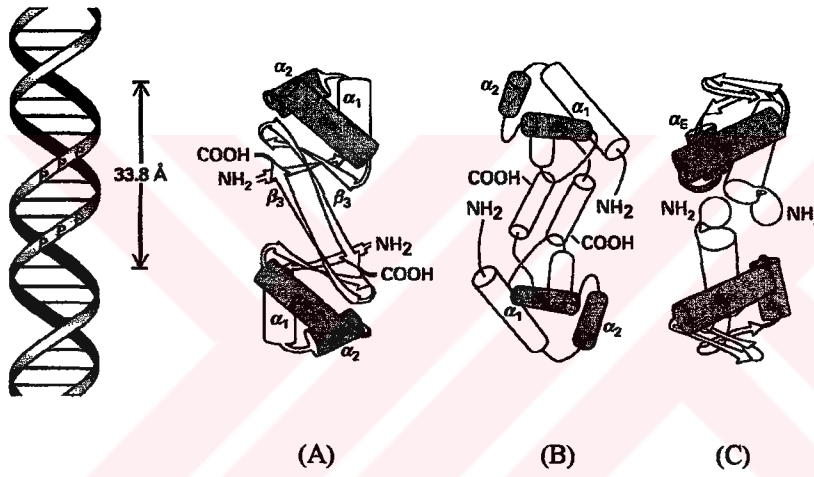
Şekil 7. DNA moleküllerinin çeşitli halleri. A) A-DNA, B) B-DNA ve C) Z-DNA

1.2.2. DNA-Protein Etkileşimleri ve Nükleolitik Enzimler

DNA ile spesifik olarak etkileşen proteinler genellikle genetik bilginin replikasyonu ve ekspresyonunda rol oynadıklarından oldukça önemlidirler. Bu proteinlerden pek çoğu DNA üzerinde A, T, C ve G şeklindeki dört nükleotidin özel dizileri ile tanımlanan çok özel bölgelere bağlanırlar. Bir proteinin çift zincirli DNA molekülündeki farklı nükleotit zincirleri tanıyabilmesi antiparalel zincirlerdeki nükleotitler baz-eşleşmesi (A-T, T-A, G-C, C-G) şeklinde ve çift sarmalın iç kısmında yer aldığından doğrudan gerçekleşmez. Çift sarmalın dış yüzeyi ise sadece şeker-fosfat iskeletinden oluşur ve hemen hemen nükleotit dizisinden bağımsızdır. Çift sarmallı DNA zincirinin tersiyer yapısındaki bir dizisinin proteinler dahil diğer moleküller tarafından tanınabilmesi sarmal boyunca yer alan büyük ve küçük oluklarda baz çiftlerinin organizasyonu ile sağlanır. Sarmalın özellikle büyük oluğundaki eşleşmiş nükleotitlerin sadece dış yüzeye bakan kısımları çözücü ve proteinle karşı karşıya gelir. Bu bölgelerde nükleotitler birbirlerinden esasen içerdikleri polar gruplarla ayırt edilirler. Her bir baz çiftinin bu dışa yönelik kısımları bir proteinin

tanıyabileceği grupların farklı bir düzenini sağlar ve bu gruplar komplementer baz eşleşmesinde kullanılmazlar (Lehninger, vd., 1993).

Nükleik asitlerde olduğu gibi proteinlerin biyolojik fonksiyonları bu moleküllerin doğrudan diğer moleküllerle fiziksel etkileşimlerine bağlıdır. Gerçekte hücrenin temas haline geldiği her bir madde, bazı proteinler tarafından tanınır ve bağlanır. Özellikle nükleik asitlerle replikasyon ve ekspresyon aşamalarında daha büyük kompleksler oluşturarak çok sıkı ve özgün bir şekilde bağlanırlar. Bir bakteri üzerinde büyüyen lamda (λ) virüsünün repressör proteini, Cro adı verilen bir regülatör proteini ve CAP adlı katabolit gen aktivatör proteini ile DNA arasındaki etkileşimler üzerinde en çok çalışılan örneklerdir (Şekil 8) (Ptashne, 1987, Creighton, 1993).

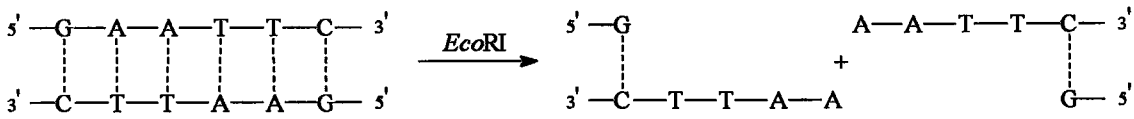


Şekil 8. DNA'ya bağlanan üç proteinin dimerik yapıları. A) Cro, B) λ repressör, C) CAP

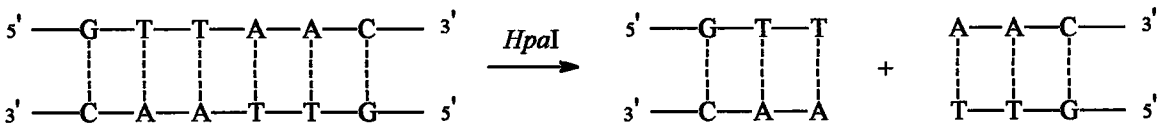
Nükleik asit molekülleri hücrelerde çok çeşitli türden reaksiyonlara maruz kalırlar. Genellikle bu moleküllerin modifiye edildiği veya modifikasyonun uzaklaştırıldığı transfer reaksiyonları, polimerizasyon ve depolimerizasyon reaksiyonları, hidroliz reaksiyonları veya yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları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

1.2.2.1. Nükleazlar

Nükleik asitlerle etkileşip parçalayabilme yeteneği olan enzimlere “nükleaz” adı verilir. Nükleazlar çeşitli şekilde sınıflandırılabilirler. Deoksiribonükleik asitleri spesifik olarak hidroliz eden nükleazlara “deoksiribonükleazlar”, ribonükleik asitleri spesifik olarak hidroliz edenlere ise “ribonükleazlar” denir. Bu her iki sınıfta ya 3'-hidroksil ve 5'-fosforil uçlarını veya 5'-hidroksil ve 3'-fosforil uçlarını oluşturmak için internal fosfodiester bağlarını parçalayabilen enzimler mevcuttur. Bunlara “endonükleazlar” denir. Bazı nükleazlar çift sarmalın her iki zincirini de hidroliz edebilirken, bazıları da nükleik asitlerin sadece bir tek zincirini hidroliz edebilir. DNA molekülündeki spesifik zincirleri ya da zincirin spesifik bölgelerini tanıyan endonükleazlar mevcuttur ve “restriksiyon endonükleazlar” olarak adlandırılan bu enzimlerin çoğu son yıllarda moleküler genetikte ve tıbbi bilimlerde önemli bir kullanım alanı bulmuştur (Tablo 1) (Winnacker, 1987). Bu enzimler birkaç nükleotit uzunluğundaki palindromik özel DNA dizilerini tanır ve DNA'nın her iki zincirini de 3'-hidroksil ve 5'-fosforil uçlarını verecek şekilde kırarlar. Meselâ, *EcoRI* endonükleazı, palindromik olan GAATTC dizisini (Şekil 9A) ve *HpaI* ise GTTAAC dizisini (Şekil 9B) farklı zincir uçları oluşturacak şekilde karşılıklı olarak zıt yönlerden her iki zinciri de tanıma ve diziyi karşılıklı olarak dizinin simetrik olmadan nükleotitler arasındaki fosfoester bağı kırabilme yeteneğine sahiptirler.



(A)



(B)

Şekil 9. *EcoRI* (A) ve *HpaI* (B) tarafından DNA sarmalının zincirlerinin karşılıklı olarak ve spesifik nükleotitlerden tanınması ve zıt yönde parçalanması

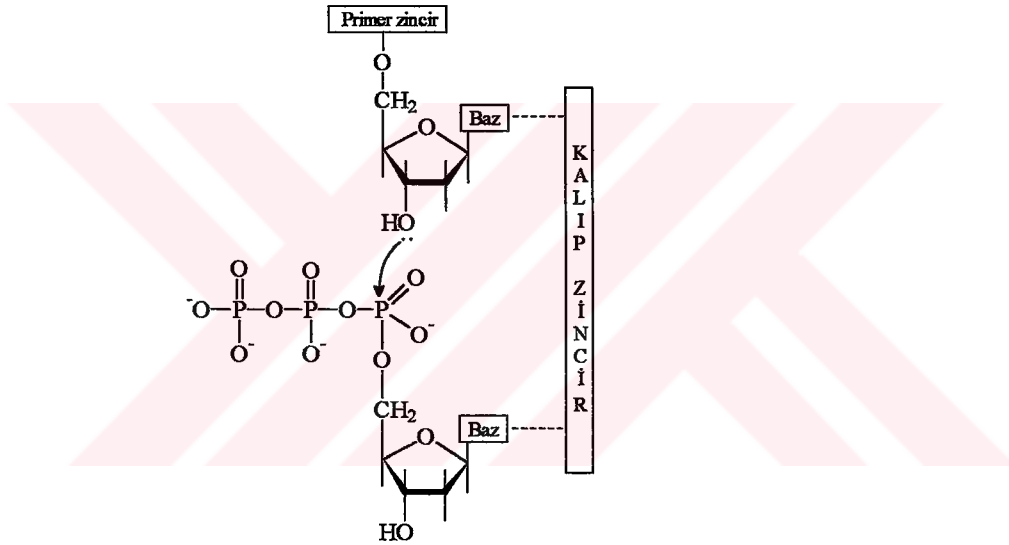
Tablo 1. Bazı kısıtlayıcı (restriksiyon) endonükleazlar ve bunların dizi özgünlükleri

Ekzonükleaz	Parçalanmış DNA Dizisi	Bakteriyal Kaynak
Bam HI	↓ GGATCC CCTAGG ↑	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
Eco RI	↓ GAATTC CTTAAG ↑	<i>Escherichia coli</i> RY13
Eco RII	↓ CCTGG GGACC ↑	<i>Escherichia coli</i> R245
Hind III	↓ AAGCTT TTCGAA ↑	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
Hha I	↓ GCGC CGCG ↑	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hpa I	↓ GTTAAC CAATTG ↑	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Pst I	↓ CTGCAG GACGTC ↑	<i>Providencia stuartii</i> 164
Taq I	↓ TCGA AGCT ↑	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

1.2.2.2. DNA Polimerazlar

Bazı nükleazlar, sadece bir nükleik asit molekülü zincirinin sonunda bulunan nükleotidi hidroliz ederler ve bu enzimler “ekzonükleazlar” olarak adlandırılırlar. Ekzonükleazlar genellikle bir yönde (ya 3'→5' ya da 5'→3') etkindirler

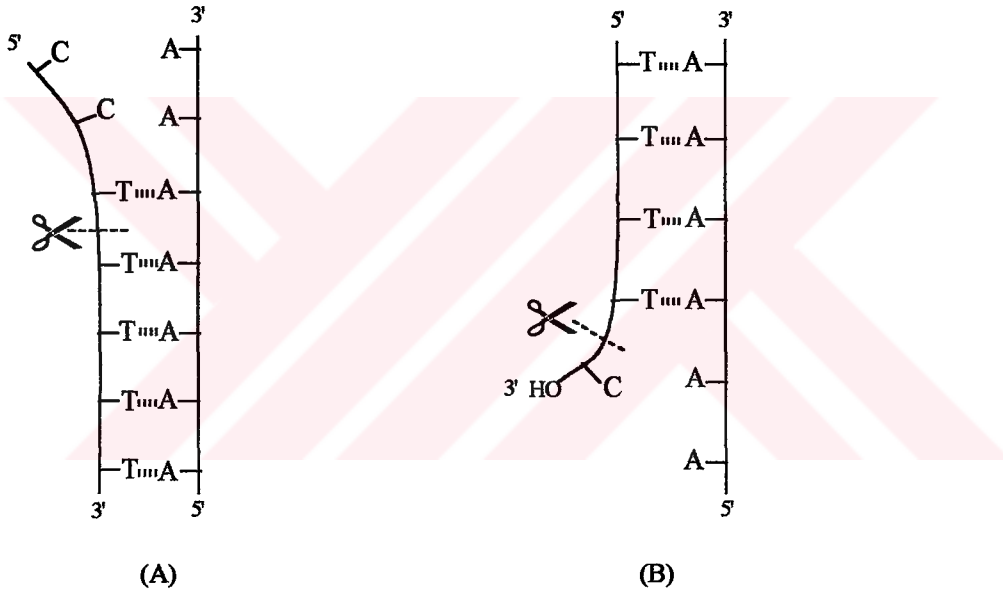
(Winnacker, 1987, Lehninger, vd., 1993). DNA polimeraz (deoksinükleotidiltransferaz) adı verilen enzimler bu türden fonksiyon gösterebilmektedirler. DNA'nın replikasyonu sırasında yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesinde en önemli rolü bu enzim oynar. DNA polimeraz I, yeni bazların ilavesi için bir kalıp görevi gören DNA çift sarmalının bir zincirine ihtiyaç duyar. Yeni DNA sentezi için ayrıca deoksiribonükleozit trifosfatlara (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), bir RNA primerine ve Mg^{+2} iyonlarına ihtiyaç vardır. DNA polimeraz I mononükleotit birimlerinin yeni ve büyüyen DNA zincirinin serbest olan 3'-pozisyonlarına basamaklı bir şekilde katılmasını yani polimerizasyonunu katalizler ve bu sentez işlemi 5'→3' yönünde gerçekleşir (Şekil 10). Bir sentez işlemi olduğundan endergonik bu katılma reaksiyonu için gerekli enerji deoksiribonükleotit trifosfatlardan pirofosfat (PP_i) ayrılmasıyla açığa çıkan enerjiden sağlanır.



Şekil 10. DNA polimerazlar tarafından katalizlenen nükleotit zincir büyüme reaksiyonu

DNA polimeraz I ayrıca iki ilave enzim aktivitesine daha sahiptir ve bunlar 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi ile 5'→3' ekzonükleaz aktivitesidir (Şekil 11). 3'→5' Ekzonükleaz aktivitesi zincirin 3'-ucundan başlanıp 5'-ucuna doğru nükleotitlerin basamaklı hidrolizini içerir. Ancak enzim çift sarmalın bir parçası olmayan ve 3'-ucunda serbest olarak bulunan bir nükleotide gereksinim duyar. Bu ekzonükleaz, büyüyen DNA zincirine ilave edilen yeni bazların doğruluğunu kontrol etme özelliği vardır. 5'→3' Aktivitesi ise DNA çift sarmalının bir parçası olan ve zincirdeki bir 3', 5'-fosfodiester

bağının hidrolizini katalizler. $5' \rightarrow 3'$ Ekzonükleaz aktivitesi $3' \rightarrow 5'$ aktivitesinden birkaç noktada farklıdır. Bunlardan biri hidrolizlenen bağ, DNA'nın çift sarmallı bölgelerinde bulunur. Diğeri ise, hidrolizlenme $5'$ -ucundaki fosfodiester bağında veya zincirin iç kısımlarında bulunan serbest bir hidroksil grubu içeren bir bağda meydana gelebilir. Ayrıca bu aktivite o anda gerçekleşen DNA sentezi ile arttırılır. Diğeri bir özelliği de, bu aktiviteyi sağlayan bölgenin enzim üzerindeki diğeri iki aktif bölgeden (polimeraz ve ekzonükleaz) farklı bir bölgede olmasıdır. $5' \rightarrow 3'$ Aktivitesinin bu özellikleri ile polimeraz enzimi DNA replikasyonunda hatayı bulup onu düzelterken bir özellik gösterir. Kısaca bu enzim DNA zincirlerinin polimerizasyonunu katalizlediği gibi DNA üzerinde bulunan bir parçanın onarım işlemi gereğince uzaklaştırılmasını da sağlar.



Şekil 11. DNA polimeraz I'in (A) $5' \rightarrow 3'$ ekzonükleaz ve (B) $3' \rightarrow 5'$ ekzonükleaz aktivitesi

E. coli'de bu enzime ilave olarak DNA polimeraz II ve III adı verilen iki polimeraz daha bulunur. Yapılan *in vitro* çalışmalarda bu enzimlerin DNA polimeraz ile ortak bazı özelliklerinin olduğu bulunmuştur. Bunlar; 1) Bir kalıba bağlı olarak dNTP'den DNA'nın sentezini katalizlerler. 2) Bu işlemlerde serbest $3'$ -ucuna sahip bir primer gereklidir. 3) Sentez işlemi $5' \rightarrow 3'$ yönünde gerçekleşir. 4) Bu enzimler $3' \rightarrow 5'$ ekzonükleaz aktivitesine sahiptirler.

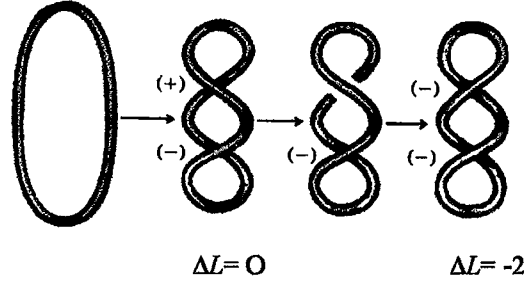
1.2.2.3. Topoizomerazlar

Nükleik asit moleküllerinin normal biyolojik fonksiyonu sadece uygun bir topolijik hali sağlandığında gerçekleşir. RNA transkripsiyonu, DNA replikasyonu ve genetik rekombinasyon gibi temel biyolojik işlemlerde bir baz dizisinin tanınması komplementer polinükleotit zincirin bölgesel ayrılmasını gerektirir. Eğer DNA uygun süpersarmal baskıdan yoksun ise yukarıda verilen hayati işlemler oldukça yavaş gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez.

Süpersarmal yapı, kovalent olarak kapalı çemberimsi çift zincirli DNA molekülünün biyolojik olarak önemli topolojik özelliklerinden birisidir. Süpersarmal DNA çift sarmalın farklı bölgelerinin birbiri üzerine sarılması ile oluşan çok genel bir DNA tersiyer yapısı olarak tanımlanır. Her hücrede, DNA süpersarmal yapısı DNA metabolizmasını bir çok bakımdan etkileyen tam olarak düzenlenmiş bir yapıdır. Dolayısıyla süpersarmallık DNA'nın tersiyer halini tamamen değiştirir. Süpersarmal bir DNA molekülü aynı uzunluktaki gevşek halinden daha sıkı bir halde bulunduğu santrifüj edildiğinde veya elektroforezinde çok daha hızlı hareket eder.

