

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(+)-DUOCARMYCIN ANTİBİYOTİĞİ ANALOGLARININ
SENTEZLENMESİ VE DNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bircan ÇEKEN TOPTANCI

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

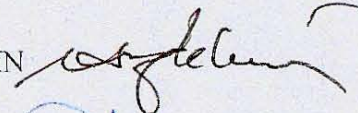
DIYARBAKIR


Eylül 2013

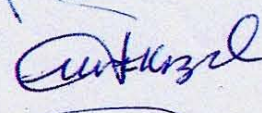
T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

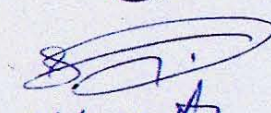
Bircan ÇEKEN TOPTANCI tarafından yapılan “(+)-Duocarmycin Antibiyotiği Analoglarının Sentezlenmesi ve DNA Üzerine Etkilerinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

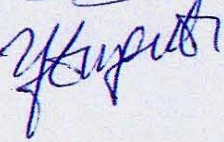
Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN 

Üye : Prof. Dr. İsmet YILMAZ 

Üye : Prof. Dr. Murat KIZIL (Danışman) 

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR 

Üye : Doç. Dr. Yılmaz TURGUT 

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/09/2013

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu güzel serüvene beni sürükleyen, çalışmalarımın her aşamasında destek, bilgi ve birikimlerini esirgmeden yardımcı olan ve yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesinde yer alan ve çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen, başım her sıkıştığında kendimi odasında bulduğum hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesinde yer alan ve tez savunma jürisinde bulunan hocam Prof. Dr. İsmet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez savunma jürisinde bulunan hocalarım Doç. Dr. Ebru İNCE'ye, Doç. Dr. Fikret UYAR'a ve Doç. Dr. Yılmaz TURGUT'a teşekkür ederim.

Başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI olmak üzere, Kimya Bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Biyooorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında beraber çalıştığım arkadaşlarım Sevil, Sevcan, Mihdiye, Hayrettin, Veysel, Süleyman ve Kimya Bölümündeki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yardımları için Doç. Dr. Mahmut TOĞRUL'a, Uzman Mehmet ÇOLAK'a ve Murat AZİZOĞLU'na teşekkür ederim.

Doktora bursu aldığım Tübitak Münir Birsnel Lisansüstü Bursları Vakfı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP-08-FF-69 nolu proje) ve TÜBİTAK (TBAG 109T788) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de beni koşulsuz destekleyen aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince, zaman zaman ihmal ettiğim eşim İsmet Rezani TOPTANCI'ya desteği, sabrı ve hoşgörüsü için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
RESİM LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
KISALTMA ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.1.2. Kullanılan Aletler	35
3. 2. Metot	35
3.2.1. Sentez Çalışmaları	35
3.2.1.1. 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1)	36
3.2.1.2. 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2)	37
3.2.1.3. 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1 <i>H</i> -indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3)	38
3.2.2. DNA Kesim Çalışmaları	38
3.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi	39
3.2.2.1.1. Agaroz Jellerde DNA'nın Hareket Hızını Etkileyen Etmenler	40
3.2.2.1.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	42
3.2.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Yapılışı	42
3.2.2.1.4. Plazmid Saflaştırma	43
3.2.3. Çözeltilerin Hazırlanması	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Ligantların sentez çalışmaları	45
4.1.1. 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1) Sentezi	45
4.1.2. 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2) Sentezi	49
4.1.3. 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1 <i>H</i> -indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) Sentezi	51
4.2. DNA Kesim Çalışmaları	55
4.2.1. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1 <i>H</i> -indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkileri	55
4.2.2. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1 <i>H</i> -indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4-	56

	il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının Cu ²⁺ varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkileri	
4.2.3.	Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2- karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]- 1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4- il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkilerine radikal söndürücülerin etkisi.	57
4.2.4.	Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2- karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]- 1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4- il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının Cu ²⁺ varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkilerine radikal söndürücülerin etkisi	58
4.2.5.	Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2- karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]- 1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4- il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının Calf Thymus DNA kesim etkileri	60
4.2.6.	Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2- karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]- 1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4- il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının Cu ²⁺ varlığında Calf Thymus DNA kesim etkileri	61
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	69
6.	KAYNAKLAR	77
7.	EKLER	83
	ÖZGEÇMİŞ	89

ÖZET

(+)-DUOCARMYCIN ANTİBİYOTİĞİ ANALOGLARININ SENTEZLENMESİ VE DNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Bircan ÇEKEN TOPTANCI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2013

Son zamanlarda, tanıma, bağlanma, modifiye etme, kesme ve çapraz bağlanma yoluyla DNA ile etkileşen küçük moleküllere ilgi artmış ve bu moleküller kimya, biyoloji ve tıp alanlarında ilgi çekici projelerin araştırma konusu olmuştur.