Çemberimsi bir DNA molekülünün ana topolojik özelliği çift sarmalda bulunan bir zincirin diğeri etrafında sağ-el yönünde yaptığı tam bir dönüş sayısı (L)'dır. Sadece bu dönüş sayısı açısından farklılık gösteren moleküller "topolojik izomerler" veya "topoizomerler" olarak bilinirler. DNA topoizomerleri sadece bir veya her iki DNA zincirinin kesilmesiyle birbirlerine dönüştürülebilirler. Süpersarmal DNA, çeşitli endonükleazlarla çift sarmal DNA'nın bir polinükleotit zincirindeki fosfodiester bağının hidrolizlenmesiyle gevşek (relaxed) çember hallerine dönüştürülebilir. Bir zincirdeki tek bir kırık süpersarmal bir DNA'yı gevşetmek için yeterlidir. DNA'nın süpersarmallığını kontrol eden enzimler "topoizomerazlar" olarak bilinirler. Bu enzimler esasen çemberimsi DNA'nın kovalent yapısını değiştirmeden topolojik halini değiştirirler. Her bir hücrede tek amacı DNA'yı açmak veya gevşetmek olan bu enzimler DNA'nın gevşeme derecesini arttıran veya azaltan yeteneklere sahiptirler. Bu enzimler özellikle replikasyon olaylarında önemli bir rol oynarlar. İki sınıf topoizomeraz vardır. Tip I topoizomerazlar, iki DNA zincirinden birisini kısa süreli olarak kırarak, bu kırık uçlardan bir tanesini kırılmamış zincirin çevresinde döndürüp kırık uçları tekrar bağlar. Böylece bu topoizomerazlar çift sarmalda bulunan bir zincirin diğeri etrafında yaptığı tam bir dönüş sayısını değiştirirler. Tip II topoizomerazlar ise her iki DNA zincirini de kırarlar ve bunlarda dönüş sayısını

değiştirirler (Lehninger, vd., 1993). DNA giraz olarak da bilinen bu topoizomerazlar endergonik bir işlemi katalizlediklerinden ATP hidrolizine gereksinim duyarlar ve böyle bir enerji kaynağı varlığında DNA'nın süpersarmal derecesini basamaklı bir şekilde değiştirirler. ATP yokluğunda ise bu işlem oldukça yavaş gerçekleşir.



Şekil 12. *E. coli* topoizomeraz II (DNA giraz)'nin çemberimsi DNA'nın düğüm sayısını değiştirmesinin şematik olarak gösterilişi

Bir *E. coli* hücrenin DNA replikasyonunda; replikasyon orjinine bağlanan farklı enzimler ve proteinler vasıtasıyla DNA çift sarmalı açılır. Öncelikle replikasyon orjinine DNA A proteinleri bağlanır ve daha sonra DNA B proteini ile DNA C proteinine bu bölgeye bağlanır. DNA B proteini iki replikasyon çatalı oluşturarak DNA'yı açar. DNA giraz (topoizomeraz II) bu replikasyon işleminde DNA B proteiniyle sarmalın açılması sonucu açılmayan tarafta oluşan sarmal baskıyı giderir (Voet, Voet, 1990).

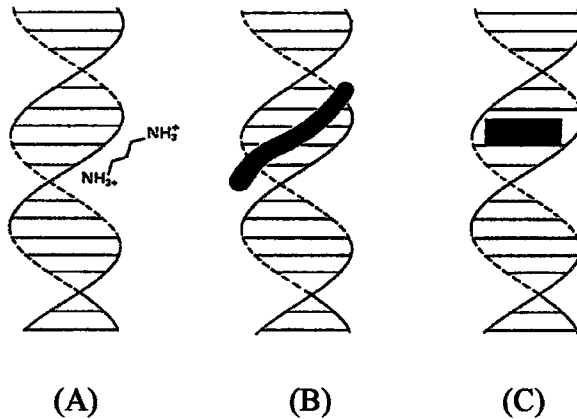
1.2.3. DNA ile Küçük Moleküllerin Tersinir Etkileşimleri

Nükleik asitler su, metal iyonları ve bu iyonların kompleksleri, küçük organik moleküller ve proteinlerle kovalent olmayan etkileşimlerle tersinir olarak etkileşirler. Bu moleküllerin molekül ağırlıkları genellikle binden daha azdır. Bu gruptaki moleküllere ve iyonlara çeşitli metal kompleksleri, antikarsinojen ve antiviral ilaçları ile kompleks antibiyotikler örnek olarak verilebilir (Krug, 1994; Blackburn, Gait, 1990; Spiro, 1980).

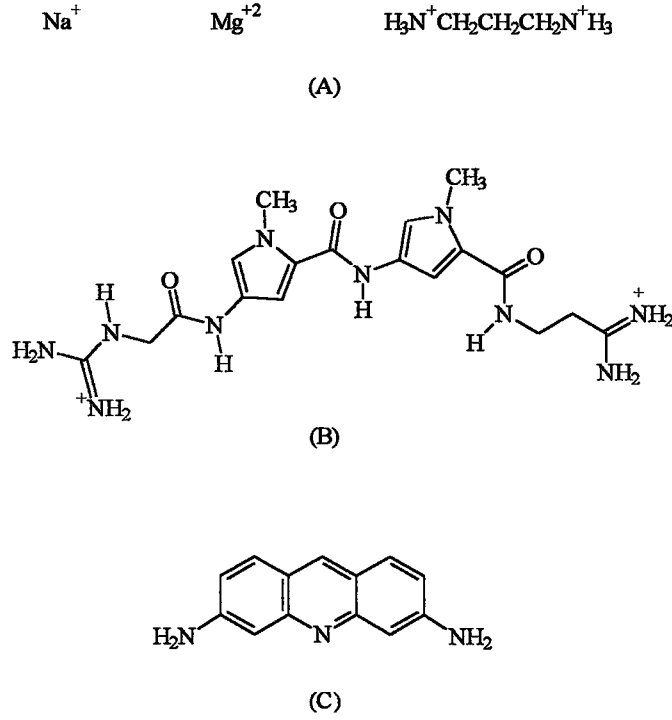
Nükleik asit yapısı ve fonksiyonu üzerinde tersinir etkileşimlerin önemi oldukça büyüktür. Birinci önemi, mevcut olan bütün kompleks nükleik asit konformasyonları su, metal iyonları veya organik katyonlarla tersinir etkileşimlerle dengelenir. Nükleik asitlerdeki yapısal değişiklikler, su aktivitesindeki, tuz konsantrasyonundaki (iyonik güç)

değişiklerle ve organik moleküllerle etkileşimlerle oldukça değişir. İkinci önemi, viral hastalıklar ve kansere karşı geliştirilen ve kullanılan ilaçların en önemlileri nükleik asitlerle tersinir etkileşen ilaçlardır. Üçüncü önemi ise, bu maddelerin basit kullanımından dolayı nükleik asitlerle karşı bu küçük moleküllerin ilgileri nükleik asitlerle olan etkileşimleri hakkında çok detaylı ve faydalı bilgiler verir. Nükleik asitlerle küçük moleküllerin etkileşimi üzerine yapılan çalışmalara DNA'nın bu moleküllerle etkileşimi RNA'nın bu moleküllerle etkileşimlerinden daha fazla rehberlik etmektedir. Bunun nedeni anti-kanser ilaçları için DNA'nın hedef molekül olmasından kaynaklanır (Bailly, 2000; Pindur, vd., 1993; Kaim, Schwederski, 1994).

Moleküllerin ve iyonların çift sarmal nükleik asitlerle etkileşimi üç sınıfa ayrılır. Dış elektrostatik etkileşimler; sarmalın dışında genellikle spesifik olmayan ve başlıca elektrostatik etkileşimleri içeren bağlanmalardır (Şekil 13A). Alkali ve toprak alkali metal iyonları ile çeşitli organik moleküllerin katyonları DNA ile dış iskelet üzerinden elektrostatik olarak etkileşirler (Şekil 14A). Oluğa bağlanma etkileşimleri, nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarında yer alan baz çiftlerinin dışa yönelik kısımlarıyla moleküllerin doğrudan etkileşimlerini içerirler (Şekil 13B) ve çeşitli fonksiyonel gruplara sahip organik sistemler DNA ile bu türden etkileşim gösterirler (Şekil 14B). İnterkalasyon ya da istiflenme ile gerçekleşen etkileşimler ise baz çiftleri arasına düzlemsel veya düzlemsel yakın aromatik halkalı sistemlerin veya böyle geometriye sahip metal komplekslerinin girmesi ile meydana gelirler (Şekil 13C ve Şekil 14C) (Blackburn, Gait, 1990).



Şekil 13. DNA ile küçük moleküllerin etkileşim türlerinin şematik gösterilişi. A) Dış elektrostatik etkileşim, B) oluğa bağlanma ve C) interkalasyon (istiflenme)



Şekil 14. Çeşitli türden etkileşimlerle DNA'ya bağlanabilen moleküller. A) Dış elektrostatik etkileşimle bağlanabilen sodyum ve potasyum iyonu ile 1,3-diaminopropan kationu, B) oluğa bağlanma ile etkileşen netropsin molekülü ve C) interkalasyon yoluyla etkileşen proflavin molekülünün kimyasal yapıları

İlk iki bağlanma türü nükleik asitte bir konformasyonel değişikliğe neden olmaz, fakat kompleks oluşumunda yapısal geçişleri içerebilir. İnterkalasyonun gerçekleşebilmesi için komşu baz çiftlerinin arasındaki mesafenin interkalasyon yapacak molekülünü girebileceği uygun bir mesafeye (yaklaşık 3.4 Å) kadar ayrılmasını gerektirecek şekilde şeker-fosfat zincirinin gerilme açılarındaki değişikliklere neden olur. Bu konformasyonel değişimleri takiben açılma ve bükülme gibi diğer sarmal parametrelerinde de değişiklikler gerçekleşir.

1.2.3.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler

Nükleik asitler oldukça yüksekçe yüklü polielektrotlardır ve anyonik fosfat grupları yapılarını ve etkileşimlerini önemli derecede etkiler. Alkali metaller gibi basit iyonların polinükleotitteki yük yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak nükleik asitlerle etkileştikleri bilinmektedir (Manning, 1978). Örneğin, B-DNA da, eğer fosforil grupları üzerindeki negatif yükler eşit aralıklı bir sıra halinde polinükleotit üzerinde dizilmiş ise her bir 1.7 Å

lük mesafede bir iyonik yük vardır(her bir baz çiftinde iki yük ve yaklaşık sarmalın her bir dönüşünde on baz çiftine karşılık gelecektir). Eğer dizilen yük sırası yaklaşık 7 Å'den daha az olursa molekül kararsız olur. Bu yüzden yüklerin daha yakın olarak sıralandığı polimer konformasyonları kararlılığa ulaşmak için çözültideki karşı (pozitif) yüklü iyonlarla birleşirler. İyonların polielektrotlarla birleşmesi karşı iyon kondenzasyonu olarak isimlendirilir ve tüm polimerin konformasyonel serbest enerji toplamında uygun olmayan bir düzensizlik durumuna sebep olur. Yük yoğunluğu her bir 7 Å'luk mesafede yaklaşık bir yük kararlılık seviyesine düşürülene kadar karşı iyonlar yani nükleik asit molekülü ve pozitif iyonlar etkileşirler ve biraraya gelirler. Spesifik bir nükleik asit konformasyonu için yük yoğunluğu ve yoğunlaşan karşı iyonun miktarı sabittir (Blackburn, Gait, 1990).

İyonlar polielektrolidin genel yük yoğunluğu ile birleştiği ve spesifik bölgelere bağlanmadığı için karşı iyonların başlangıçtaki etkileşimi kondenzasyon olarak bilinir. İyonlar kendi iç çevre hidrasyon suyunu tutarlar ve DNA'nın şeker fosfat zinciri boyunca hızlıca hareket ederler. Hem polielektrolidin hem de karşı iyonun ikincil hidrasyon tabakaları bu etkileşimlerden etkilenir. Eğer DNA'nın fosfat yükleri kimyasal bir modifikasyon ile ortadan kaldırılırsa, DNA molekülleri B-DNA çift sarmal halini korurken beklendiği gibi normal B-DNA'nın tuz-bağımlı özelliklerini göstermez. DNA'nın B-hali sarmal yapısı ile kondenzasyon teorisi her bir fosfat grubu başına ortalama 0.76 monovalent karşı iyonun (Na^+ gibi) bağlanabildiğini göstermiştir. Diğer teorik yöntemlerle de benzer sayılara ulaşılmıştır (Blackburn, Gait, 1990).

Birleşmiş karşı iyonlar nükleik asit üzerindeki etkin yükü azaltır ve polimerin bağlanma etkileşimlerini ve çözelti özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Küçük katyonlardan büyük proteinlere kadar çeşitli iyonik türlerin bağlanma serbest enerjisinin önemli bir kısmı kompleksteki nükleik asit yüklerinin nötralleşmesinden ve karşı iyonların salıverilmesine uygun entropik etkiden kaynaklanabilir. Sabit bir sıcaklıkta, karşı iyonun salıverilmesine sebep olan bu entropik etki nükleik asit denatürasyonuna ve ayrıca çözeltinin tuz konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak katyonik ligandların artan bağlanmasına yol açar. Bu sebeple hem nükleik asitlerin erime sıcaklığı ve hem de katyonik ligandların bağlanması için elde edilen denge sabiti tuz konsantrasyonuna oldukça bağlıdır (Record, vd., 1976).

Mg^{+2} gibi çok yüklü olan basit katyonlar ve 1,3-diaminopropan gibi basit organik aminlerin katyonları (Şekil 14A) DNA ile monovalent katyonlardan (Na^+ , K^+) daha kuvvetli olarak etkileşirler ve DNA ile bu tek yüklü katyonların etkileşimlerini zayıflatarak

molekülden monokatyonları uzaklaştırırlar. Bu basit çok yüklü katyonların nükleik asitlerle etkileşimleri genellikle kondenzasyon tipi etkileşimlerle olur. Çinko, bakır, civa gibi diğer metal katyonları kısmen spesifik olmayan bağlanmalarla DNA ile etkileşirler, fakat bu daha kompleks metal türleri aynı zamanda belirli bir bölgeye bağlanabilen bir kompleks oluşturmak için baz çiftlerine doğrudan bağlanabilirler (Kaim, Schwederski, 1994; Blackburn, Gait, 1990).

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 ligandın güçlüce bağlanması ile suyun saliverilmesi, bağlanma serbest enerjisine hem uygun hem de uygun olmayan katkılarda bulunur. Bu katkıların bağlı büyüklüğü, saliverilen su moleküllerinin sayısına ve kompleks oluşumu boyunca kırılan etkileşimlerin türüne bağlıdır (Blackburn, Gait, 1990).

Diğer bir dış elektrostatik etkileşim türü de spesifik olmayan etkileşimlerdir. Düzlemsel aromatik moleküller ve dimerler daha yüksek yığınlar oluşturmak için birbirlerinin üstüne istiflenebilirler. Bir madde molekülleri yüklü olduğunda, elektrostatik olarak birbirlerini iterler. Oysaki, eğer katyonlar anyonik DNA şeker-fosfat zinciri ile etkileşerek zincir eksenini boyunca istiflenirse yük itmesi azalır ve bu tip bağlanma çift zincir boyunca düzlemsel katyonların spesifik olmayan dış istiflenmelerine sebep olur. Bu tür istiflenmeler bir çok yük etkileşimi ile sağlanır ve kondenzasyon ile etkileşen karşı iyonların saliverilmesini sağlar. Bu sebeple, DNA dış yüzeyinde sağlanan elektrostatik istiflenme etkileşimleri tuz konsantrasyonuna oldukça bağımlıdır ve genellikle 0.1 M ve yukarıdaki tuz konsantrasyonlarında oldukça zayıftır (Blackburn, Gait, 1990; Papavassiliou, 1995).

1.2.3.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri

Oluğa bağlanma etkileşimleri, nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan fonksiyonel grupların oluşturduğu kısımları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimlerini içerir. Netropsin (Şekil 14B), nükleik asitlerle bu mekanizma vasıtası ile etkileşen tipik bir moleküldür. Küçük ve büyük oluklar; elektrostatik potansiyelleri, hidrojen bağı oluşturma özellikleri, sterik etkiler ve hidrasyon özellikleri bakımından önemli ölçüde birbirlerinden farklıdır. Oluğa bağlanan küçük

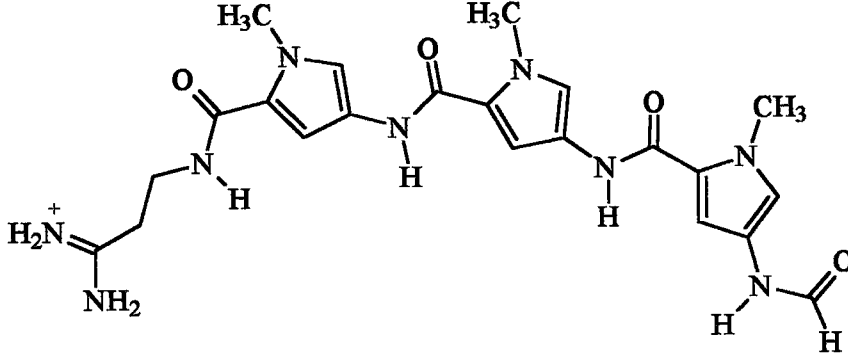
moleküller genellikle küçük oluğu tercih ederlerken, bir çok protein ve oligonükleotit molekülleri başlıca büyük oluk etkileşimleri vasıtası ile nükleik asitlere bağlanma özgülüğü gösterirler (Blackburn, Gait, 1990).

Tipik olarak, küçük oluğa bağlanan moleküller pirrol, furan veya benzen gibi basit aromatik halka sistemlerine sahiptirler. Moleküldeki bu halkaların uygun bir şekilde bükülmesi ve su ile yer değiştirmesi sonucu küçük oluğun sarmal şeklindeki kavisine uyabilirler. Küçük olukta bulunan A:T bölgeleri genişlik açısından daha uygun olduğundan aromatik moleküller A:T dizilerine G:C dizilerinden daha iyi uyabilirler. Aromatik halkaları doğru olarak bükülmüş olan bir molekül küçük oluğa rahatça uyabilir ve oluğun dış yüzeyini oluşturan sarmal zincirlerle van der Waals etkileşimleri yapar. Bağlanmadaki her hangi bir özgülük, bağlı molekül ve oluktaki baz çiftlerinin oluğa yönelik kenarları arasındaki etkileşimlerden kaynaklanır. Hidrojen bağları A:T baz çiftindeki A'nın N-3 azotu ya da T'nin C-2 karbonil oksijeni ile bağlı molekül arasında gerçekleşir. Benzer gruplar G:C baz çiftlerinde de olmasına rağmen, G'nin amino grubu C'nin C-2 karbonili ve G'nin N-3 azotu ile hidrojen bağı oluşumuna sterik bir engelleme yapar. G:C baz çiftlerindeki G'nin amino grubu ve C'nin karbonil oksijeni arasındaki hidrojen bağı küçük oluk içinde bulunur ve sterik olarak molekülün bu oluğun içindeki G:C'ce zengin bölgelere girmesini önler. Bu sebeple, oluğa bağlanan moleküllerin aromatik halkalarının çoğu DNA'nın küçük oluğundaki A-H protonları ile yakın bir etkileşim kurar. Negatif elektrostatik potansiyelin DNA'nın küçük oluğundaki A:T bölgelerinde G:C bölgelerinden daha büyük olduğu gösterilmiştir. Bu tespit, kationların A:T spesifik küçük oluğa bağlanmasının sebebini açıklayan önemli bir kaynaktır (Laveray, vd., 1986).

İnterkalatörlerde mevcut olmayan fakat oluğa bağlanan moleküllerin sahip olduğu bir özellik de oluk boyunca bir çok baz çiftlerine uymak için bu moleküllerin genişleyebilme yetenekleridir. Bu moleküller nükleik asitlere bağlanmada yüksek dizi özgülüklerine sahiptirler (Blackburn, Gait, 1990). Minor oluğa bağlanan ve bağlanma mekanizması bilinen moleküllerden birisi netropsindir (Şekil 14B). Dickerson ve arkadaşları DNA dubleksinin d(CGCGAATTCGCG) bölgesine bağlanmış halde netropsinin kristal yapısını elde etmişlerdir (Pjura, vd., 1987). Bu yapı küçük oluktaki kompleks oluşumu hakkında detaylı bilgiler sağlamıştır.