CC-1065 ve Duocarmycin gibi antitümör antibiyotiklerin DNA küçük oluşuna bağlandığı bilinmektedir. CC-1065 antibiyotığı bilinen en toksik antitümör antibiyotiktir. Bu antibiyotikle yapısal olarak çok benzeyen Duocarmycin gibi bazı antibiyotiklerin toksik etkisinin daha az olması bizi Duocarmycin analoglarını sentezlenmeye yöneltmiştir.

Bu çalışmada (+)-Duocarmycin A ve SA antibiyotiklerinin yapısında bulunan indol-2-karboksilik asit molekülünün, C-5 karbonunda tersiyer amino fonksiyonel gruba sahip suda çözünebilen üç farklı analogu sentezlendi. Sentezlenen ligandların DNA kesim etkileri bakır varlığında ve yokluğunda, Agaroz Jel Elektroforezi tekniği ile pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) ve Calf Thymus DNA (8-15 kb) kullanılarak belirlendi.

Ligantların (1-3) konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DNA kesimine sebep olduğu, bakır varlığında DNA kesiminin arttığı ve ligand 1'in kesim etkisinin diğer ligantlara oranla daha fazla olduğu tespit edildi. DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin etkisini araştırmak için reaksiyonlar histidin, tiyoüre, TEMPO ve DMSO varlığında tekrarlandı ve bu radikal söndürücülerin DNA kesimini inhibe ettiği gözlemlendi. Bu sonuç kesimde reaktif oksijen türlerinin etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA kesimi, Duocarmycin A ve SA, CC-1065, Antikanser.

ABSTRACT

THE SYNTHESIS OF (+)-DUOCARMYCIN ANTIBIOTIC ANALOGS AND THEIR EFFECTS ON DNA

Ph.D. THESIS

Bircan ÇEKEN TOPTANCI

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

2013

Binding studies of small molecules to DNA are very important in the development of DNA molecular probes and new therapeutic reagents. In recent years, small molecules that interact with DNA through recognition, binding, modifying, cleaving and crosslinking have attracted great interest and had been challenging project in the research fields of chemistry, biology, and medicine. Therefore, the design of small compounds able to bind and cleave DNA at physiological conditions is of great interest for the development of novel therapeutic agents.

CC-1065 and duocarmycin antitumor antibiotics are specifically bind to double strand DNA. Duocarmycin have similar structure to the CC-1065. However it is not very toxic.

In this study, three water-soluble DNA-binding subunits, indole-2-carboxylic acid hydrochlorides bearing a substituent with a tertiary amino functionality at C-5 were synthesised. DNA cleavage activity of this ligands were checked in the absence and presence of Cu (II) ions on pBluescript M13+ plasmid DNA (3.2 kb) and Calf Thymus DNA (8-15 kb).

The ligands (**1-3**) showed concentration and time dependent DNA cleavage activity. The DNA cleavage activity of **1** is significantly better than the ligands (**2, 3**). To verify if reactive oxygen species involved in the mechanism of DNA cleavage, the experiments were carried out in the presence of histidine, thiourea, TEMPO and DMSO. It has been found that DNA cleavage was inhibited in the presence of these radical scavengers. This finding indicated that ROS plays a key role in the DNA cleavage.

Keywords: DNA cleavage, Duocarmycin A ve SA, CC-1065, Anticancer.

RESİM LİSTESİ

<u>Resim No</u>		<u>Sayfa No</u>
Resim 4.1.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (10-200 μ M).	62
Resim 4.2.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (250-1000 μ M).	63
Resim 4.3.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (10-200 μ M).	64
Resim 4.4.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (250-1000 μ M).	65
Resim 4.5.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonuna bazı radikal söndürücülerin etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi	66
Resim 4.6.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonuna bazı radikal söndürücülerin etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi.	66
Resim 4.7.	Calf Thymus DNA'nın, (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.	67
Resim 4.8.	Calf Thymus DNA'nın, (1), (2) ve (3) ile bakır (II) klorür varlığında kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.	68

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1.	DNA bazlarının yapıları	3
Şekil 1.2.	A-T ve C-G arasındaki Watson-Crick Hidrojen Bağları	3
Şekil 1.3.	Pürin ve pirimidin hidrojen bağ çiftleri arasında oluşan büyük ve küçük oluklar ve şeker fosfat omurgası.	3
Şekil 1.4.	Bilinen bazı antikanser ilaçların yapısı	4
Şekil 1.5.a	Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.	6
Şekil 1.5.b	Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.	7
Şekil 1.5.c	Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.	7
Şekil 1.6.	Sperminenin 12 baz çiftli B-DNA ile elektrostatik etkileşimi	8
Şekil 1.7.	Düzlemsel bir molekülün DNA baz çiftlerine interkalasyonu.	9
Şekil 1.8.	Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu.	9
Şekil 1.9.	Netropsinin DNA oluşuna bağlanması.	10
Şekil 1.10.	Duocarmycin SA ile DNA alkilasyonu.	11
Şekil 1.11.	CC-1065, (+)-Duocarmycin A ve SA antibiyotiklerinin yapıları.	12
Şekil 1.12.	DNA'ya bağlanan indol-2-karboksilik asit hidroklorür analogları (1-3).	13
Şekil 2.1.	DNA küçük oluşuna bağlandığı bilinen distamycin A ve netropsin, interkalatör amsacrin ve tipik bir combilexinlere tipik bir örnek: NetAmsa.	15
Şekil 2.2.	Hotzel ve arkadaşları tarafından sentezlenen moleküller	16
Şekil 2.3.	Mangan (II) kompleksinin kristal yapısı	24
Şekil 2.4.	Çalışmada kullanılan indol türevleri.	25
Şekil 2.5.	1H-indol-2-karboksilik asidin Moleküler modelleme çalışmaları. a. moleküler arası İki hidrojen bağıyla bağlanan İlaç-ligand kompleksi (Hidrojen bağları kırmızı ile gösterilmiştir.) b. Aynı kompleksin van der Waal's yüzeyi	25
Şekil 2.6.	Komplekslerin yapıları.	29
Şekil 2.7.	Raman ve ark. tarafından sentezlenen moleküller ve CT-DNA etkileşim gösterimleri	29
Şekil 2.8.	Phterpy ligandı içeren kompleksler için olası kristal paketleme etkileşimleri	32
Şekil 3.1.	1 nolu ligandın sentez şeması	36
Şekil 3.2.	2 nolu ligandın sentez şeması	37
Şekil 3.3.	3 nolu ligandın sentez şeması	38
Şekil 3.4.	Agarozun molekül yapısı	39
Şekil 3.5.	Plazmid DNA	41

Şekil 5.1.	Moleküler oksijenin indirgenmesi.	72
Şekil 5.2.	Radikaller ile oluşan DNA modifikasyon şeması.	73
Şekil 5.3.	DNA şekerinden 4' pozisyonundan hidrojen atomu koparılması	74

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1.	Normal Bireyler ve Kanser Hastalarında Serum ve Doku Bakır Seviyeleri.	33
Tablo 3.1.	Değişik miktarlarda agaroz içeren jellerde ayırma aralıkları.	40
Tablo 3.2.	Sıklıkla kullanılan elektroforez tamponları	42

KISALTMALAR

A	Adenin
G	Guanin
S	Sitozin
T	Timin
DNA	Deoksiribonükleik asit
CT DNA	Calf Thymus DNA
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
EDC.HCl	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür
DMAP	4-Dimetilaminopiridin
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloksi
DMF	N,N-Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
RNA	Ribonükleik asit
MTT	Mikrokültür tetrazolium testi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
UV-visible	Ultraviyole-görünür spektrofotometre

1. GİRİŞ

Kanser; kontrolsüz bölünen ve diğer dokulara yayılabilme özelliği olan anormal hücrelerin oluşturduğu hastalıklar için kullanılan bir terimdir. Vücudun hemen hemen her bölümünü etkileyebilir. Belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ya da zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresele seviyedeki genetik bir bozukluktur.

Dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri kanser olup ülkemizde de çok sıklıkla görülmektedir. 2002 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün verdiği rakamlara göre tüm dünyada 11 milyon insana farklı türde kanser teşhisi konulmuş, bunların 7.1 milyonu yaşamını yitirmiştir. 2020 yılında 16 milyon insana çeşitli tipte kanser teşhisi konulacağı öngörülmektedir. Bu rakamlar dünyada kanser teşhisi ve tedavisinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler sırasında dördüncü sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Erken tanı konulduğu takdirde önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olan kanserin bu denli hızlı artış göstermesi ülkemizde kanserin teşhisi ve tedavisi ile etkin mücadele edilmesini gerekli kılmaktadır. Kanser çalışmaları oldukça büyük önem kazanmış olup, kanser teşhisi ve tedavisinde kullanılacak moleküllerin sentezi ve uygulamaları güncel araştırma konularının içinde olmuştur. Günümüzde, kanserin tedavisinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan moleküllerin önemli bir dezavantajı seçici olmamalarıdır. Bunlar, tümör hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelerinde DNA yapısını bozar ve bazen sağlam hücrelerde tamiri mümkün olmayan yan etkilere sebep olurlar.