Distamisin (Şekil 15) adlı molekül de netropsine benzer yapısal ve DNA-bağlanma özgülüğü gösterir. Ayrıca DNA ile oluşturduğu kompleksteki bir çok özelliğiyle netropsin kompleksine oldukça benzemektedir. Bir oligonükleotit olan d(CGCA₃T₃GCG) ile

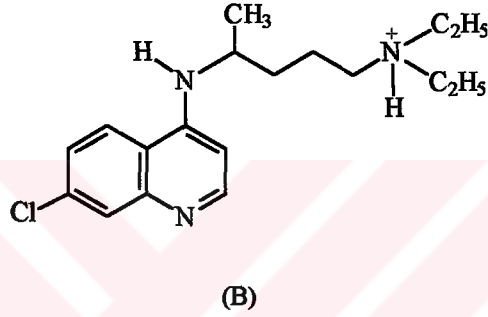
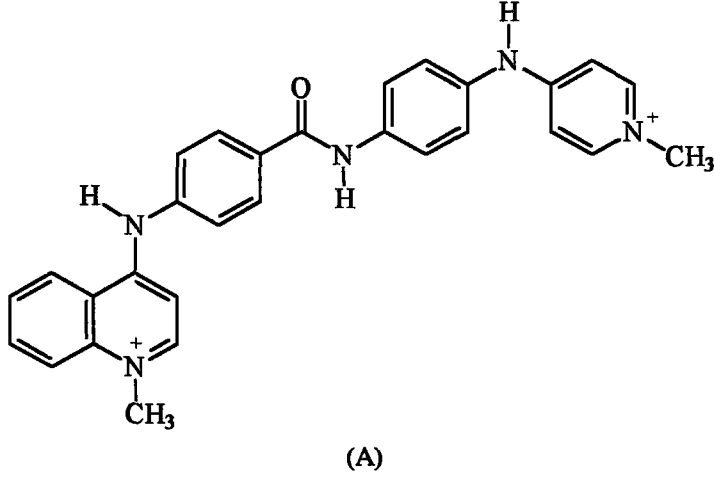
distamisinin oluşturduğu kompleksin kristal yapısı tespit edilmiştir (Coll, vd., 1987). Distamisin, ilacın bağlanma yeri olan küçük oluğun eğrilğine uyan bir hilal şeklindedir. Molekül küçük oluğun doğal sarmal bükülmesine uyacak şekilde bükülmüştür. Netropsinde olduğu gibi, molekül küçük oluğun yüzeyindeki gruplarla yakın van der Waals etkileşimleri yapar.



Şekil 15. Distamisinin kimyasal yapısı

Beş –NH grubu distamisin hilâlinin iç kısmında yer alır ve bu gruplar T'nin O-2 ve A'nın N-3 azotu ile hidrojen bağları oluştururlar. Distamisindeki –NH gruplarının geometrik düzeni, DNA'nın A:T baz çiftlerin sarmal yapısına tam olarak uymadığı için distamisinin –NH gruplarının hepsi aynı anda optimum hidrojen bağı oluşturmazlar. Distamisin molekülü üç pirrol halkasına sahiptir ve beş A:T baz çiftini sarar. G'nin amino grubu distamisinin küçük olukta hidrojen bağı oluşturmasını engeller ve bunun sonucu olarak da distamisinin G:C baz çifti bölgelerine bağlanması daha zayıf olur. Küçük oluk A:T'ce zengin bölgelerde daha dar olduğu için hem distamisin hem de netropsinin van der Waals etkileşimleri DNA'nın A:T bölgelerinde G:C bölgelerindekinden daha özgündür (Blackburn, Gait, 1990).

Bu sınıftan diğer bir molekül SN 6999 ticari ismiyle bilinen ilaçtır. Bu madde ile yapılan çalışmalar sonucu bu molekülün yüksek A:T özgünlüğü ile küçük oluğa bağlandığı tespit edilmiştir. Birbirine bağlı iki halkalı bir kinolin halka sistemine sahip olması açısından ilginç bir moleküldür (Leupin, vd., 1986) (Şekil 16A).



Şekil 16. Oluğa bağlanan SN 6999 bileşiğinin (A) ve benzer yapıya rağmen bir interkalator olan klorkin adlı maddenin (B) kimyasal yapıları.

2-Boyutlu NMR metodu nükleik asitler ve kompleksleri hakkında detaylı yapısal bilgiler sağlamıştır. Yapılan çalışmalar sonucu SN 6999 molekülünün küçük oluğa bağlandığı ve kinolin halkası olmasına rağmen interkalasyon yapmadığı görülmüştür. Diğer oluğa bağlanan moleküllerde olduğu gibi SN 6999 molekülü de oligomer dizisinin merkezi A:T baz çiftleri ile etkileşim yapmaktadır. İlacın sarmal küçük oluğun içine uymak ve diğer küçük oluğa bağlanan moleküller gibi A:T baz çiftleri ile hidrojen bağları oluşturmak üzere hilâl şeklinde bükülerek olukla etkileşim yaptığı tespit edilmiştir (Leupin, vd., 1986).

İnterkalasyon ve oluğa bağlanma etkileşimleri arasındaki seçimi hangi yapısal kriterlerin belirlediği oldukça ilginçtir. Kimyasal yapıları benzer olan SN 6999 (Şekil 16A) ve klorkin (Şekil 16B) moleküllerinden SN 6999 oluğa bağlanırken klorkin ise interkalasyon yapar. Çalışmalar sonucu oluşturulan modele dayanarak SN 6999 molekülünün kinolin halkasının DNA baz çiftleri ile uygun etkileşimler yapabildiği ve

belki de bir interkalasyon kompleksi halinde DNA fosfat gruplarıyla elektrostatik etkileşimler yapabileceği söylenmektedir. Oluğa bağlanmada hidrojen bağı oluşumundan, oluğun yüzeyi ile kovalent olmayan etkileşimlerden ve oluktan çözücünün ayrılmasından dolayı önemli bir serbest enerji kaybedilir. Aynı durum netropsin, distamisin ve diğer benzer oluğa bağlanan moleküller için de geçerlidir. En azından bu tip yapılar için küçük oluğa bağlanma interkalasyondan daha uygundur. Diğer taraftan, klorkin oluk etkileşimleri için uygun yapıya sahip değildir ve bir interkalasyon kompleksi oluşturacak şekilde DNA'ya bağlanır. Böyle olmasına rağmen klorkinin interkalasyon bağlanma sabiti düşüktür ve zayıf bir DNA'ya bağlanan molekül olarak sınıflandırılır (Blackburn, Gait, 1990).

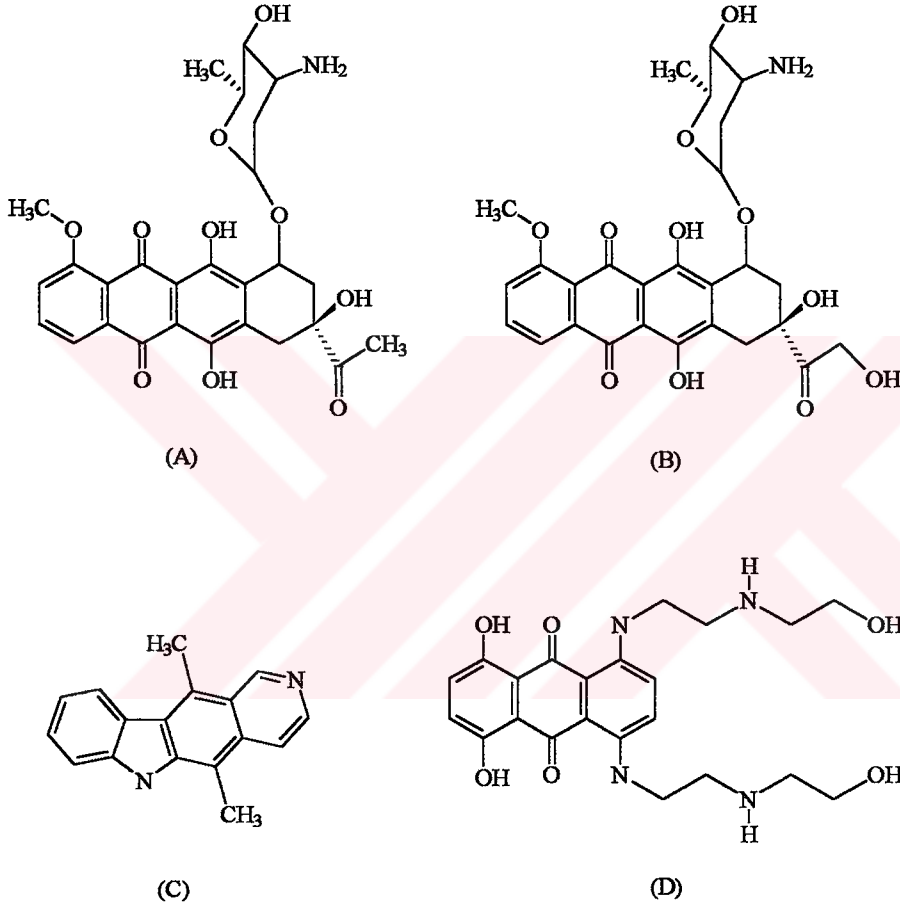
1.2.3.3. İnterkalasyon Etkileşimleri

Yaklaşık son kırk yıl içinde planar aromatik katyonların DNA ile olan etkileşimlerinin ortaya konması için gerçekleştirilen çeşitli fiziksel metotlarla elde edilen bilgiler planar aromatik moleküllerin DNA ile "interkalasyon" adı verilen bir etkileşimle bağlandığı sonucunu ortaya koymuştur. İnterkalasyonun kelime anlamı, istiflenmiş olan iki baz çifti arasına molekülün düzlemsel (kromoforik) parçasının girmesidir. Bu işlem esnasında DNA'nın primer ve sekonder yapıları bozulmaz. DNA'nın tersiyer (sarmal) yapısı, orijinal yapısı ile karşılaştırıldığında kısmen uzar ve bu yüzden biraz açılır (Barton, 1986, Pindur, vd., 1993). İnterkalasyon esnasında baz çiftleri arasındaki ayrılma 3.4 Å'dan yaklaşık 7-8 Å'a kadar büyür. DNA'nın üç boyutlu yapısındaki veya diğer bir deyişle topolojisindeki bu değişikliklerden dolayı DNA'nın temel fonksiyonlarında biyokimyasal olarak bir sınırlama olur. Meselâ böyle bir konformasyonel değişim sonucunda, RNA polimeraz veya topoizomeraz II'nin inhibisyonu gerçekleşir (Blackburn, Gait, 1990).

Küçük moleküllerin DNA ile interkalasyonu molekülün düzlemselliği, aromatikliği ve moleküllerin etkileşen kısımlarının yüzeysel yayılması gibi çeşitli faktörlere bağlı olan kovalent olmayan etkileşimlerle sağlanır. Oligonükleotitlerle oluşturulan çeşitli interkalasyon kompleksleri ile yapılan yapı analizi çalışmaları interkalasyonun; elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerle olduğunu göstermiştir. Çeşitli fiziksel çalışmalar da bir molekülün DNA ile interkalatif bağlanmasındaki yapısal kriterleri konusunda faydalı bilgiler sağlamıştır. Viskozimetri, UV spektrometri ve elektroforez gibi yöntemler yanında ve x-ışını yapı analizi, çeşitli NMR teknikleri gibi moleküller

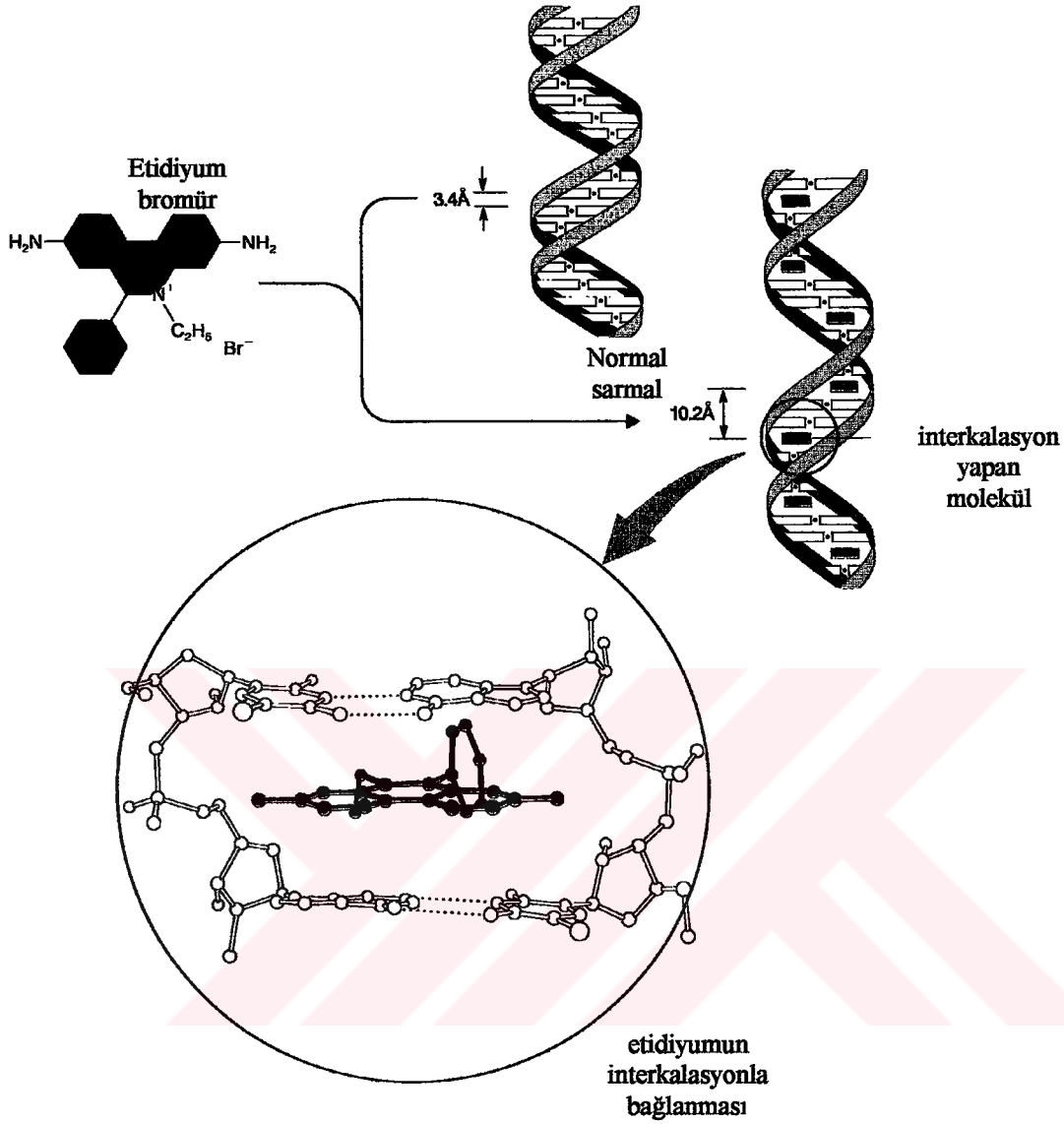
spektroskopideki modern metotlarla komplekslerin konfigürasyon ve konformasyonu gibi geometrik özellikleri araştırılmıştır (Pindur, vd., 1993).

Çeşitli moleküler spektroskopik çalışmalarla beraber bilgisayarlarla moleküler modelleme çalışmaları daunorubisin ve doksorubisin gibi antrasiklin antibiyotikler yanında bir karbazol türevi olan elliptisin gibi alkaloidler yanında antrakınon sistemine sahip mitoksantron ve gibi pek çok sentetik ilacın DNA ile interkalatif etkileşimleri incelenmiştir (Şekil 17).



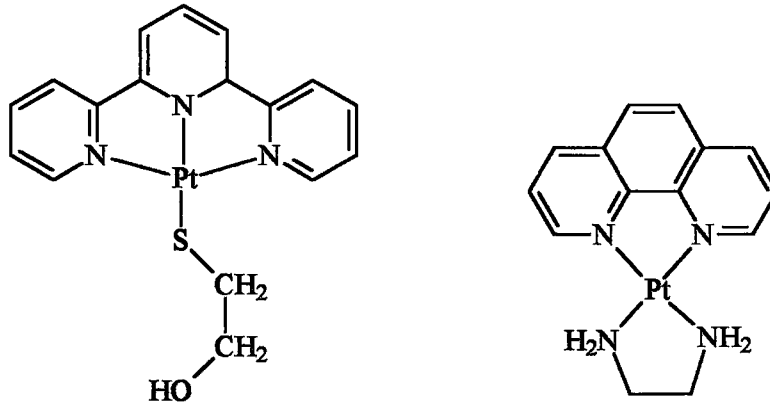
Şekil 17. DNA ile interkalatif bağlanma yapabilen bazı maddelerin kimyasal yapıları. A) Daunorubisin, B) doksorubisin, C) elliptisin ve D) mitoksantron

Etidiyum bromür gibi heterohalkalı organik sistemlerin DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlandığı bilinmektedir (Lippard, Berg, 1994). Bu molekülün doygun konsantrasyonu ile DNA interkalasyonunda her bir baz çifti arasını doldurduğu x-ışını yapı çalışmaları ile ortaya konmuştur ve bu etkileşimde etidiyum bromür moleküllerinin eşleşen baz çiftleri arasındaki 10.2 Å'luk bir boşluğu doldurduğu tespit edilmiştir (Şekil 18).



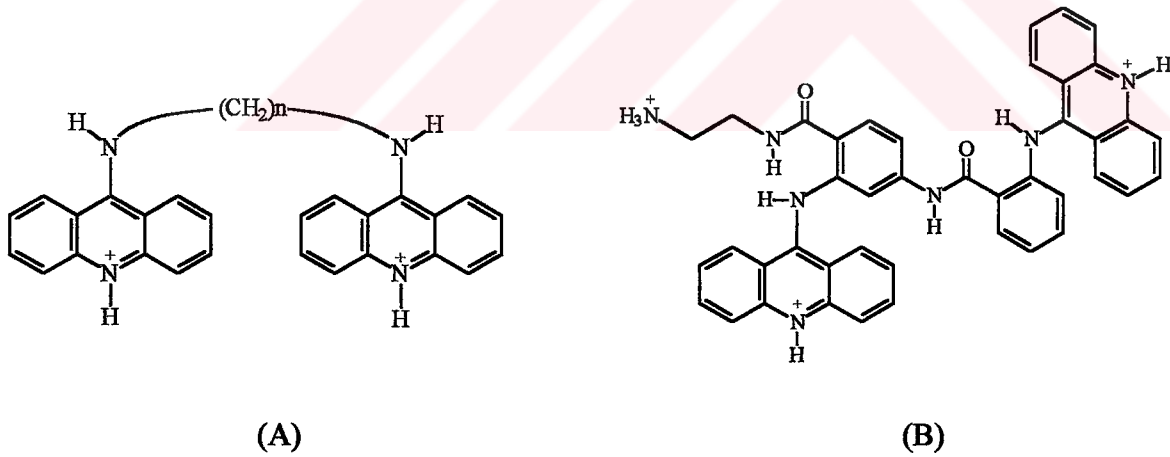
Şekil 18. Etidium bromürün DNA ile interkalasyonu

Düzlemsel aromatik heterohalkalı organik yapılar yanında azot içeren heterohalkalı ligandların düzlemsel katyonik metal komplekslerinin de DNA ile interkalasyon yaptığı tespit edilmiştir (Lippard, Berg 1994). Bunlardan en bilinen örnekler platin kompleksleridir ve içerdikleri halka sistemleri DNA ile interkalasyon yoluyla bağlanmayı kolaylaştırır (Şekil 19). Ayrıca DNA ile interkalasyon için uygun yapısal fonksiyonlara ve geometrilere sahip, rutenyum, bakır ve mangan içeren komplekslerin bu özellikleri de çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir.