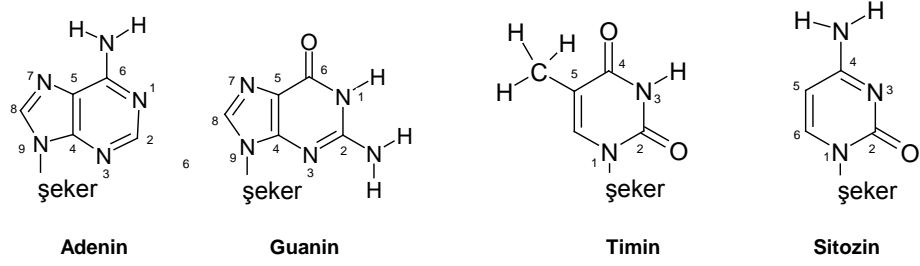
Yeni sentezleri yapılan moleküllerde temel hedef; sadece tümör hücrelerine karşı seçicilik sonucu düşük zehir etkisidir. Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte tümör hücrelerine karşı yüksek seçicilik gösteren bileşikler sentezlenmiştir. Bu moleküllerin büyük bir kısmının hücre içinde ve dışında tümör hücrelerine karşı aktif olduğu belirlenmiş olup farklı tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadırlar. Farklı yöntemlerin ve moleküllerin kullanımı, kanserin türüne ve oluşum evresine bağlıdır.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla ve bu hücrelerin başka bir bölgeye göç etme yetenekleriyle bu bölgelerde ikincil tümörlerin meydana gelmesiyle

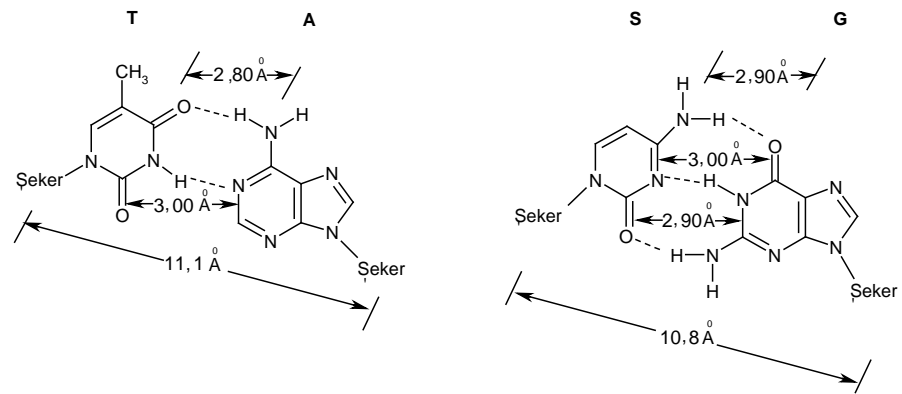
1. GİRİŞ

sonuçlanır. Gelişmiş ülkelerde ölümün ikinci ana sebebi olmakla beraber gelişmekte olan ülkelerde de yetişkin ölümlerinin üç ana sebeplerinden biridir. DNA'yı hedef alan antikanser ajanlar klinik kullanım için en etkili ilaçlardır ve kanser hastalarının hayatta kalma sürelerini anlamlı olarak artırırlar. Klinik olarak kullanılan çok sayıda antikanser ilaç, antitümör etkilerini DNA'da kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yolu ile hasar oluşturarak meydana getirir.

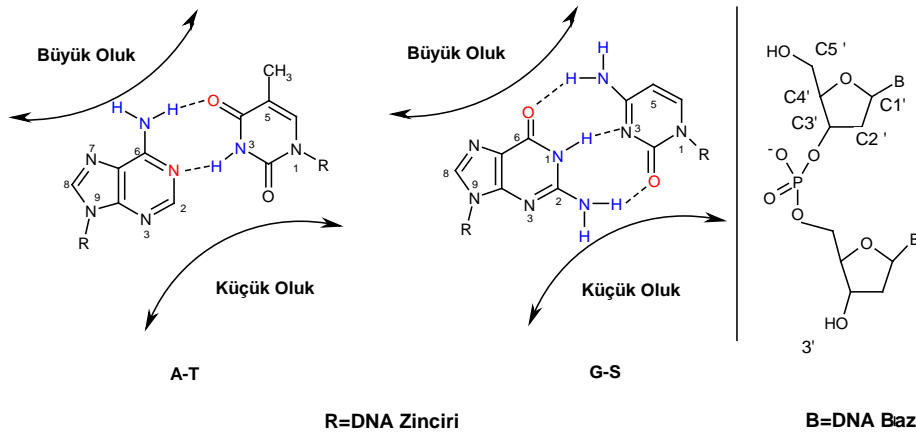
Yaşamın kodu olan Deoksiribonükleik asit (DNA), anne ve babadan evlatlarına aktarılan genetik bilgilerin saklanmasına uygun olması için, birbirini tamamlayan anti paralel iki sarmal zincirden oluşmuştur (Watson 1953; Weiling 1991; Watson 1993). DNA, her nükleotitinde 2-Deoksiriboz şekeri, bir fosfat grubu ve bir azotlu baz bulunan, polinükleotid zincirlere sahiptir. Azotlu bazlar pürinlerden (adenin "A" ve guanin "G") ve pirimidinlerden (timin "T" ve sitozin "S") oluşmaktadır (Şekil 1.1.). Deoksiriboz şekeri ve fosfat grubu azotlu bazlara bir iskelet oluşturur, böylece deoksiriboz birimine direkt olarak bağlanmasını sağlar (Watson 1953; Watson 1993; Alberts 2002). Her azotlu baz farklı bir yapıya ve yapılarındaki elektron alan veya veren gruplardan dolayı spesifik hidrojen bağı oluşturma kapasitesine sahiptir. A ile T ve G ile S bağlanır (Şekil 1.2.), bundan dolayı spesifik DNA örneklerinde her zaman A miktarı T ve G miktarı da S miktarına eşittir (Chargaff 1949). Baz çiftlerinin uzayda düzeni büyük ve küçük olukların oluşmasını (Şekil 1.3.) sağlar (Wing 1980; Kielkopf 1998; Fonseca 1999). Moleküler seviyede her oluğun çevresi farklılık gösterir (Lown 1994). Büyük oluk birden fazla etkileşim alanı gösterir, buda ilaçlarla/ligandlarla nispeten daha fazla kuvvetli bağ oluşturmalarını sağlamaktadır (Pabo 1984; Kielkopf 1998). 11,6 Å genişliğe ve 8,5 Å derinliğe sahiptir (Neidle 2001). Büyük oluk hacimli moleküllerin kolayca bağlanmasına izin vermektedir (Takeda 1983). Diğer taraftan küçük oluklar daha az bağlantı alanı sağlarlar ve daha küçük boyuttadırlar, derinlikleri 8,2 Å kadardır. Bununla beraber küçük olukların en yararlı özellikleri, genellikle korumasız olduklarından dolayı, küçük ilaç moleküllerinin saldırılarına açık olmalarıdır. Birçok antibiyotik ve antikanser ilaçlar da küçük moleküller olduğundan küçük oluklar bunların ana bağlanma kısımlarıdır (Gao 1992; Neidle 2001).



Şekil 1.1. DNA bazlarının yapıları.



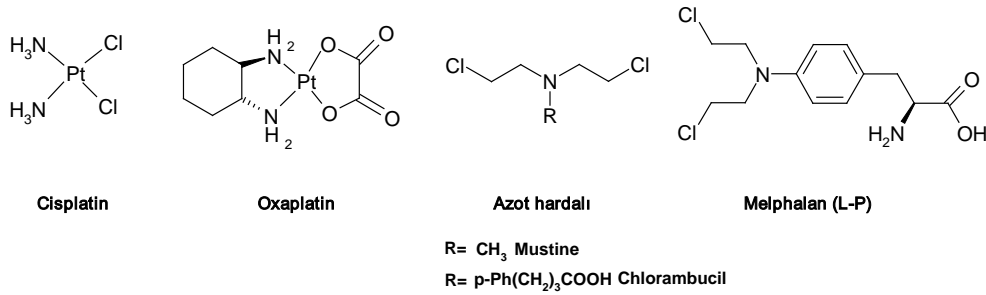
Şekil 1.2. A-T ve S-G arasındaki Watson-Crick Hidrojen Bağları.



Şekil 1.3. Pürin ve pirimidin hidrojen bağ çiftleri arasında oluşan büyük ve küçük oluklar ve şeker fosfat omurgası. (Hidrojen bağı donörleri mavi, hidrojen bağı akseptörleri ise kırmızı ile işaretlenmiştir.)

1. GİRİŞ

Normal hücrelerin tümör hücresine dönüşmesinde mekanizmayı anlamaya odaklanmış araştırmalar, farklı tip mutasyonların (Gnarra 1994; Harman 1962) ve DNA'nın hücre çekirdeği içerisinde yeniden düzenlenmesinin, gen ekspresyonunu ve diğer biyokimyasal süreci etkileyebileceğini göstermiştir. Belirgin olarak onkogenез ile sağlıklı hücre kanser hücresine dönüşmektedir (Bignell 2007). Kanser in şartları ve evresine bağlı olarak farklı tip tedaviler kullanılmaktadır. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi bunlardan bazılarıdır. Kemoterapinin amacı kimyasalları kullanarak hücrelerin, hücre büyümesi ve hücre bölünmesi gibi bazı fonksiyonlarını durdurarak tümör hücresini öldürmeyi amaçlamaktadır (Nelson 2007). Cisplatin, oxaliplatin gibi platinyum kompleksleri, mustine, klorambusil ve melphalan (L-PAM) gibi bazı azot hardalları (Şekil 1.4.), iyi bilinen geleneksel anti-kanser ilaçlarından bazılarıdır (Denny 1998; Denny 2000).



Şekil 1.4. Bilinen bazı antikanser ilaçların yapısı.