Şekil 19. İnterkalasyon yoluyla DNA ile etkileşebilen platin kompleksleri

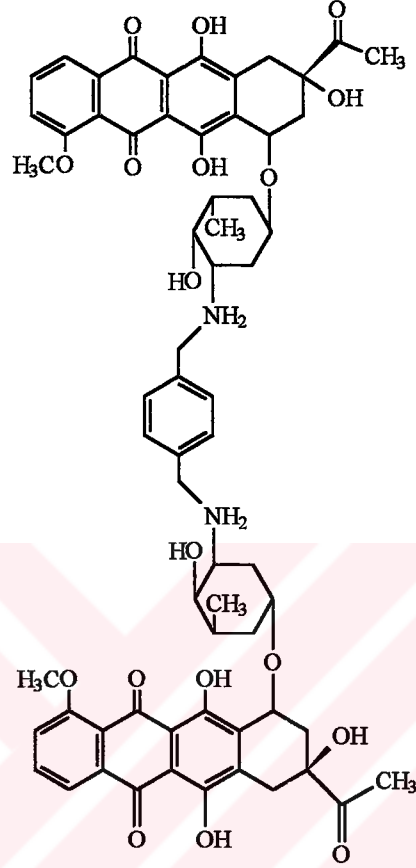
Bisinterkalatörler iki ayrı interkalasyon yapan düzlemsel (kromofor) halka sistemine sahiptirler ve halka sistemleri birbirlerine uzunluk ve rijitlikçe değişebilen zincirlerle bağlanırlar (Şekil 20). İnterkalasyon yapan moleküllerin farmasötik özelliklerinden dolayı benzer şekilde üç veya daha fazla halka sistemi içeren moleküller de dizayn edilmiştir. DNA baz çiftleri ile halka sistemlerinin etkileşimi büyük ölçüde zinciri oluşturan grupların özellikleri ile kontrol edilir (Blackburn, Gait, 1990; Pindur, vd., 1993; Leng, vd., 1998).



Şekil 20. Çeşitli bisinterkalatörlerin kimyasal yapısı. A) Basit ve esnek akridin bisinterkalatörleri, B) daha az esnek akridin bisinterkalatörü

Bisinterkalatörlerin monomerik olanlara göre çeşitli potansiyel avantajları vardır. İnterkalasyonu sağlayan birimlerin sayısı DNA ile bağlanma ilgisini oldukça artırır ve kabaca bisinterkalatörün bağlanma sabiti monomerinkinin karesi kadardır.

Bisinterkalatörün bağlanma hacimi monomerinkine göre bağlı olarak artar. Böyle bir artışın dizi seçiciliğini de artırdığı bisinterkalasyon yapan daunorubisin türevleri durumunda gözlenmiştir (Chaires, vd., 1997; Leng, vd., 1998) (Şekil 21).

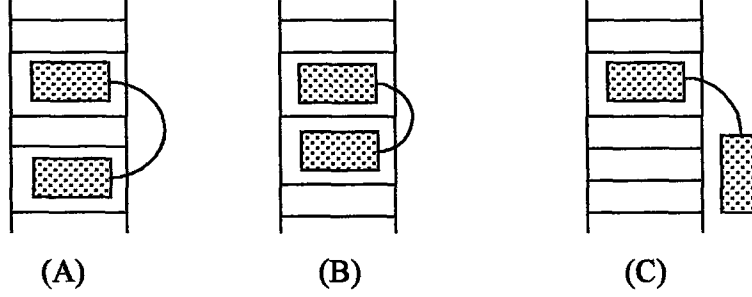


Şekil 21. Bisinterkalasyon yapan bir daunorubisin türevinin kimyasal yapısı

Ekinomisin ve triostain gibi kinoksalin türevi antitümör antibiyotikler x-ışını yapı analizi yöntemiyle çalışılan oldukça kompleks yapıları doğal antibiyotiklerdir. Bu moleküllerin süpersarmal DNA ile oluşturduğu yapılar incelendiğinde çift sarmal DNA'yı 40-50° kadar gevşettiği ve monointerkalatörlere göre DNA zincirinde iki kat daha fazla uzamaya sebep oldukları gösterilmiştir.

Bisinterkalatörlerin DNA molekülündeki eşleşmiş bazlarla interkalasyonu çeşitli şekillerde gerçekleşebilir (Blackburn, Gait, 1990). Bu moleküllerdeki bağlayıcı zincir uzunluğu metilenik grupların sayısı (n) değiştirilerek gerçekleştirilebilir (Şekil 20A). Zincirin uzun olması (n>8) ile her iki planar halkanın interkalasyon yapabileceği tespit edilmiştir (Şekil 22A). Kısa bir zincir (n=6) durumunda ise halkaların her ikisi de komşu

bölgelerle etkileşirken bir sterik engelleme ile karşılaşacaklardır (Şekil 22B). Metilenik grupların daha az olduğu ($n < 4$) türevler durumunda interkalatör molekülün sadece bir halkası yoluyla interkalasyonun sağlandığı gözlenmiştir (Şekil 22C).



Şekil 22. Bisinterkalatörlerin muhtemel bağlanma modelleri

1.2.4. Nükleaz Enzimleri Dışındaki Nükleolitik Özellikli Moleküller

Biyolojik sistemlerde ribonükleazlar ve deoksiribonükleazlar, SN-2 mekanizması ile kesilecek bağ üzerine nükleofilik saldırıyı katalizleyerek RNA ve DNA'nın fosfodiester zincirlerinin kesimini sağlayan enzimlerdir. Son yıllarda enzimlerden çok daha küçük ve yaklaşık olarak bin moleküler ağırlığa sahip DNA ile bağlanabilme ve DNA zincirini kırma yeteneğine sahip pek çok doğal ve sentetik molekül izole edilerek veya sentezlenerek karakterize edilmiştir. Bu maddeler birer prob olarak DNA ve RNA'nın konformasyonel değişimlerinin incelenmesinde de kullanılırlar. Ayrıca belirli bir nükleik asit yapısına karşı yüksek ilgiye sahip bir ligand ile kimyasal nükleaz aktivitesinin birleştirilmesiyle bölge-spesifik nükleolitik maddelerin dizaynı mümkün olabilmektedir (Papavassiliou, 1995).

1.2.4.1. Doğal Nükleolitik Moleküller

Yıllardan beri DNA ile etkileşen ve onu kesen ilaçlar dizayn edilmektedir. *Streptomyces* suşlarından izole edilen iki ürün olan bleomisin ve neokarsinostatin hidrolitik olmayan mekanizmalarla DNA'nın fosfodiester zincirlerini kesen maddelerdir. En çok çalışılan doğal madde; bir glikopeptid antibiyotik ve anti-kanser ilacı olan bleomisin

A2'dir. Bleomisin molekülünün farklı mevkilerden modifikasyonu yapılarak çeşitli antibiyotik türevleri hazırlanmıştır (Blackburn, Gait, 1990; Pindur, vd. 1993; Kane, Hecht, 1994). Oldukça kompleks yapıları olan bu bleomisin türevlerinin ortak özelliği 2,4'-bitiyazol halkalarını içermeleridir. Bu halkalar genellikle bleomisin A2'deki bir katyonik yüke sahip olan küçük yan zincire bağlanır. Bitiyazollerin diğer yanındaki kısım ise DNA zincirinin kesiminden sorumlu olan bir metalin kompleksleşmesini sağlayacak bir bölgeye sahiptir. NMR ve hidrodinamik çalışmalar bitiyazol halkalarının DNA'ya bir interkalasyon kompleksi oluşturarak bağlanabildiğini göstermiştir. Oysaki, diğer çalışmalar güçlüce bitiyazollerin antibiyotiklerin bir parçası olduklarında DNA'ya oluğa bağlanma mekanizması vasıtası ile bağlandığını önermektedir. DNA'yı kesmek amacıyla bleomisinin bir çok farklı metal iyonları ile kompleks oluşturmuş türevleri hazırlanabilir. Bu yöndeki çalışmaların çoğu Fe(II)-bleomisin türevleri ile yapılmıştır.

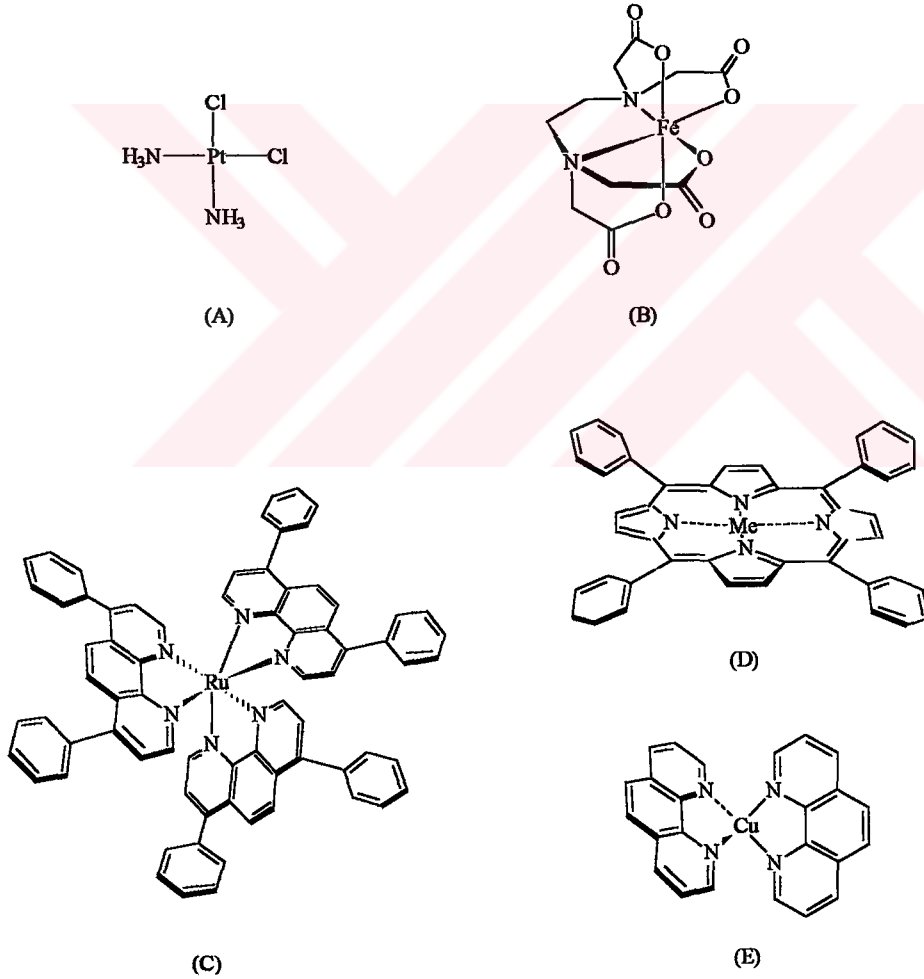
Bleomisinden oldukça farklı bir peptit antibiyotiği olan neokarsinostatin de DNA'da zincir kırılmasına sebep olur. Antibiyotiğin aktif kısmı DNA ile interkalasyon yapabilen bir substitute-naftalen karboksilik asit içeren protein olmayan bir kromofordur. DNA'nın neokarsinostatin kromoforu ile kesimi O₂ ve bazı prooksidanlarla aktifleştirilir. Kesimin DNA'daki 5'-hidrojenin deoksiriboz gruplarından ayrılması vasıtası ile olduğu önerilmektedir (Blackburn, Gait, 1990).

1.2.4.2. Sentetik Kimyasal Nükleazlar

Son yıllarda, fizyolojik pH ve sıcaklıkta deoksiriboz veya ribozun oksidasyonu üzerinden nükleik asitlerin fosfodiester zincirlerini kesen pek çok redoks aktif koordinasyon kompleksleri keşfedilmiştir. Bir liganda bağlı bir metal genellikle nükleik asit zincirlerinin parçalanma işlemini başlatır. Yüksek düzeylerde DNA kırma yeteneğine sahip maddeler, DNA'ya karşı büyük ilgiye sahip bir moleküle metal ile kompleksleşecek bir yapının ilavesi sonucu elde edilebilirler (Blackburn, Gait, 1990; Papavassiliou, 1995; Sigman, Chen, 1990).

Süpersarmal DNA üzerinde gevşemeyi sağladığı tespit edilen ilk sentetik koordinasyon kompleksi bis(1,10-fenantrolin)-bakır iyonudur (Sigman, vd., 1979; Sigman, 1986). Ayrıca EDTA-Fe (Sigman, Chen, 1990; Papavassiliou, 1995), çeşitli metaloporfirinler (Marzilli, vd., 1986; Groves, Farrell, 1989), diamino dikloro-platin kompleksleri (Rosenberg, vd., 1969) ve fenatrolin-rutenyum komplekslerinin (Barton,

1986; Lippard, Berg, 1994) de bu türden nükleolitik özellik gösterdikleri bilinmektedir (Şekil 23). Bu maddelerin DNA-protein etkileşimlerini ortaya koymada kullanılmaları yanında, birer kimyasal nükleaz olarak kromozomal DNA'nın bölgeye özgün kesilmesi amacıyla da çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, platin komplekslerinin insan kanseri tedavisinde etkin bir şekilde klinik olarak kullanımı, antikanser özellik gösteren yeni metal komplekslerinin dizaynı ve nükleik asitlerle etkileşimlerinin incelenmesine olan ilgiyi daha da artırmıştır (Spiro, 1980; Kaim, Schwederski, 1994). Dolayısıyla, nükleik asitlerle etkileşip zincirleri kırabilen yeni metal komplekslerinin geliştirilmesi ve DNA ile olan etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasının bu komplekslerin moleküler biyoloji, farmakoloji ve gen terapisi gibi farklı amaçlar için daha etkin kullanımını sağlayacağı aşikârdır.



Şekil 23. Sentetik bazı kimyasal nükleazların yapıları. A) *cis*-diamino dikloro-platin kompleksi, B) EDTA-Fe kompleksi, C) (4,7-difenil-1,10-fenatrolin)-rutenyum kompleksi, D) Metaloporfirin genel yapısı ve E) Bis(1,10-fenantrolin)-bakır kompleksi

Katalitik özellik gösteren ve birer kimyasal nükleaz olarak tanımlanan maddelerin çoğunluğu fizyolojik pH ve sıcaklık şartlarında DNA zincirlerinin fosfoester iskeletini kıran redoks-aktif koordinasyon kompleksleridir. Bu komplekslerin nükleolitik aktivitesi bunların DNA ile dönüşümlü bağlanmalarını takiben gerçekleşen kırma ya da parçalama gibi bir hidrolitik reaksiyondan kaynaklanır ve bu etkinin bir sonucu olarak DNA çift zinciri ya karşılıklı bölgelerden ya da tek bir zincirden kırılır. Böylece DNA'nın yapısı bozulur, DNA gevşer veya çeşitli tersiyer konformasyonlar oluşur (Sombrook, vd., 1989; Goodisman, vd., 1997).

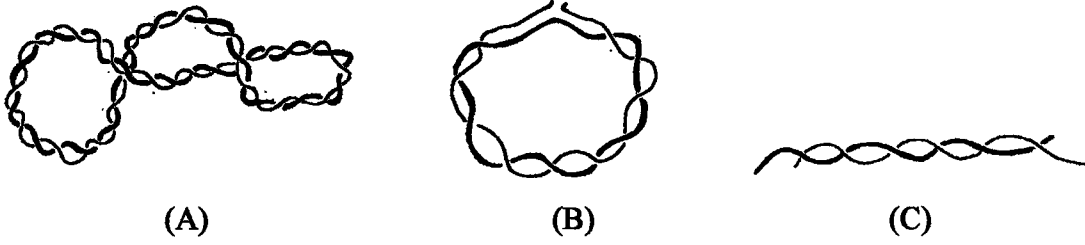
Metal kompleksleri çift sarmal DNA ile kovalent olmayan iki temel yolla etkileşir. Bunlardan birisi dış bölgelerden bağlanma diğeri ise bazlar arasına girerek (istiflenerek) bağlanmadır. Haricen bağlanma DNA yüzeyinde meydana gelen bütün etkileşimleri içerir. En basit olarak DNA biyopolimerinin iyonik yüzeyinde kompleksin etkileşmesiyle gerçekleşir. DNA oluklarına bağlanma çok daha kuvvetli bir etkileşimdir ve uygun büyüklüğe, hacime ve şekle sahip bir molekül DNA'nın büyük yada küçük oluklarına yerleştiğinde meydana gelir. İstiflenme biyopolimerin içerisindeki komşu iki baz arasına düzgün aromatik molekülün girmesinden ibarettir. Oktahedral (sekiz yüzlü) ve tetrahedral (dört yüzlü) kompleksler interkalasyon için uygun değildir ve bu moleküller dış yüzeyden DNA ile etkileşirler. Aromatik gruplar içeren kare düzlem kompleksler için ise etkileşim interkalasyonla sağlanır. Aromatik moleküllere hacimli grupların eklenmesi DNA ile interkalasyonlarını etkiler. Dolayısıyla kare düzlem komplekslere düzlem dışı grupların eklenmesiyle istiflenme ile bağlanma yerine haricen bağlanma gerçekleşir (Papavassiliou, 1995; Sigman, Chen, 1990).

Kimyasal nükleaz aktivitesi gösteren bir çok kimyasal, DNA ile güçlü veya zayıf kompleksler oluşturarak kesimi gerçekleştirir. Bu duruma istisna olan kompleks Fe(II)-EDTA'dır (Şekil 23B). Bu kompleksin net negatif yükünden dolayı yüksekçe reaktif difüzlenebilen hidroksil radikallerini ürettiği ve kendisi DNA'ya bağlanmadan hidroksil radikalleri vasıtası ile DNA'yı kestiği önerilmektedir (Papavassiliou, 1995; Sigman, Chen, 1990). Bir oksidan (H_2O_2) mevcudiyetinde demir-EDTA kompleksi DNA zincirini keser. Bu işlemde DNA zincirinin kesilmesi için üç bileşik gereklidir. Bunlar; $[Fe^{+2}(EDTA)^{-2}]$, H_2O_2 ve sodyum askorbattır (Sigman, Chen, 1990). Reaksiyonun yürüyüşünde, EDTA.Fe(II)'den bir elektron ayrılarak H_2O_2 'de ki O-O bağını kırar ve EDTA.Fe(III) üretilir ve bunun sonucunda da hidroksil iyonu ve reaktif hidroksil radikali ($\cdot OH$) üretilir. Askorbat iyonu Fe(III)'ün Fe(II)'ye dönüşümünü sağlar. Bu şekilde oluşan katalitik çevrim

ile EDTA.Fe(II)'nin kullanılan mikromolar konsantrasyonları DNA kırılmasına neden olur. Hem DNA hem de metal kompleksi negatif olarak yüklü oldukları için EDTA.Fe(II) elektrostatik olarak itilir ve DNA molekülüne bağlanamaz. Bu nedenle DNA kesimine sebep olan gerçekte oluşan hidroksil radikalleridir. Hidroksil radikali çözelti boyunca difüzenir ve büyük ihtimalle bir deoksiriboz hidrojen atomunu çıkararak DNA zincirine saldırır. Bunun sonucu saldırılan bölgedeki baz ve şeker ayrılır ve böyle bir çevrim ile kompleksin oldukça düşük konsantrasyonlarında DNA kırılması gerçekleşir.

Başka bir metal içeren kimyasal nükleaz 1,10-fenatrolin ile bakır (I) in oluşturduğu bis (1,10-fenantrolin)-bakır (I) kompleksidir (Papavassiliou, 1995; Sigman, Chen, 1990). 2:1 oranında 1, 10-fenantrolin.Cu(I) kompleksi $[(OP)_2Cu^+]$ (Şekil 23E) deoksiriboz halkasının oksidasyonu ile fizyolojik şartlar altında DNA'nın fosfodiester zincirlerini kıran etkili bir kimyasal nükleazdır. Bu kompleks gerekli bir kovalent olmayan aracı vasıtası ile ilerleyen bir reaksiyonla DNA'yı kestiği keşfedilen ilk kimyasal nükleazdır (Sigman, vd., 1979). Bu bakır kompleksinin etkisi DNA'nın ikincil yapısına bağlıdır. Tek zincirli DNA etkili bir substrat değildir ve B-DNA nispeten A-DNA'ya tercih edilir. Z-DNA, B-DNA'nın kolayca kesildiği şartlar altında belirlenebilir bir biçimde kesilemez. Bu ikincil yapı, B-DNA'nın küçük oluşunun tetrahedral koordinasyon kompleksi için tercih edilen bir bağlanma yeri olduğunu gösterir.

Bir çok kesim maddesi, kapalı çift zincir DNA molekülleri ile etkileşerek çemberimsi çift zincir DNA moleküllerini kapalı dairesel formdan (form I) açık dairesel forma (form II) ve lineer formlara (form III) ve en sonunda da küçük DNA parçalarına dönüştürür (Şekil 24) (Goodisman, vd., 1997). Çoğu antikanser ilaçları hücre DNA'sı ile etkileşerek hücre hasarı gösterirler. Bu etkileşimler zayıf veya kovalent bağlanmalar şeklinde olabilir ve işlem DNA'nın şeker-fosfat zincirinin kesimi ile sonuçlanabilir. Eğer bir ilaç, şeker-fosfat zincirinde tek bir kırık oluşturursa molekül, kapalı çemberimsi formdan (form I) kırık çemberimsi forma (form II) veya doğrusal forma (form III) dönüşür. Eğer ilk kırılmanın olduğu zincirin karşısındaki zincirde ilk kırılmaya yakın bir yerde ikinci bir kırılma olursa DNA molekülü doğrusal forma dönüşür. Dolayısıyla, her iki DNA zincirini karşılıklı zincirlerden kesen bir ilaç, form I'in doğrudan form III'e dönüşmesine sebep olur.

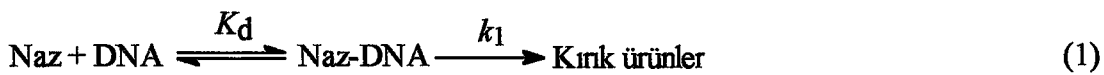


Şekil 24. Plazmid DNA'nın A) süpersarmal, B) kırık ve C) doğrusal formları

DNA'nın kendisini kesen bir ilaçla muamelesinden önce ve sonraki üç formun miktarının ölçülmesinden bu işlemde oluşan formların oranları hakkında fikir edinilebilir. Bu bağıl oranlar aynı zamanda madde tarafından DNA kesim mekanizması ve özgünlükleri hakkında bilgi verebilir. Meselâ, eğer kesim kimyasalı belli bir zaman içinde yalnızca bir zinciri kesiyorsa ve kesim özgün değilse form II DNA'daki bir çok kırık form III'e dönüşüm için önemli bir etken olacaktır. Bu sebeple, form I DNA'nın form II'ye dönüşüm oranı form II'nin form III'e dönüşüm oranından daha büyük olacak ve form I'in form III'e dönüşümünün görünüşteki oranı küçük olacaktır. Kesim bu şekilde olduğunda kimyasalın "tek zincir kesim kimyasalı" olduğu söylenir. Diğer yandan, eğer madde karşılıklı iki yerden DNA'yı kesiyorsa form I'in form III DNA'ya dönüşüm oranı önemli olacaktır. Form I'den daha fazla ilaç molekülü içeren çoklu bağlanma/kesme olayları ile form III oluştuğunda çift zinciri kesimine denk bir durum açığa çıkar. Eğer ilaç yüksek düzeyde dizi özgünlüğüne sahip ise kesme DNA'nın birkaç yeri ile sınırlandırıldığı için her iki zincirde yakın yerlerde kırılma ihtimali yüksek olacaktır. Mekanizmasına dikkat edilmeksizin, form I'i doğrudan form III'e dönüştüren kesim kimyasallarına "çift zincir kesim kimyasalları" denir (Goodisman, vd., 1997).

1.2.4.3. Kimyasal Nükleazların Kinetiği

Bir kimyasal nükleaz (Naz) ile kesimin kinetik şeması nükleolitik reaksiyonu takiben dönüşümlü bir kompleks oluşumunu içerir (Sigman, Chen, 1990).



Burada K_d ara ürünün ayrışma sabiti (k_1/k_2), k_1 hız tayin basamağı hız sabiti ve k_2 de ara ürünün başlangıç maddelerine dönüşme hız sabitidir. Naz'ın doymun olmayan konsantrasyonlarında, her hangi bir dizi pozisyonundan kesimin ikinci mertebeden hız sabiti (k_2), k_1/K_d 'ye eşit olur.

Bağlanma ve kataliz işlemlerinin birbirleriyle ilişkili olduğu gerçek enzimlerin aksine bağlanma parçalanmayı yönlendirir fakat parçalanmayı aktiflendirmez. Kırılmadan sorumlu kimyasal nükleazın redoks işlemleri, DNA molekülüne bağlı olsun ya da olmasın çözeltide devam eder. Eğer k_1 sabitse, K_d herhangi bir dizi pozisyonunun kesiminin ikinci mertebeden hız sabitini yönlendirir ve bağlanma, özgünlüğün temel tayin edici aşamasıdır.

1.2.5. Çalışmanın Bilimsel ve Pratik Önemi

Laboratuvarlarımızda yapılan ön çalışmalarda metal komplekslerinin DNA ile etkileşimi incelenmiş, bazı metal komplekslerinin polinükleotit zincirler üzerinde kırıklar oluşturduğu tespit edilmiş, bu etkileşimin bazı kompleksler durumunda zamana, bazılarında ise kompleksin konsantrasyonuna bağımlı olduğu gözlenmiştir (yayımlanmamış bir çalışma). Dolayısıyla bu ön çalışmada bazı özel metal komplekslerinin nükleaz mimiği olabileceği sonucuna varılmış ve ayrıca nükleolitik aktivite için gerekli çalışma şartları optimize edilmiştir.

Bu çalışmada yeni bir Schiff-bazının Cu(II) ve/veya Mn(II) metal iyonları ile oluşturabileceği komplekslerin deoksiribonükleik asit (DNA) ile etkileşimi incelenmiş ve aşağıdaki amaçlar planlanmıştır:

- a) Bu ligandın metal komplekslerinin oksidatif şartlar altında DNA'yı parçalayabilme yeteneklerinin olup olmadığı.
- b) Bu etkileşimin metal iyonuna, etkileşim periyoduna ve çeşitli ortam şartlarına bağımlılığı.
- c) Bu kompleksler nükleolitik olarak aktif ise DNA parçalama işlemlerinde bir seçiciliklerinin olup olmadığı.
- d) Bu komplekslerin DNA ile etkileşimlerinin niteliği ve mekanizması.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Cihazlar

Tampon çözeltilerinin hazırlanmasında pH ölçümleri Jenway 3010 pH metresi ile gerçekleştirildi. Gece kültürlerinin büyütülmesinde nüve BM 102 model sallayıcı, maddelerin tartılmasında GEC AVERY VA124-1AAZM13AAE model terazi kullanıldı. Çözeltilerin karıştırılması nüve NM 110 model vorteksle yapıldı. İnkübasyon işlemleri nüve EN 500 model inkübatörde gerçekleştirildi. Plazmid DNA izolasyonunda çöktürme işlemleri Hofer MC 1400 model mikrosantrifüjde yapıldı. Agaroz jellerin hazırlanmasında Vestel PS 3000-230 V model mikrodalga fırın kullanıldı. İzole edilen plazmid DNA'larının konsantrasyonları Pharmacia 80-2103-98 model UV/görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü.

Elektroforez işlemleri Owl B1A model elektroforez aletinde Hofer PS3000-230 V model güç kaynağı kullanılarak gerçekleştirildi. Jellerdeki bantlar Hofer UVTM-19 model UV ışın kaynağı kullanılarak gözlemlendi ve Hofer Polaroid kamera ile fotoğrafları alındı.

Spektrofotometrik çalışmalarda ölçümler ATI Unicam UV2-100 model çift ışın yollu ve hücre kalınlığı 10 mm olan kuvarz hücreli ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca 1-10 µL ve 10-100 µL Socorex model, 100-1000 µL Volac model ve 0.5-10 µL'lik Biohit model otomatik pipetleri kullanıldı.

2.2. Kimyasal Maddeler

pCYTEXP plazmid izolasyonunda "Promega Corporation Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems" (Madison, USA) kiti kullanıldı. Luria-Bertani (LB) besiyerinin hazırlanmasında kullanılan bacto-tripton, bacto-maya ekstreği, sodyum klorür ve sodyum hidroksit Merck A. G. (Darmstadt, Germany) 'den sağlandı.

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, glasiyal asetik asit ve komplekslerin çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) Merck A. G. (Darmstadt,

Germany)'den temin edildi. Trizma-baz Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA) 'den satın alındı.

Elektroforetik çalışmalarda kullanılan etidiyum bromür, gliserin, bromofenol mavisi, monomagnezyum peroksifalat (MMPP) ve agaroz Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA)'den, β -merkaptotanol, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), ksilen siyanol Merck A. G. (Darmstadt, Germany)'den temin edildi. Bütün reaktiflerin seyreltilmesi ve çözeltilerinin hazırlanması işlemlerinde destile su kullanıldı.

2.3. Model Suş ve Model Bileşikler

In vitro çalışmalarda kullanılan *Escherichia coli* JM 101 suşu new England Biolabs' dan temin edildi. Bu suşun genotipik özellikleri; F' *traD36 lacI^Δ (lacZ) M15 pro A⁺B⁺ /supE thi Δ (lac-proAB)* (Biolabs) şeklindedir. pCYTEXP plazmid DNA'sı J.E.G. McCarthy (Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Germany) 'den temin edildi.

In vitro çalışmalarda kullanılan nükleaz mimiği olabilecek 3-{2-[2-(2-hidroksiimino-1-metil-propilideneamino)-etilamino]-etilimino}-butan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya mangan içeren homodinükleer bakır(II) (K1), heterodinükleer bakır-mangan (K2) ve trinükleer bakır(II) (K3) kompleksleri Doç. Dr. Serdar Karaböcek (KTÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü) 'ten temin edildi.

2.4. Luria-Bertani Besiyerinin Hazırlanması

1 L de; 10 g bacto-tripton, 5 g bacto-maya ekstrağı, 5 g sodyum klorür içeren besiyeri sodyum hidroksit ile pH 7.5'e ayarlandı ve otoklavda 121 °C'de 1.1 atm basınç altında 15 dakika bekletilip steril edilerek hazırlandı.

2.5. Gece Kültürlerinin Hazırlanması

pCTYEXP plazmidini içeren *E. coli* JM 101 suşundan bir koloni alınıp 50 µg/mL oranında ampisilin içeren LB besiyerinin 3 mL'sine ekildi ve bir gece 37 °C'de 200 rpm'de çalkalanan sulu çalkalayıcıda 12-16 saat kadar büyütüldü.

2.6. pCYTEXP Plazmid DNA'sının İzolasyonu

pCYTEXP plazmid DNA'sının izolasyonu Promega plazmid DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı. Ampisilin içeren LB besiyerinde bir gece büyütülen *E. coli*'nin JM 101 suşu 1.5 mL'lik ependorf tüplerinde 5 dakika 10.000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Her bir tüpe hücre süspansiyon çözeltisinden 250 µL ilave edildi ve vorteksle pellet çözüldü. Tüplere 250 µL hücre parçalama çözeltisi ilave edildi ve tüpler birkaç kez alt üst edilerek yaklaşık 3-4 dakika bekletildi. Daha sonra tüplere 10 µL bazik proteaz çözeltisi eklendi ve birkaç kere alt üst edilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Sonraki aşamada ise tüplere 350 µL Wizard Plus SV nötralleştirme çözeltisi eklendi ve tüpler birkaç kez alt üst edilerek 14.000xg'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.

İkinci aşamada santrifüjleme protokolü uygulandı. Bunun için spin kolonları 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve santrifüjleme sonrası elde edilen süpernatantlar spin kolonuna aktarıldı. Oda sıcaklığında 14.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüplerindeki süpernatant dökülerek tekrar spin kolonuna yerleştirildi. 750 µL kolon yıkama çözeltisinin ilave edilmesinden sonra oda sıcaklığında 14.000xg'de 1 dakika daha santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki süpernatantlar atıldı ve tüpler spin kolonunun altına yerleştirildi. Spin kolonlarına 250 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerinden ayrılan spin kolonları steril ependorf tüplerine yerleştirildi. Plazmid DNA'larını ependorf tüplerine geçirmek için her biri üzerine 100 µL nükleaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 14.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Ependorf tüplerine toplanan pCYTEXP plazmid DNA'sının konsantrasyonları ölçüldükten sonra -20 °C'de saklandı.

2.7. Çözeltilerin Hazırlanması

2.7.1. Elektroforetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Farklı pH'larda (pH 6, 6.5, 7, 7.5) 250 mM potasyum fosfat tamponları şöyle hazırlandı; yaklaşık 43.5 g K₂HPO₄ 1 L saf suda çözülerek dibazik fosfat çözeltisi

hazırlandı. Daha sonra yaklaşık 34 g KH_2PO_4 1 L saf suda çözülerek monobazik fosfat çözeltisi hazırlandı. Dibazik fosfat çözeltisi ayrı ayrı pH 6, 6.5, 7 ve 7.5 oluncaya kadar monobazik fosfat çözeltisi ile titre edildi.

Farklı pH'larda (pH 8, 8.5, 9, 10) 100 mM tris-asetat tamponlarını hazırlamak için 1 L saf suda yaklaşık 12.11 g trizma-bazın çözünmesi ile hazırlanan çözelti 1 L'de yaklaşık 5.7 mL glasiyal asetik asit içeren çözelti ile yukarıda belirtilen farklı 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 saf su ile 1/50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

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

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

Elektroforetik deneylerde kontrol olarak kullanılan bakır ve mangan tuzlarının saf sudaki çözeltileri şöyle hazırlandı: 1 mM bakır perklorat çözeltisi, yaklaşık 0.0025 g $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nun saf suda çözülüp 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. 1 mM mangan asetat çözeltisi, yaklaşık 0.0037 g $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 'nun saf suda çözülüp 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Daha sonra yapılan seyreltme işlemleri bu stoklar kullanılarak yapıldı.

Elektroforetik çalışmalar için komplekslerin stok çözeltileri aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandı: 10 mM K1 çözeltisi; 0.079 g K1 tartılıp 1 mL DMSO'da çözüldü ve saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. 10 mM K2 çözeltisi; 0.096 g K2 tartılıp 1 mL DMSO'da çözüldü ve saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. 10 mM (K3) çözeltisi; 0.093 g K3 tartılıp saf suda çözüldü ve yine saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. 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 döküldü ve mikrodalga fırında yaklaşık 1 dakika kaynatıldı. Karışım 50-60 °C'ye kadar soğutulup içine 10 μL etidiyum bromür çözeltisi katılıp elektroforez aletinin jel kalıbına döküldü.

2.7.2. Spektroskopik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM'lık potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) hazırlamak için 1 L saf suda yaklaşık 8.7 g K_2HPO_4 çözünmesi ile hazırlanan dibazik fosfat çözeltisi 1 L saf suda yaklaşık 6.8 g KH_2PO_4 çözünmesi ile hazırlanan monobazik fosfat çözeltisi ile pH 7.0 oluncaya kadar titre edildi.

Spektroskopik çalışmalarda kullanılan komplekslerin stok çözeltileri elektroforetik çalışmalarda hazırlanan stok çözeltiler gibi aynı konsantrasyon ve hacimde hazırlandı. Aralarındaki fark, spektroskopik çalışmalarda kullanılan stok çözeltileri hazırlarken saf su yerine 50 mM potasyum fosfat tamponunun (pH 7.0) kullanılmasıdır. Daha sonra yapılan bütün seyreltme işlemleri bu stoklar kullanılarak hazırlandı.

2.8. Nükleolitik Aktivite Deneyleri

2.8.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Komplekslerin Nükleaz Etkinliklerinin İncelenmesi

Bakır ve mangan komplekslerinin farklı konsantrasyon, pH, sıcaklık ve zaman aralıklarında nükleaz aktivitesi gösterip göstermediğini incelemek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı (Gravert, Griffin 1993; Sakai, vd., 1992). Nükleolitik aktivite deneyleri sonunda oluşan form I (süpersarmal DNA), form II (kırık DNA) ve form III (lineer DNA) şekilleri, bunların agaroz jelde farklı hızlarda göç etmeleri ilkesine dayanarak gözlemlendi.

K1, K2 ve K3 komplekslerinin farklı konsantrasyonlarda (0.01 μ M-1000 μ M), sabit sıcaklıkta (37°C) ve farklı zaman aralıklarında (10 dakika-1 saat) nükleaz etkinlikleri araştırıldı. Son hacmi 10 μ L olan reaksiyon karışımları, komplekslerin son hacimde istenilen konsantrasyonlarını sağlayan stok çözeltilerinin 1 μ L'sini, son hacimdeki konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde 2 μ L 250 mM potasyum fosfat tamponunu (pH 7.0), son hacimde konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1 μ L 10 mM MMPP çözeltisini ve 6 μ L konsantrasyonu bilinen pCYTEXP plazmid DNA'sını içermektedir.

Sabit sıcaklık (37 °C) ve pH (7.0)'da 10 dakika veya 1 saat bekletilen reaksiyon karışımlarına daha sonra 5'er µL sonlandırma çözeltisi ilave edilerek reaksiyonlar durduruldu. Bu işlemten sonra örnekler uygun sıraya göre % 1'lik nötral agaroz jellere yüklendi. Jellerin ilk kuyularına kontrol olarak içine yürütme boyası katılan pCYTEXP plazmidleri yüklendi. Jellerin üzerindeki bantların ayrımı oldukça belirgin oluncaya kadar yaklaşık 2-3 saat 50-60 V akım uygulanarak elektroforez edildi. UV lambası altında bantlar gözlemlendi ve jellerin fotoğrafları alındı.

Molecular Analyst™ /PC Windows Software for Bio-Rad's Image Analysis Systems Version 1.4 (Bio-Rad Laboratories, USA) programı yardımı ile bütün jellerin görüntüsü alınarak form I, II ve III'ün bağıl oranları tahmin edildi.