Bu ilaçların en büyük hedefleri DNA'dır. Azot hardallarının sitotoksik etkileri zincir içi veya zincirler arası çapraz bağlanarak DNA alkilasyonunu başlatıp, DNA'nın çift sarmal yapısının bütünlüğünü bozarak gösterir. Bu alkilatörlerden bazıları normal DNA'nın replikasyon mekanizmasının fonksiyonunu çok kısa sürede bozarken, diğerleri için saatler ve günler gerekmektedir (Ozawa 1988; Beria 2004).

Günümüzde klinik olarak kullanılan anti-kanser ilaçlarda seçici olmama, metastaz veya ikincil gelişmeleri kontrol yeteneğinin olmaması gibi problemler bulunmaktadır (Chambers 2002). Bunlara ek olarak, kanser doğasının heterojenik olmasının nedeni 100'den fazla kanser çeşidi olmasıdır (Tu 2010). Kanser in doğasına, yerine ve seviyesine bağlı olarak her problem için spesifik ilaçlara ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca kanserli hücrelerde birden fazla ilaca karşı direnç oluşması, yani başlangıçta bir spesifik ilaç ile baskılanırken bu ilaca karşı direnç gelişmesi fazlaca

görülen bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Gottesman 2002; Yap 2010). Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için daha etkili ve seçici ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kanseri ve kemoterapiyi anlamada ileriye gidilmesi, (Urruticoechea 2001) tümör hücrelerinin gelişimini kontrol altına alma potansiyelleri olan DNA dizisini spesifik, yeni ajanların bulunması ile sonuçlanmıştır (Caponigro 2010).

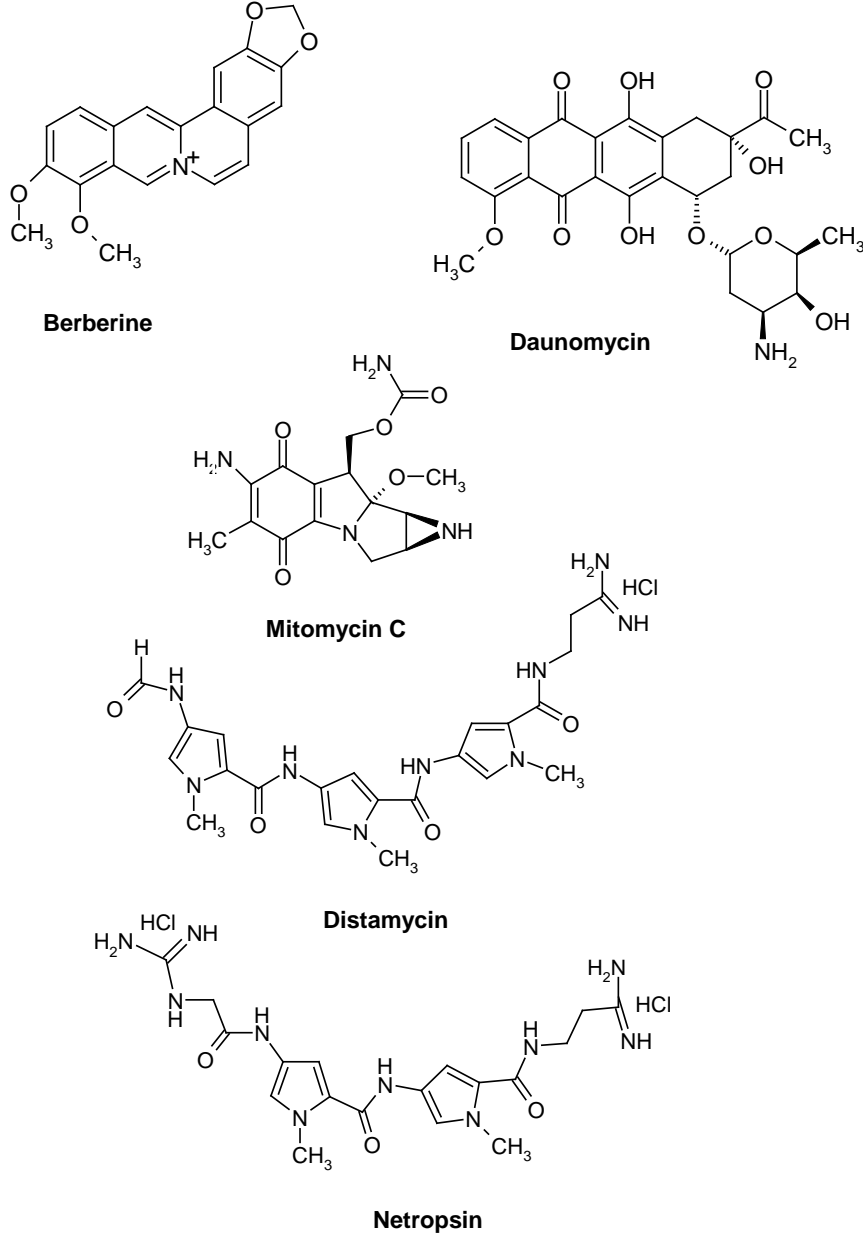
Bu anti-kanser ilaçların DNA ve DNA'ya bağlı proteinler üzerinde bazı seçici bölgeler ile kuvvetli etkileşimleri vardır (Neidle 2001). Bir anti-kanser ligand DNA'yı hedef aldığı zaman sitotoksik etkisinin bir sonucu olarak DNA'nın normal aktivitesini değiştirerek hücre ölümüne neden olur (Beria 2004). Anti-kanser ilaçlarının kendi etkilerini gösterdiği bağlanma mekanizması (Bailly 1998) interkalasyon (berberine ve daunomycine (Ridge 1994)), alkilasyon (mustine (Denny 1998; Hubbard 2007) ve mitomycin C (Tomasz 1995)) büyük (Hamilton 2012) ve küçük oluk bağlayıcıları (distamycin (Pugliese 1978)) ve netropsin (Kopka 1985)) gibi çeşitlilik göstermektedir (Şekil 1.5a.).

DNA'ya bağlanma moduna bağlı olarak anti-kanser ilaçlar iki ana katagoriye ayrılırlar (Baraldi 2004): mitomycin C (Tomasz 1995), anthramycin, ecteinascidin türevleri (ET-743) ve bleomycin A2 (Baraldi 2004) gibi DNA'da ve fonksiyonlarında kalıcı hasara neden olan kovalent bağlananlar (Beria 2004), ve fiziksel olarak DNA ile etkileşen ve etkilerini geçici olarak DNA fonksiyonlarını değiştirerek gösteren (Lown 1994; Baraldi 2004) (distamycin ve netropsin gibi) kovalent olmayan şekilde bağlananlar (1.5b.-1.5c.). Kovalent olmayan etkileşimler kendi aralarında üç büyük sınıfa da ayrılabilirler (Lown 1994), bunlar elektrostatik etkileşimler, interkalasyon ve oluklara bağlanmadır. Lexitropsinler ve bunların bileşikleri DNA'ya elektrostatik etkileşim ile bağlanırlar. Etidyum bromür ve adriamycine interkalasyon yolu ile bağlandığı iyi bilinen bileşiklerdir (Baguley 1978). Distamycin ve netropsin kanser araştırmalarında kullanılmış olan öncü bileşiklerdir ve bunların DNA'ya bağlanma yetenekleri DNA'nın çift sarmalında küçük oluklardaki spesifik dizilere bağlanmalarından gelmektedir (Arcamone 1964; Baraldi 2007).

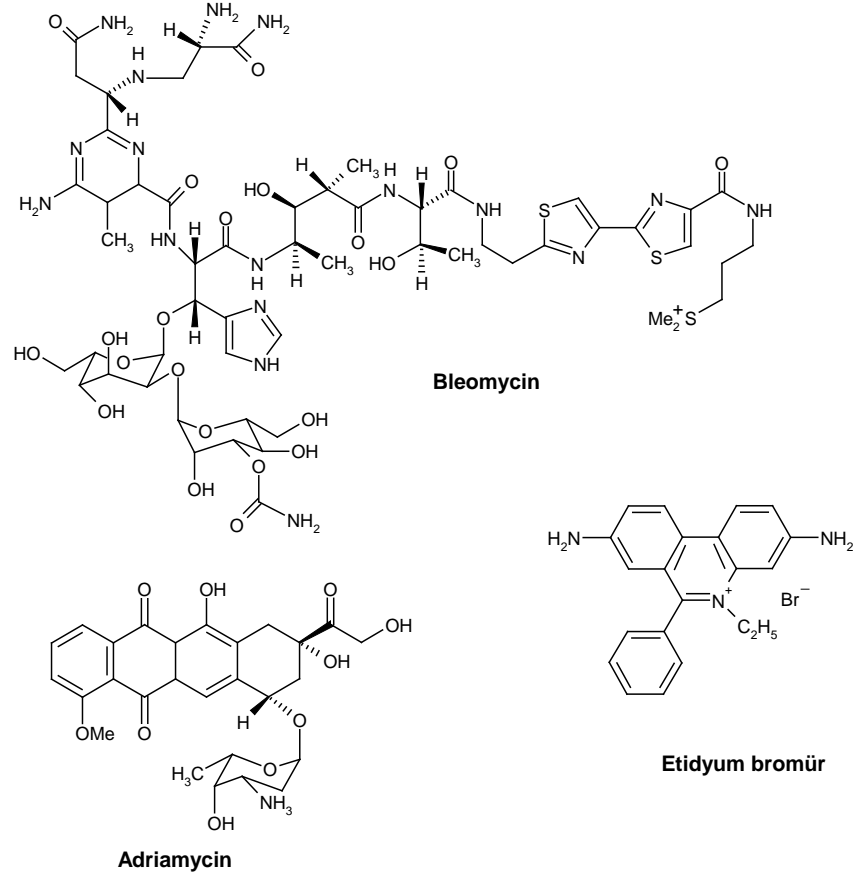
Küçük organik moleküller ve iyonlar; DNA ile elektrostatik etkileşim, DNA ile interkalasyon ve DNA oluklarına bağlanma olmak üzere üç temel mod üzerinde