2.8.2. Nükleaz Etkinliği Gösteren Kompleksler İçin Uygun Şartların Belirlenmesi

2.8.2.1. İnkübasyon Zamanının Nükleaz Etkinliğine Etkisi

K1, K2 ve K3 komplekslerinin pCYTEXP plazmid DNA'sını kestiği uygun konsantrasyonlar kullanılarak belirli pH ve sıcaklık değerlerinde farklı inkübasyon zamanlarındaki nükleolitik aktiviteleri incelendi. K1 ve K2 kompleksleri için toplam hacim olan 10 µL'deki konsantrasyonları 0.1 µM olacak şekilde 1 µM'lık çözeltilerinden 1 µL ve K3 kompleksi için ise toplam hacim olan 10 µL'deki konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde 1000 µM'lık çözeltisinden 1 µL alındı. Üzerine toplam hacimdeki konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde 250 mM'lık potasyum fosfat tomponundan (pH 7.0) 2 µL, toplam hacimdeki konsantrasyonu 1mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltisinden 1 µL ve konsantrasyonu bilinen pCYTEXP plazmidinden 6 µL konuldu. Daha sonra bu reaksiyon karışımları 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika, 2 ve 6 saatlik zaman aralıklarında 25 ve 37 °C'de ayrı ayrı bekletildi. Bu sürelerin sonunda her bir reaksiyon karışımına 5 µL sonlandırma çözeltisi ilave edildi. Örnekler sırasıyla % 1'lik nötral agaroz jellere yüklendi. Jellerin ilk kuyularına kontrol amacıyla içinde yürütme boyası bulunan pCYTEXP plazmid DNA'sı, ikinci kuyularına ise *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen pCYTEXP plazmid DNA'sı yüklendi. Jeller yaklaşık 2-3 saat 50-60 V'luk akımda elektroforez edildi ve oluşan bantlar UV lambası altında gözlemlenip jellerin fotoğrafları alındı.

2.8.2.2. Kompleks Konsantrasyonlarının Nükleaz Etkinliğine Etkisi

K1, K2 ve K3 komplekslerinin pH 7.0'da, 37 °C'de ve 1 saatlik inkübasyon sürelerinde 0.1 μM - 1000 μM 'lık konsantrasyon aralıklarındaki nükleaz aktiviteleri incelendi. Komplekslerin son hacim olan 10 μL 'de belirli konsantrasyonlarda olacak şekilde stok çözeltilerden seyreltilmiş olan çözeltilerinden 1 μL alındı. Üzerine son hacimdeki konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde 250 mM'lık potasyum fosfat tamponundan (pH 7.0) 2 μL , son hacimdeki konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltilerinden 1 μL ve konsantrasyonu bilinen pCYTEXP plazmid DNA'sından da 6 μL ilave edilip 37 °C'de 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir örneğe 5 μL sonlandırma çözeltisi ilave edilip sırayla % 1'lik nötral agaroz jelinin kuyularına yüklendi. Jellerin ilk birkaç kuyusuna kontroller yüklendi. Kontroller, içine yürütme boyası bulunan pCYTEXP plazmid DNA'sını, *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen pCYTEXP plazmid DNA'sını, son hacimdeki konsantrasyonları 100 μM olan ve aynı şartlar altında pCYTEXP plazmid DNA'sı ile muamele edilen bakır, mangan tuzlarını (MMPP'li ve MMPP'siz ortamda) ve ligandı içermektedir. Jellere yaklaşık 2-3 saat 50-60 V'luk bir akım uygulandı ve sonuçlar UV lambası altında gözlemlenip jellerin fotoğrafları alındı.

2.8.2.3. Ortamın pH Değerinin Nükleaz Etkinliğine Etkisi

K1, K2 ve K3 komplekslerinin pCYTEXP plazmid DNA'sını kestiği uygun konsantrasyonlarında, 37 °C'de ve 1 saatlik inkübasyon süresindeki nükleaz aktiviteleri farklı pH'larda incelendi. K1 ve K2 komplekslerinin son hacim olan 10 μL 'deki konsantrasyonları 0.1 μM olacak şekilde 1 μM 'lık çözeltilerinden 1 μL , K3 kompleksinin ise son hacimdeki konsantrasyonu 100 μM olacak şekilde 1000 μM 'lık çözeltilerinden 1 μL alındı. Üzerlerine son hacimdeki konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 10 mM'lık MMPP çözeltilerinden 1 μL ve farklı pH değerlerini sağlamak için 6, 6.5, 7, 7.5'lik 250 mM'lık potasyum fosfat tamponlarından son hacimdeki konsantrasyonları 50 mM olacak şekilde 2 μL , 8, 8.5, 9, 10 luk 100 mM'lık tris-asetat tamponlarından son hacimdeki konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde 2'şer μL ve konsantrasyonu bilinen pCYTEXP

plazmid DNA'sından 6 µL ilave edildi. Bu reaksiyon karışımları 37 °C'de 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımları üzerine 5'er µL sonlandırma çözeltisi katıldı ve örnekler % 1'lik agaroz jellerin kuyularına sırayla yüklendi. Jellerin ilk iki kuyusuna kontrol olarak sıra ile içerisine yürütme boyası katılan pCYTEXP plazmid DNA'sı ve *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen pCYTEXP plazmid DNA'sı yüklendi. Jeller yaklaşık 2-3 saat 50-60 V'luk akımda elektroforez edildi ve oluşan bantlar UV lambası altında gözlemlenip jellerin fotoğrafları alındı.

2.8.3. Spektroskopik Çalışmalar

K1, K2 ve K3 komplekslerinin pH'ı 7.0 olan 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanan uygun konsantrasyonlardaki çözeltileri ve konsantrasyonu bilinen pCYTEXP plazmid DNA'sı kullanılarak spektroskopik çalışmalar gerçekleştirildi. İlk olarak K1, K2 ve K3 komplekslerinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu aralıkları seçildi ve maksimum absorbansları kaydedildi. Komplekslerin spektrumu alındıktan sonra bu çözeltilerden 900 µL alınıp üzerine konsantrasyonu 50 µg/mL olan pCYTEXP plazmid DNA'sından son hacim 1 mL olacak şekilde ilave edilerek, oda sıcaklığında (25-26 °C) dengenin sağlanması için 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda örneklerin DNA ile etkileşimlerine bağlı olarak daha önce taranan dalga boyu aralıklarında absorbanslarındaki değişimler ve kaymalar kaydedildi.

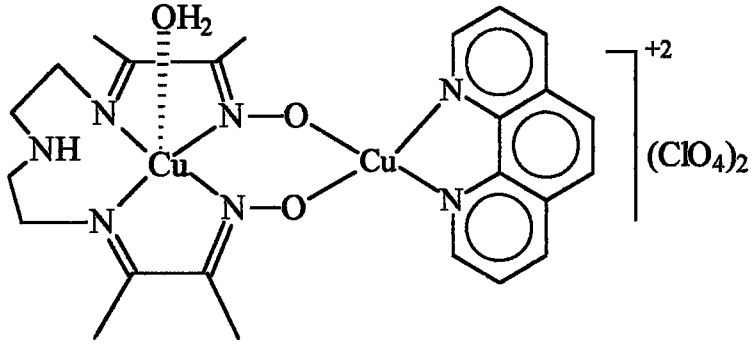
3. BULGULAR

In vitro çalışmalarda kullanılan nükleaz mimiği olabilecek 3-{2-[2-(2-hidroksiimino-1-metil-propilideneamino)-etilamino]-etilimino}-butan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya mangan içeren homodinükleer bakır(II) (K1), heterodinükleer bakır-mangan (K2) ve trinükleer bakır(II) (K3) komplekslerinin (Şekil 25) DNA ile olabilecek etkileşimleri bir kooksidan olan magnezyummonoperoksifitalat (MMPP) yokluğunda ve varlığında pCYTEXP (5 kb) plazmidinin süpersarmal formu kullanılarak gerçekleştirildi. Çeşitli kontrol deneyleri ile kompleksler ortamda bulunmadığı durumda DNA üzerinde her hangi bir değişim olup olmadığı araştırıldı. DNA ile beraber MMPP varlığında ve kompleks yokluğunda DNA üzerinde herhangi bir elektroforetik değişim gözlenmedi. Komplekslerin DNA üzerinde değişim yaptıkları konsantrasyon değerlerinde bakır(II) perklorat veya mangan(II) asetatın bir değişime sebep olmadığı gözlemlendi.

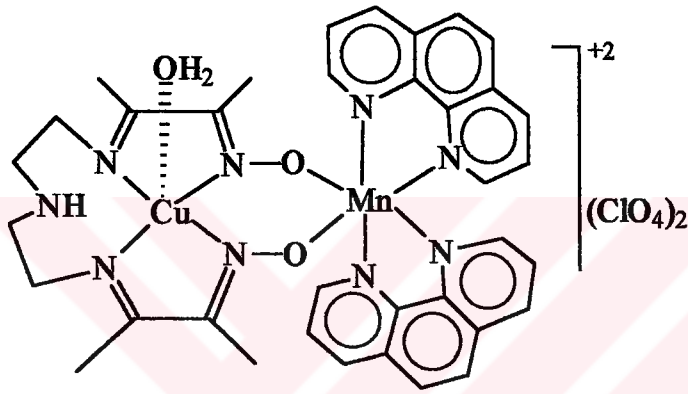
K1, K2 ve K3 kompleksleri ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar elektroforez ve spektrofotometri olmak üzere iki başlık altında gruplandırılabilir. Nötral agaroz jel elektroforez deneylerinde, komplekslerin DNA ile reaksiyon süresi ve pH gibi çeşitli ortam parametrelerine bağlı olarak süpersarmal DNA'nın kırık, lineer ve daha küçük DNA parçacıklarının varlığı gözlemlendi. Spektroskopik deneyler ise DNA ile olan zayıf etkileşimlerinin bir sonucu olarak komplekslerin spektrumlarında meydana gelebilecek kaymalar ve absorbanstaki değişimler tespit edilmiş ve nasıl bir mekanizma ile nükleolitik etkinlik gösterdikleri irdelenmeye çalışılmıştır.

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları

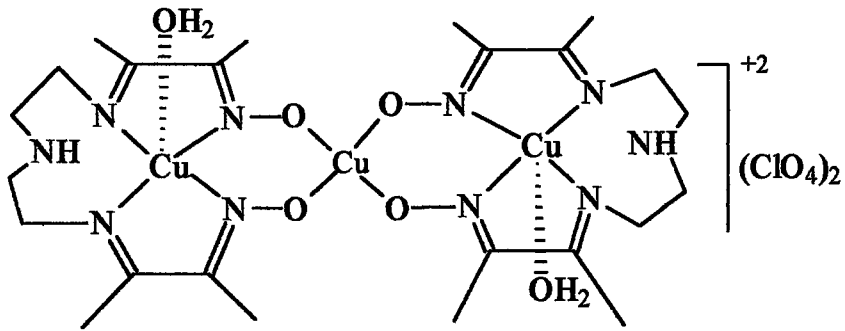
K1, K2 ve K3 komplekslerinin süpersarmal DNA ile olabilecek etkileşimleri ve DNA üzerinde oluşabilecek konformasyonel değişimler, DNA'nın süpersarmal (form I) halinin kırık (form II) ve/veya lineer (form III) hale dönüşmesi ve bu formların agaroz jeli üzerindeki hareketlerindeki açık farklılıktan dolayı agaroz jel elektroforezi ile kolayca tespit edilebilir. Bu teknik yardımıyla komplekslerin DNA ile etkileşimleri ve oluşan DNA formlarının bağlı oranlarının kompleks konsantrasyonu, ortamın pH'ı ve DNA ile reaksiyon zamanı gibi ortamla ilgili çeşitli parametrelerin değiştirilmesi ile incelendi.



(K1)



(K2)



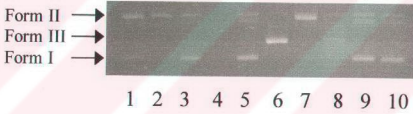
(K3)

Şekil 25. 3-{2-[2-(2-hidroksiimino-1-metil-propilideneamino)-etilamino]-etilimino}-butan-2-on oksim ligandının bakır ve/veya mangan içeren homodinükleer bakır(II) (K1), heterodinükleer bakır-mangan (K2) ve trinükleer bakır(II) (K3) komplekslerinin önerilen kimyasal yapıları

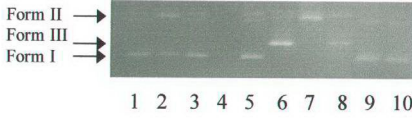
3.1.1. Kompleks-DNA Etkileşiminin Konsantrasyona Bağlılığı

Her bir çalışmada kullanılan DNA, MMPP, ligand yada metal iyon miktarı ile reaksiyon ortamının sıcaklığı, süresi ve pH değeri gibi çeşitli reaksiyon şartları yanında elektroforetik potansiyel değeri ile süresi gibi elektroforez şartları da kaydedildi. Bazı deneylerde plazmid DNA'ya düşük konsantrasyonda izole edildi veya hem form I ve hem de form II belirli oranlarda mevcut idi.

Kompleks-DNA etkileşiminin varlığını ortaya koymak amacıyla çeşitli kontrol deneyleri yapıldı. Kompleksler yokluğunda elde edilen kontrol deneyleri ve her bir kompleksin iki farklı konsantrasyonunda MMPP yokluğunda ve varlığında elde edilen elektroforetik profiller Şekil 26, 27 ve 28'de gösterilmiştir. Şekil 26, 27 ve 28'de 34 µg/ml DNA ile ayrı ortamlarda K1, K2 ve K3'ün 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon zamanında ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 55 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 26. K1 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA-100 µM ligand; 2, DNA-MMPP; 3 DNA-Cu; 5, DNA; 6, DNA-*EcoRI*; 7, 50 µM K1+MMPP; 8, 100 µM K1+MMPP; 9, 50 µM K1; 10, 100 µM K1



Şekil 27. K2 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA-Mn; 2, DNA-Mn-MMPP; 3 DNA-Cu-Mn; 5, DNA; 6, DNA-*EcoRI*; 7, 50 μM K2+MMPP; 8, 100 μM K2+MMPP; 9, 50 μM K2; 10, 100 μM K2

Kontrol deneylerinde DNA kooksidan olan magnezyummonoperoksiflatat (MMPP), ligand veya komplekslerde mevcut olan metallerin tuzlarının çözeltileri ile muamele edilerek gerçekleştirildi. Bu ortamlarda süpersarmal DNA'nın bağıl oranında bir değişmeye sebep olup olmadığı kontrol edildi. DNA ile beraber MMPP varlığında ve kompleks yokluğunda DNA üzerinde herhangi bir elektroforetik değişim gözlenmedi. Komplekslerin DNA üzerinde değişim yaptıkları konsantrasyon değerlerinde bakır(II) perklorat veya mangan(II) asetatın bir değişime sebep olmadığı gözlemlendi.



Şekil 28. K3 kompleksinin MMPP varlığında ve yokluğunda DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA-ligand; 2, DNA-MMPP; 3 DNA-Cu; 5, DNA; 6, DNA-*EcoRI*; 7, 50 μM K3+MMPP; 8, 100 μM K3+MMPP; 9, 50 μM K3; 10, 100 μM K3

3.1.1.1. Uzun Reaksiyon Sürelerinde Kompleks Konsantrasyonların Etkisi

Komplekslerin konsantrasyonuna bağlılığı 0.01 μM - 1000 μM gibi çok geniş bir konsantrasyon aralığında ve her bir kompleks için 60 dakikalık reaksiyon zamanlarında incelendi. Şekil 29'da 34.9 $\mu\text{g/ml}$ DNA ile K1'in 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saatlik reaksiyon zamanında

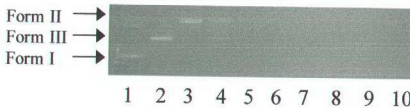
ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 54 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 29. K1 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA-*EcoRI*; 2, DNA; 3 0.01 μM K1; 4, 0.1 μM K1; 5, 1 μM K1; 6, 10 μM K1; 7, 50 μM K1; 8, 100 μM K1; 9, 500 μM K1; 10, 1000 μM K1

Şekil 29'da görüldüğü gibi 1 saatlik reaksiyon süresinde ve MMPP varlığında 0.01 μM K1 konsantrasyonunda DNA tamamen form II şekline dönüşmüştür. 0.1 μM K1 konsantrasyonunda DNA form II ve form III şekline dönüşmüştür. 1 μM -1000 μM K1 konsantrasyon aralığında ise hiçbir bant görülmemiştir. 1 saatlik reaksiyon süresinde K1'in düşük konsantrasyonları DNA'yı form II ve form III şekline dönüştürmüştür. K1'in yüksek konsantrasyonları ise DNA'yı tamamen parçalamıştır.

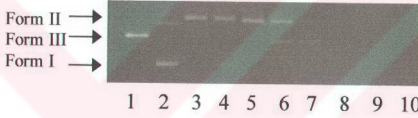
Şekil 30'da 34 $\mu\text{g/ml}$ DNA ile K2'nin 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon zamanında ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 55 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 30. K2 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, 0.01 μM K2; 4, 0.1 μM K2; 5, 1 μM K2; 6, 10 μM K2; 7, 50 μM K2; 8, 100 μM K2; 9, 500 μM K2; 10, 1000 μM K2

Şekil 30'da görüldüğü gibi 1 saatlik reaksiyon süresinde ve MMPP varlığında 0.01 μM K2 konsantrasyonunda DNA tamamen form II şekline dönüşmüştür. 0.1 μM K2 konsantrasyonunda DNA form II ve form III şekline dönüşmüştür. 1 μM - 1000 μM K2 konsantrasyon aralığında ise hiçbir bant görülmemiştir. 1 saatlik reaksiyon süresinde K2'nin düşük konsantrasyonları DNA'yı form II ve form III şekline dönüştürmüştür. K2'nin yüksek konsantrasyonları ise DNA'yı tamamen parçalamıştır.

Şekil 31'de 64.7 $\mu\text{g/ml}$ DNA ile K3'nin 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon zamanında ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.

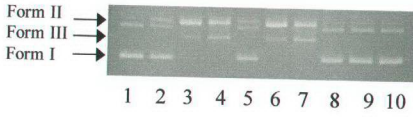


Şekil 31. K3 kompleksinin MMPP varlığında DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA-*EcoRI*; 2, DNA; 3, 1 μM K3; 4, 10 μM K3; 5, 50 μM K3; 6, 100 μM K3; 7, 300 μM K3; 8, 500 μM K3; 9, 800 μM K3; 10, 1000 μM K3

Şekil 31'de görüldüğü gibi 1 saatlik reaksiyon süresinde ve MMPP varlığında 1 μM , 10 μM ve 50 μM K3 konsantrasyonlarında DNA form II şekline dönüşmüştür. 100 μM K3 konsantrasyonunda DNA form II ve form III şekline dönüşmüştür. 300 μM K3 konsantrasyonunda da DNA form II ve form III şekline dönüşmüştür, fakat bantların şiddetinde bir azalma görülmüştür. 500 μM -1000 μM K3 konsantrasyon aralığında ise hiçbir bant görülmemiştir. 1 saatlik reaksiyon süresinde K3'ün düşük konsantrasyonları DNA'yı form II ve form III şekline dönüştürmüştür. K3'ün yüksek konsantrasyonları ise DNA'yı tamamen parçalamıştır.

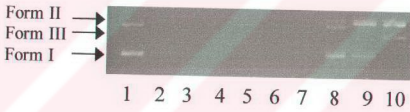
3.1.1.2. Kısa Reaksiyon Sürelerinde Kompleks Konsantrasyonların Etkisi

Komplekslerin konsantrasyonuna bağımlılığı 0.01 μM -1000 μM gibi çok geniş bir konsantrasyon aralığında ve her bir kompleks için ayrıca 10 dakikalık reaksiyon zamanlarında da incelendi.



Şekil 32. Komplekslerin MMPP varlığında düşük konsantrasyonlarının 10 dakikalık reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA; 2, 0.01 μM K1; 3, 0.1 μM K1; 4, 1 μM K1; 5, 0.01 μM K2; 6, 0.1 μM K2; 7, 1 μM K2; 8, 0.01 μM K3; 9, 0.1 μM K3; 10, 1 μM K3

Şekil 33'te 64.7 $\mu\text{g/ml}$ DNA ile komplekslerin MMPP varlığında 37 °C'de 10 dakikalık reaksiyon zamanında ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



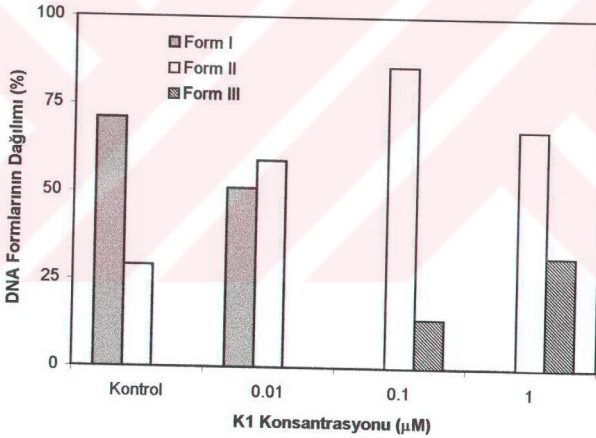
Şekil 33. Komplekslerin MMPP varlığında yüksek konsantrasyonlarının 10 dakikalık reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilip jele yüklenen örnekler sırasıyla şu bileşenleri içermiştir: 1, DNA; 2, 10 μM K1; 3, 100 μM K1; 4, 1000 μM K1; 5, 10 μM K2; 6, 100 μM K2; 7, 1000 μM K2; 8, 10 μM K3; 9, 100 μM K3; 10, 1000 μM K3

Şekil 32 ve Şekil 33'deki elektroforetik jelden elde edilen veriler K1 için Tablo 2 ile Şekil 34'te, K2 için Tablo 3 ile Şekil 35'te ve K3 için ise Tablo 4 ile Şekil 36'da ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 2. K1 varlığında DNA formlarının dağılımı

[K1] (μM)	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
Kontrol	71	29	0
0.01	51	59	0
0.1	0	86	14
1	0	68	32

0.1 μM konsantrasyona kadar K1 durumunda süpersarmal DNA konsantrasyonunda azalma ve kırık DNA miktarında bir artma gerçekleşmiştir. 1 μM K1 durumunda ise süpersarmal DNA tükenirken bir miktar doğrusal DNA oluşumu söz konusudur. Aynı zamanda doğrusal formun bağıl oranına göre kırık DNA miktarında da belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 34).



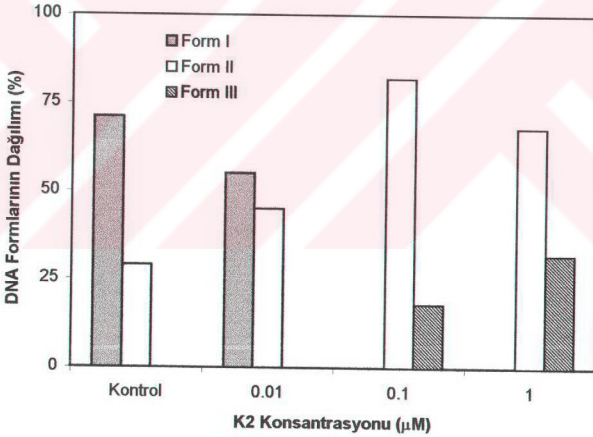
Şekil 34. K1 varlığında DNA formlarının dağılımı

K1 durumundaki verilere benzer bir durum K2 varlığında da elde edilmiştir. 0.1 μM konsantrasyona kadar K2 durumunda süpersarmal DNA konsantrasyonunda azalma ve kırık DNA miktarında bir artma gerçekleşmiştir (Tablo 3). 1 μM K1 durumunda

ise süpersarmal DNA tükenirken bir miktar doğrusal DNA oluşumu söz konusudur. Aynı zamanda doğrusal formun miktarına göre kırık DNA miktarında da belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 35).

Tablo 3. K2 varlığında DNA formlarının dağılımı

[K2] (μM)	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
Kontrol	71	29	0
0.01	55	45	0
0.1	0	82	18
1	0	68	32



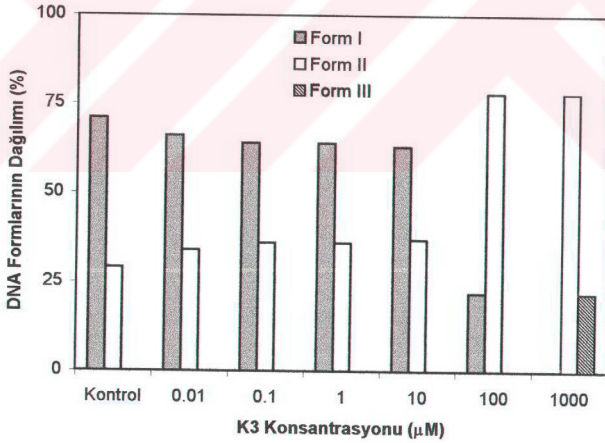
Şekil 35. K2 varlığında DNA formlarının dağılımı

K3 diğer iki kompleks olan K1 ve K2'den oldukça farklı bir davranış göstermiştir (Tablo 4). Bu kompleksin 100 μM konsantrasyonuna kadar oldukça az oranlarda süpersarmal DNA miktarı azalırken kırık DNA miktarı aynı ölçüde artmış ancak

100 mM'dan sonra süpersarmal tamamen tükenmiş ve %22'lik bir doğrusal DNA formu gözlenmiştir (Şekil 36). Dolayısıyla süpersarmal DNA'nın doğrusal forma dönüşebilmesi için K1 ve K2'den çok daha yüksek ve en az 100 μ M konsantrasyonlarda K3 gerekmiştir. Bu konsantrasyon değerine kadar süpersarmal ve kırık DNA miktarlarındaki değişim oldukça azdır.

Tablo 4. K3 varlığında DNA formlarının dağılımı

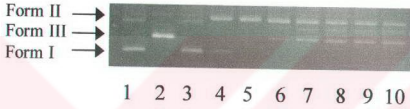
[K3] (μ M)	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
Kontrol	71	29	0
0.01	66	34	0
0.1	64	36	0
1	64	36	0
10	63	37	0
100	22	78	0
1000	0	78	22



Şekil 36. K3 varlığında DNA formlarının dağılımı.

3.1.2. Kompleks-DNA Etkileşiminin Zamana Bağlılığı

Komplekslerle plazmid DNA'nın etkileşiminin zamana bağlılığı reaksiyon karışımı oluşturulduğu an ile bu zamandan başlayarak 10'ar dakikalık aralıklarla gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin elektroforetik profilleri alınarak elde edildi. Şekil 37'de 33.2 µg/ml DNA ve 0.1 µM K1 ile MMPP varlığında 25 °C'de çeşitli reaksiyon sürelerinde ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 1.5 saat yürütülmesiyle elde edilen jel görülmektedir.



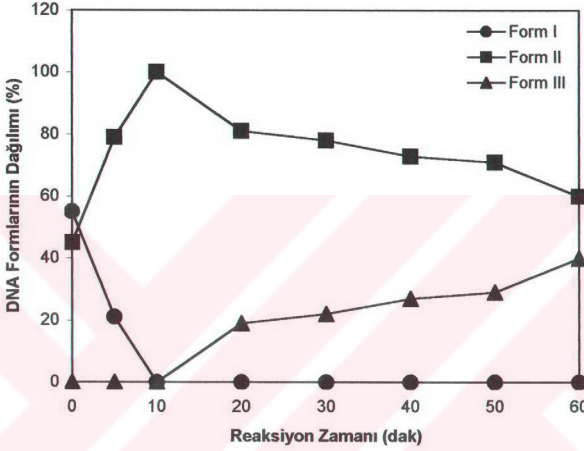
Şekil 37. K1 kompleksinin MMPP varlığında reaksiyon karışımının hazırlandığı ilk andan itibaren çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, başlangıç anı; 4, 5 dak.; 5, 10 dak.; 6, 20 dak.; 7, 30 dak.; 8, 40 dak.; 9, 50 dak.; 10, 60 dak.

K1 durumunda elde edilen elektroforetik veriler (Tablo 5) kullanılarak bu kompleks varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı ve oluşan DNA formlarının dağılım eğrileri çizilmiştir (Şekil 38).

Tablo 5. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı

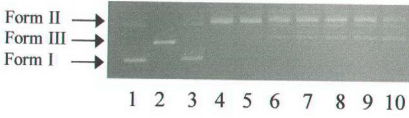
Zaman (dk)	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
Başlangıç	55	45	0
5	21	79	0
10	0	100	0
20	0	81	19
30	0	78	22
40	0	73	27
50	0	71	29
60	0	60	40

K1 varlığında ilk 10 dakikalık bir reaksiyon süresi içinde süpersarmal DNA tamamen tükenirken kırık DNA miktarı maksimum düzeye ulaşmıştır. Ülerleyen sürelerde ise kırık DNA miktarında hemen hemen düzenli bir azalmaya bağlı olarak doğrusal DNA miktarında da bu ölçüde bir artış gözlenmiştir (Şekil 38).



Şekil 38. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı

Şekil 39'da 19.1 µg/ml DNA ile 0.1 µM K2 kompleksi ve MMPP varlığında 25 °C'de çeşitli reaksiyon sürelerinde ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 1.5 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jel görülmektedir.



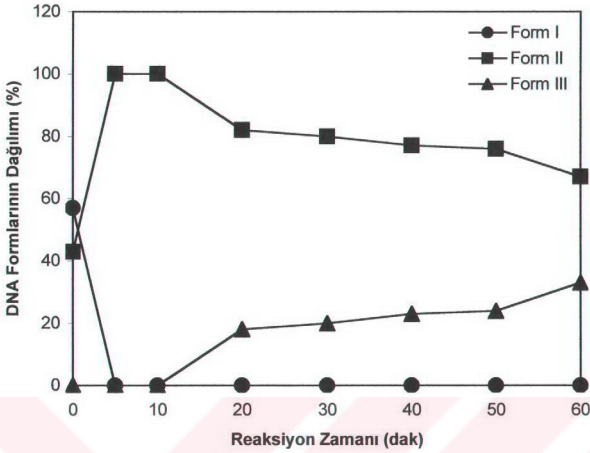
Şekil 39. K2 kompleksinin MMPP varlığında reaksiyon karışımının hazırlandığı ilk andan itibaren çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, başlangıç anı; 4, 5 dak.; 5, 10 dak.; 6, 20 dak.; 7, 30 dak.; 8, 40 dak.; 9, 50 dak.; 10, 60 dak.

K2 durumunda elde edilen elektroforetik veriler (Tablo 6) kullanılarak bu kompleks varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı ve oluşan DNA formlarının dağılımı eğrileri çizilmiştir (Şekil 40).

Tablo 6. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı

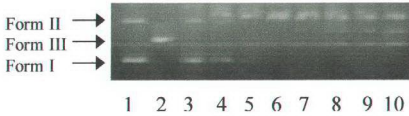
Zaman (dk)	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
Başlangıç	57	43	0
5	0	100	0
10	0	100	0
20	0	82	18
30	0	80	20
40	0	77	23
50	0	76	24
60	0	67	33

Reaksiyon süreleri ve oluşan DNA formları açısından karşılaştırıldıklarında K2 kompleksi K1'e oldukça benzer bir davranış göstermiştir. Ancak K2 durumunda süpersarmal DNA ilk 5 dakika içerisinde tamamen tükenmiş ve 5 ile 10 dakika içerisinde kırık DNA miktarı sabit düzeylerde kalmıştır. Takip eden sürelerde ise kırık DNA miktarında hemen hemen düzenli bir azalmaya bağlı olarak doğrusal DNA miktarında da bu ölçüde bir artış gözlenmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin zamana bağlılığı

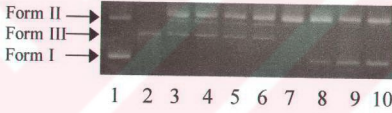
Şekil 41'de 47.9 µg/ml DNA ile 100 µM K3 kompleksi ve MMPP varlığında 25 °C'de çeşitli reaksiyon sürelerinde ve fosfat tamponunda (pH=7.0) gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 52 V'luk bir potansiyelde 3 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jel görülmektedir.



Şekil 41. K3 kompleksinin MMPP varlığında reaksiyon karışımının hazırlandığı ilk andan itibaren çeşitli reaksiyon sürelerinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, başlangıç anı; 4, 5 dak; 5, 10 dak; 6, 20 dak; 7, 30 dak; 8, 40 dak; 9, 50 dak; 10, 60 dak.

3.1.3. Kompleks-DNA Etkileşiminin pH-Bağımlılığı

Komplekslerle plazmid DNA'nın etkileşiminin ortamın pH değerine bağımlılığı uygun tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlemlerde pH 6.0-7.5 ortamının sağlanması amacıyla 50 mM potasyum fosfat tamponu ve pH 8.0-10.0 ortamının sağlanması için de 20 mM tris-asetat tamponu kullanılmıştır. Komplekslerin etkin oldukları sabit konsantrasyon değerlerinde pH 6.0-10.0 arasında komplekslerin DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan türlerin elektroforetik profilleri alınarak incelendi. Şekil 42'de 74.5 µg/ml DNA ile 0.1 µM K1 ile MMPP varlığında 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon süresinde ve çeşitli pH değerlerinde gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 54 V'luk bir potansiyelde 2.5 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jelin fotoğrafı görülmektedir.



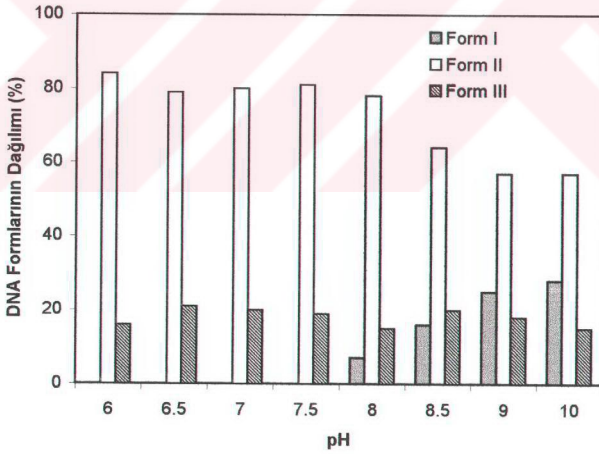
Şekil 42. K1 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10

Çeşitli pH değerlerinde elde edilen bu veriler (Tablo 7) ile gözlenen nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı ve oluşan DNA formlarının dağılımı eğrileri çizilmiştir (Şekil 43).

Tablo 7. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

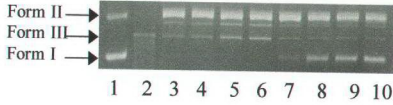
pH	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
6.0	0	84	16
6.5	0	79	21
7.0	0	80	20
7.5	0	81	19
8.0	7	78	15
8.5	16	64	20
9.0	25	57	18
10.0	28	57	15

K1 durumunda pH 8.0'e kadar kırık ve doğrusal DNA formlarının bağlı miktarlarında oldukça az değişme gerçekleşmesine rağmen pH 8.0'den daha yüksek değerlerde bu iki formun miktarlarındaki değişme ile beraber süpersarmal DNA formunun oluşmaya başladığı ve pH 10 değerine kadar bağlı miktarında diğer iki forma göre düzenli bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 43).



Şekil 43. K1 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

Şekil 44'te 74.5 µg/ml DNA ile 0.1 µM K2 ile MMPP varlığında 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon süresinde ve çeşitli pH değerlerinde gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 2.5 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jel görülmektedir.



Şekil 44. K2 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 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

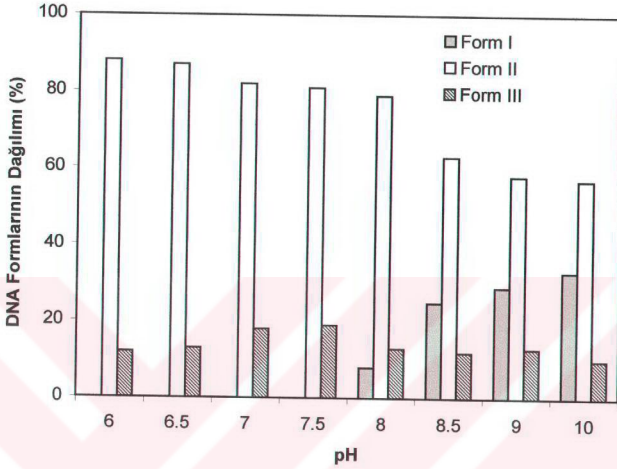
Çeşitli pH değerlerinde K2 varlığında elde edilen verilerin (Tablo 8) kullanılmasıyla gözlenen nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı ve oluşan DNA formlarının dağılımı eğrileri çizilmiştir (Şekil 45).

Tablo 8. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

pH	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
6.0	0	88	12
6.5	0	87	13
7.0	0	82	18
7.5	0	81	19
8.0	8	79	13
8.5	25	63	12
9.0	29	58	13
10.0	33	57	10

K2 durumunda da K1'in davranışına oldukça benzer bir sonuç elde edilmiştir. pH 8.0 değerine kadar kırık ve doğrusal DNA formlarının bağlı miktarlarında oldukça az değişme gerçekleşmesine rağmen pH 8.0'den daha yüksek değerlerde bu iki formun miktarlarındaki değişme ile beraber süpersarmal DNA formunun oluşmaya başladığı ve

pH 10 değerine kadar bağıl miktarında diğer iki forma göre düzenli bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 45).



Şekil 45. K2 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

Şekil 46'da 74.5 µg/ml DNA ile 100 µM K3 ile MMPP varlığında 37 °C'de 1 saatlik reaksiyon süresinde ve çeşitli pH değerlerinde gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan DNA formlarının 60 V'luk bir potansiyelde 2 saat yürütülmesiyle elde edilen elektroforetik jel görülmektedir.



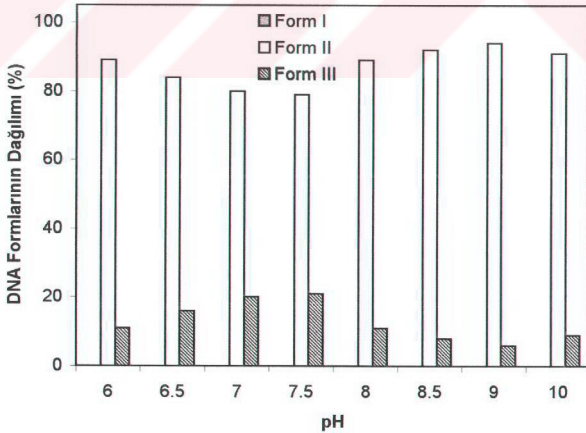
Şekil 46. K3 kompleksinin MMPP varlığında çeşitli pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında 1 saatlik reaksiyon süresinde DNA süpersarmal yapısı üzerine etkisi. Sıra numaraları rakamlarla gösterilmiştir. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, DNA; 2, DNA-*EcoRI*; 3, pH 6.0; 4, pH 6.5; 5, pH 7.0; 6, pH 7.5; 7, pH 8.0; 8, pH 8.5; 9, pH 9.0; 10, pH 10

Çeşitli pH değerlerinde K3 varlığında elde edilen verilerin (Tablo 9) kullanılmasıyla gözlenen nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı ve oluşan DNA formlarının dağılımı eğrileri çizilmiştir (Şekil 47).

Tablo 9. K3 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

pH	DNA Formu (%)		
	Form I	Form II	Form III
6.0	0	84	11
6.5	0	89	16
7.0	0	80	20
7.5	0	79	21
8.0	0	89	11
8.5	0	92	8
9.0	0	94	6
10.0	0	91	9

K3 durumunda gözlenen nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı da K1 ve K2'de gözlenen davranışlardan oldukça farklı bulunmuştur. Uygulanan bütün pH değerlerinde süpersarmal DNA formunun tamamen kırık ve doğrusal DNA formlarına dönüştüğü ve bu formların pH ile sadece bağıl oranlarında bir değişme olduğu ancak bu pH değerlerinde baskın bir şekilde kırık DNA formunun bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 47).

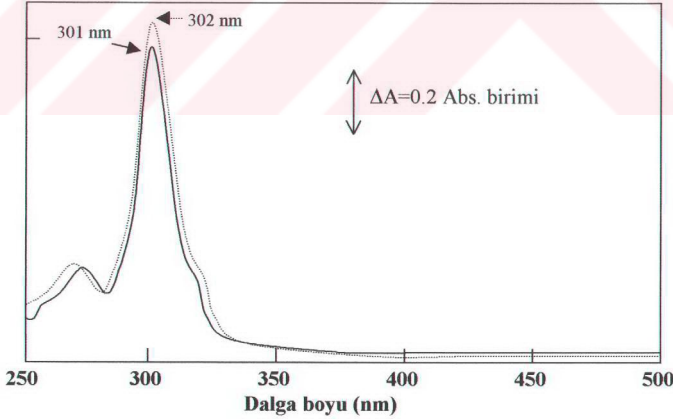


Şekil 47. K3 varlığındaki nükleolitik aktivitenin pH bağımlılığı

3.2. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi Çalışmaları

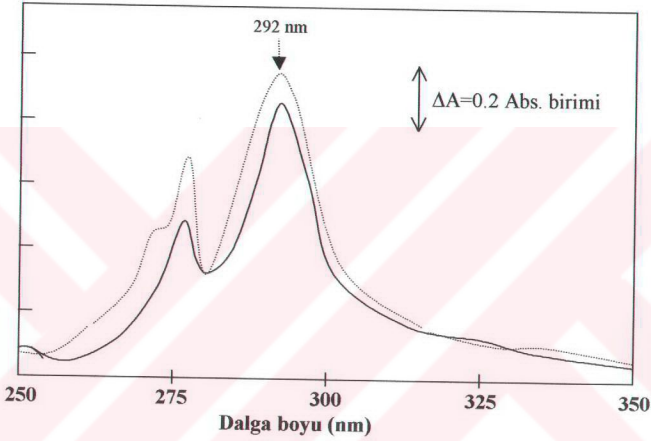
Komplekslerle ayrı ayrı DNA moleküllerinin etkileştiğini tespit etmek amacıyla spektroskopik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Belirli konsantrasyonlarda kompleksi içeren çözeltilere yine bilinen konsantrasyonlarda DNA ilave edildi ve ayrıca DNA içermeyen sadece kompleksi içeren çözeltiler maddeler arasında etkileşimin tamamen sağlanabilmesi ve dengeye gelebilmesi amacıyla bir gece bekletildi. Takiben hem tek başına kompleks içeren çözeltilerin ve hem de DNA ilavesi ile oluşturulan çözeltilerde komplekslerin kendilerine has görünür bölge spektrumlarındaki kaymalar ve absorbanstaki değişimler kaydedilmiştir.

K1 varlığında DNA'nın ilavesi ile gözlenen değişimler Şekil 48'de verilmiştir. Önce nihai konsantrasyonu yaklaşık $330 \mu\text{M}$ K1 olan potasyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) çözeltinin görünür bölge spektrumu alındı ve daha sonra nihai konsantrasyonu $1.2 \mu\text{M}$ DNA olan çözeltinin aynı bölgedeki spektrumu ile karşılaştırıldı. DNA ilavesi ile komplekse ait 302 nm 'deki sinyalin dalga boyunda oldukça küçük ve 1 nm 'lik maviye kayma gözlenirken yine DNA ilavesi ile kompleksin bu dalga boyundaki absorbanstada yaklaşık 0.098 absorban birimi kadar bir azalma gözlenmiştir.



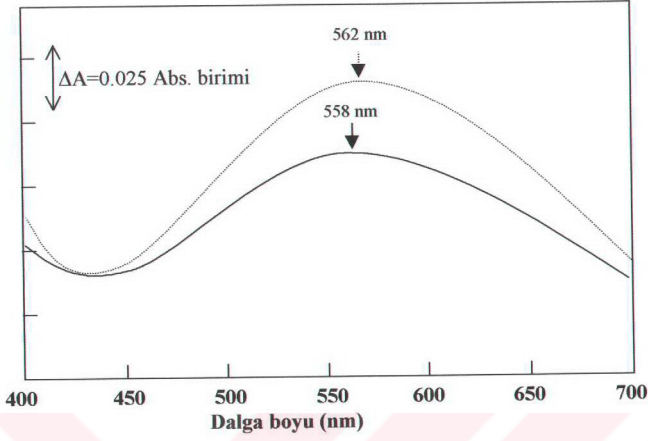
Şekil 48. $330 \mu\text{M}$ K1 kompleksinin $1.2 \mu\text{M}$ DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ndaki etkileşimi. Kesik çizgi (---) kompleks tek başına ve düz çizgi (—) DNA ilavesi ile elde edilen spektrumları temsil etmektedir

K2 varlığında DNA'nın ilavesi ile gözlenen değişimler Şekil 49'da verilmiştir. Önce nihai konsantrasyonu yaklaşık $22.5 \mu\text{M}$ K1 olan potasyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) çözeltinin görünür bölge spektrumu alındı ve daha sonra nihai konsantrasyonu $1.2 \mu\text{M}$ DNA olan çözeltinin aynı bölgedeki spektrumu ile karşılaştırıldı. DNA ilavesi ile komplekse ait 292 nm 'deki sinyalin dalga boyunda herhangi bir kayma gözlenmezken kompleksin bu dalga boyundaki absorbsansında yaklaşık 0.097 absorbsans birimi kadar bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 49. $22.5 \mu\text{M}$ K2 kompleksinin $1.2 \mu\text{M}$ DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ndaki etkileşimi. Kesik çizgi (---) kompleks tek başına ve düz çizgi (—) DNA ilavesi ile elde edilen spektrumları temsil etmektedir

K3 varlığında DNA'nın ilavesi ile gözlenen değişimler Şekil 50'de verilmiştir. Önce nihai konsantrasyonu yaklaşık $225 \mu\text{M}$ K1 olan potasyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) çözeltinin görünür bölge spektrumu alındı ve daha sonra nihai konsantrasyonu $7.6 \mu\text{M}$ DNA olan çözeltinin aynı bölgedeki spektrumu ile karşılaştırıldı. DNA ilavesi ile komplekse ait 562 nm 'deki sinyalin dalga boyunda 4 nm 'lik maviye kayma gözlenirken kompleksin bu dalga boyundaki absorbsansında yaklaşık 0.027 absorbsans birimi kadar bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 50. 225 μ M K3 kompleksinin 7.6 μ M DNA ile 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ndaki etkileşimi. Kesik çizgi (---) kompleks tek başına ve düz çizgi (—) DNA ilavesi ile elde edilen spektrumları temsil etmektedir

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

1,10-Fenantrolin-bakır, 4,7-difenil-1,10-fenantrolin-kobalt(III) kompleksi ve EDTA-demir(II) kompleksleri gibi kimyasal nükleazlar özellikle DNA'nın konformasyonel değişkenliği hakkında oldukça faydalı bilgiler vermiştir (Sigman, Chen, 1990). Bu komplekslerden 1,10-fenantrolin-bakır gibi tetrahedral olanların küçük oluğa 4,7-difenil-1,10-fenantrolin-rutenyum(II) kompleksi gibi oktahedral olanların ise büyük oluğa bağlandığı bildirilmiştir (Barton 1986; Sigman 1986). İlk keşfedilen kimyasal nükleaz olan 1,10-fenantrolin-bakır kompleksi DNA'yı önemli bir kovalent olmayan ara ürün üzerinden parçalama yeteneğine sahiptir. Tetrahedral bakır kompleksinin DNA'nın küçük oluğuna bağlanıp hidrojen peroksit ile okside olarak bir bakır-okso türünü oluşturduğu ve bu türün de polinükleotit zincirdeki deoksiriboz birimlerinin oksidasyonundan doğrudan sorumlu olduğu önerilmiştir (Sigman 1986). Bu parçalanma işlemi deoksiriboz birimleri üzerinde gerçekleştiğinden 1,10-fenantrolin-bakır kompleksinin gerçekleştirdiği bu reaksiyon DNA'nın kesildiği bölgedeki nükleotit için spesifik değildir. Ancak kesilen parçacıklar incelendiğinde dizi-bağımlı bir reaktifliğin gözleendiği belirtilmiş olmasına rağmen bu kesme reaksiyonunda dizi özgünlüğünü sağlayan küçük oluğun yapısal özellikleri henüz aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmada yeni bir oksim ligandının üç farklı kompleksi; homodinükleer bakır (K1), heterodinükleer bakır-mangan (K2) ve homotrinükleer bakır (K3) komplekslerinin nükleolitik özellikleri nötral agaroz jel elektroforezi ve görünür bölge spektrofotometrisi yardımıyla araştırıldı. Çeşitli kontrollerle beraber kooksidan MMPP varlığında ve yokluğunda komplekslerin benzer davranışları gösterdiği açıktır. Her üç kompleksin de MMPP yokluğunda DNA üzerinde bir etki yapmadığı ve kompleks yokluğunda, ancak MMPP varlığında da bir nükleolitik aktivitenin söz konusu olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla kompleks ve MMPP varlığında gerçekleştirilen bütün deneylerde gözlenen aktivitenin komplekslerden kaynaklandığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Özellikle 0.1 μM 'dan daha düşük konsantrasyon değerlerinde K1 ve K2 süpersarmal DNA üzerinde kırıklar oluşturmakta ancak 0.1 μM ve daha yukarıdaki konsantrasyon değerlerinde ise oluşturulan kırık DNA formlarını karşılıklı olarak birbirine yakın bölgelerden keserek doğrusal formların oluşmasını sağladığı görülmüştür (Şekil 34 ve Şekil 35). K3 ise böyle bir nükleolitik aktiviteyi ancak 100 μM veya daha yukarıdaki konsantrasyonlarda

sağlayabilmiştir (Şekil 36). Bu veriler etkin konsantrasyonları dikkate alınarak K3'ün daha zayıf bir kimyasal nükleaz olabileceği sonucunu göstermektedir.

Konsantrasyon bağımlı K1, K2 ve K3'ün gösterdiği bu nükleolitik özellikler komplekslerin etkin konsantrasyonlarında ilk 5 dakikalık reaksiyon sürelerinde süpersarmal DNA formunun tamamen kırık formuna dönüşmesi ve ilerleyen reaksiyon sürelerinde bu form üzerinden doğrusal formun oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 38, Şekil 40, Şekil 41). Bu sonuç her üç kompleksin de benzer mekanizmalarla ve süpersarmal formun önce kırık forma ve takiben de doğrusal forma dönüştürüldüğünü göstermektedir.

Komplekslerin nükleolitik etkinliklerinin pH bağımlılıkları incelendiğinde yine K1 ve K2'nin oldukça benzer davranış gösterdikleri görülmüştür. pH 6.0-7.5 arasında bu iki kompleks durumunda süpersarmal formun yaklaşık %80'lik kısmı kırık form haline dönüşmüş ve bu pH aralığında bağıl miktarlar oldukça sabit kalmıştır (Şekil 43 ve Şekil 45). Ancak pH 8.0 ve daha yukarısında süpersarmal formun bağıl miktarında bir artış gözlenmesi K1 ve K2'nin bu nükleolitik etkinliklerinin azaldığı sonucunu ortaya koymaktadır. K3 yine K1 ve K2'den daha farklı bir pH bağımlı nükleolitik etkinlik göstermiştir. Çalışılan pH aralığında K3 süpersarmal DNA formunu tamamen diğer iki forma dönüştürmüş ve bu iki formun bağıl oranları pH ile değişim göstermiştir (Şekil 47). Özellikle pH 7.0-7.5 arasında doğrusal formun bağıl miktarındaki artma bu pH değerlerinde K3'ün kırık formları çift sarmalın birbirine yakın bölgelerinden daha etkin bir şekilde keserek doğrusal forma dönüştürdüğü sonucunu ortaya koymaktadır. Ayrıca pH 8.0 ve yukarısında K3 daha çok kırık DNA formunun baskın olduğu bir nükleolitik aktivite göstermiştir.

Nükleolitik aktiviteleri incelenen komplekslerin plazmid DNA üzerindeki bu etkinliklerinde DNA ile etkileşimleri spektroskopi ile de tespit edilmiştir. Bu komplekslerin görünür bölge spektrumlarındaki bazı sinyallerde DNA ilavesi ile kaymaların olması ve absorbanstaki değişimler kompleksler ile DNA arasında bir interkalasyon ihtimalinin zayıf olduğunu göstermektedir. Güçlü bir interkalasyonda komplekslerin spektrumlarında kırmızıya kaymanın gerçekleşmesi gerekirken böyle belirgin bir kayma gözlenmiştir. Dolayısıyla daha önceki çalışmalarda da (Sigman 1990, Barton 1986) bahsedildiği gibi bu türden tetrahedral ve oktahedral komplekslerin interkalasyondan ziyade DNA sarmalındaki küçük veya büyük oluklara bağlanarak bu nükleolitik aktiviteleri gerçekleştirdiği söylenebilir.

Sonuç olarak dinükleer kompleksler (K1 ve K2) oldukça benzer kimyasal yapıları da dikkate alınarak birbirine yakın ve muhtemelen benzer mekanizmalarla nükleolitik etkinlik gösterdikleri sonucunu ortaya koymaktadır.

Daha çok bir fizibilite niteliğinde olmasına rağmen elde edilen sonuçlar oksim esaslı DNA parçalayan moleküllerin ve antikanser maddelerin dizaynında yeni düşüncelerin ortaya çıkmasını sağlayacağı açıktır.



5. KAYNAKLAR

- Bailly, C., 2000, Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs, *Curr. Med. Chem.*, 7, 39-58.
- Barton, J. K., 1986, Metals and DNA: Molecular Left-Handed Complements, *Science*, 233, 727-733.
- Blackburn, G. M., Gait, M. J., 1990, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Chaires, J. B., Leng, F., Przewloka, T., Fokt, I., Ling, Y.-H., Perez-Soler, R., Priebe, W., 1997, Structure-Based Design of A New Bisintercalating Anthracycline Antibiotic, *J. Medic. Chem.*, 40, 261-266.
- Coll, M., Frederick, C. A., Wang, A., H.-J., Rich, A., 1987, A Bifurcated Hydrogen-Bonded Conformation in The d(A.T) Base Pairs of The DNA Dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and Its Complex with Distamycin, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 84, 8385-8389.
- Creighton, T. E., 1993, *Proteins*, W. H. Freeman and Co., New York, NY, USA.
- Goodisman, J., Kirk, C., Dabrowiak, J. C., 1997, Kinetic Analysis of Drug Cleavage of Closed-Circular DNA, *Biophys. Chem.*, 69, 249-268.
- Gravert, D. J., Griffin, J. H., 1993, Specific DNA Cleavage Mediated by [SalenMn(III)]⁺, *J. Org. Chem.*, 58, 820-822.
- Groves, J. T., Farrell, T. P., 1989, DNA Cleavage by a Metal Chelating Tricationic Porphyrin, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 4998-5000.
- Kaim, W., Schwederski, B., 1994, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Kane, S. A., Hecht, S. M., 1994, Polynucleotide Recognition and Degradation by Bleomycin, *Prog. Nuc. Ac. Res.*, 49, 313-352.
- Krug, T. R., 1994, Drug-DNA Interactions, *Curr. Op. Str. Biol.*, 4, 351-364.

- Lavery, R., Zakrzewska, K., Pullman, B., 1986, Binding of Non-Intercalating Antibiotics to B-DNA: a Theoretical Study Taking into Account Nucleic Acid Flexibility, *J. Biomol. Str. Dyn.*, 3, 1155-1170.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., 1993, Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, NY, USA.
- Leng, F., Piebe, W., Chaires, J. B., 1998, Ultratight DNA Binding of a New Bisintercalating Anthracycline Antibiotic, *Biochemistry*, 37, 1743-1753.
- Leupin, W., Chazin, W. J., Hyberts, S., Denny, W. A., Wuthrich, K., 1986, NMR Studies of the Complex Between the Decadeoxynucleotide d(GCATTAATGC) and A Minor-Groove-Binding Drug, *Biochemistry*, 25, 5902-5910.
- Lippard, S. J., Berg, J. M., 1994, Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, CA, USA.
- Manning, G. S., 1978, The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to The Electrostatic Properties of Polynucleotides, *Q. Rev. Biophys.*, 11, 179-246.
- Marzilli, L. G., Banville, D. L., Zon, G., Wilson, W. D., 1986, Pronounced Proton and Phosphorus NMR Spectral Changes on Meso-Tetrakis(N-Methylpyridinium-4-yl) Porphyrin Binding to Poly[d(G.C)].Poly[d(G.C)] and to Three Tetradeca-Oligodeoxyribonucleotides: Evidence for Symmetric Selective Binding to 5'CG3' Sequences, *J. Amer. Chem. Soc.*, 108, 4188-4192.
- Papavassiliou, A. G., 1995, Chemical Nucleases as Probes for Studying DNA-Protein Interactions, *Biochem. J.*, 305, 345-357.
- Pindur, U., Haber, M., Sattler, K., 1993, Antitumor Active Drugs as Intercalators of Deoxyribonucleic Acid, *J. Chem. Edu.*, 70, 263-272.
- Pjura, P. E., Grzeskowiak, K., Dickerson, R. E., 1987, Binding of Hoechst 33258 to the Minor Groove of B-DNA, *J. Mol. Biol.*, 197, 257-271.
- Ptashne, M., 1987, A Genetic Switch, Cell Pres & Blackwell Sci. Publ., USA.
- Record, M. T., Lohman, T. M., deHaseth, P., 1976, Ion Effects on Ligand-Nucleic Acid Interactions, *J. Mol. Biol.*, 107, 145-158.
- Rosenberg, B., van Camp, L., Trosko, J. E., Mansour, V. H., 1969, Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumor Agents, *Nature (London)*, 222, 382.

- Sakai, Y., Bando, Y., Shishido, K., Shibuya, M., 1992, Cycloaromatization of A 10-Membered Ene-diyne Derivative Via An Allenic Sulfone Intermediate and Its DNA Cleaving Activity, *Tetrahedron Lett.*, 33, 957-960.
- Sigman, D. S., 1986, Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Copper Ion, *Acc. Chem. Res.*, 19, 180-186.
- Sigman, D. S., Chen, S.-h. B., 1990, Chemical Nucleases: New Reagents in Molecular Biology, *Ann. Rev. Biochem.*, 59, 207-236.
- Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V., Stern, A. M., 1979, Oxygen-Dependent Cleavage of DNA by The 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex, *J. Biol. Chem.*, 254, 12269-12272.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
- Spiro, T. G., 1980, *Metal Ions in Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Voet, D., Voet, J. G., 1990, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Watson, J. D., Crick, F. H. C., 1953, Molecular Structure of Nucleic Acids, *Nature*, 171, 737-738.
- Winnacker, E.-L., 1987, *From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology*, VCH Publishers, New York, NY, USA.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Trabzon'un Beşikdüzü ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Beşikdüzü Çeşmeönü Köyü İlkokulu'nda, orta öğrenimini Beşikdüzü Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 1993 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 1997 yılında bu bölümden Kimyager ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına girdi. Yabancı dili İngilizce olup halen KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.