1. GİRİŞ

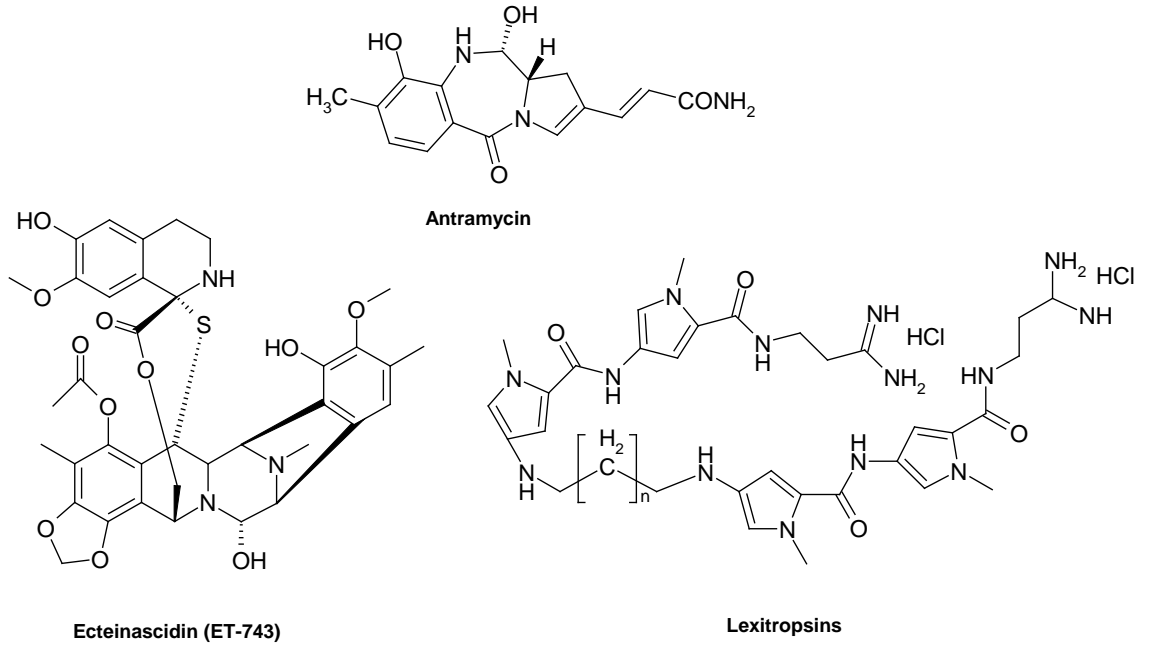
etkileşir. Bu nedenle, DNA'yı hedef alan ilaçların keşfi, kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesinde temel yaklaşımdır.



Şekil 1.5a. Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.



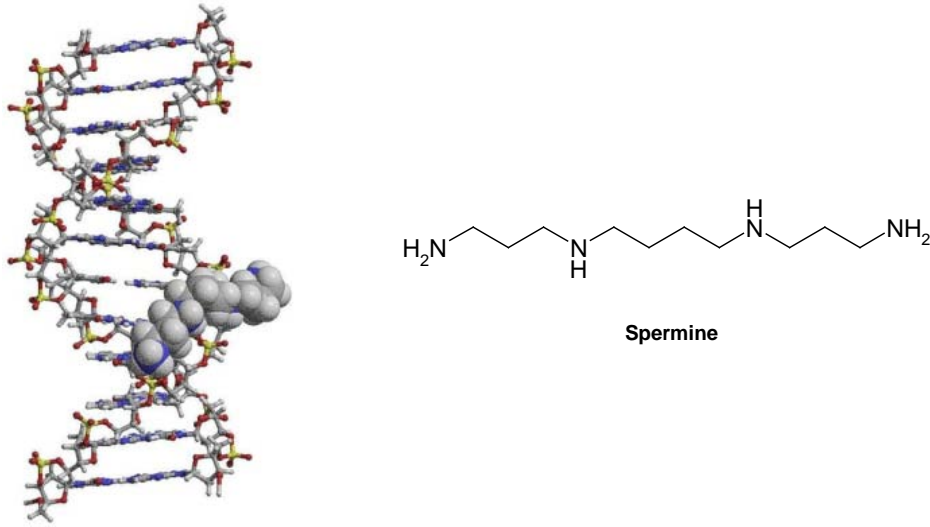
Şekil 1.5b. Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.



Şekil 1.5c. Farklı etkileşim türleriyle DNA'ya bağlanan ligandlar.

DNA ile Elektrostatik Etkileşim

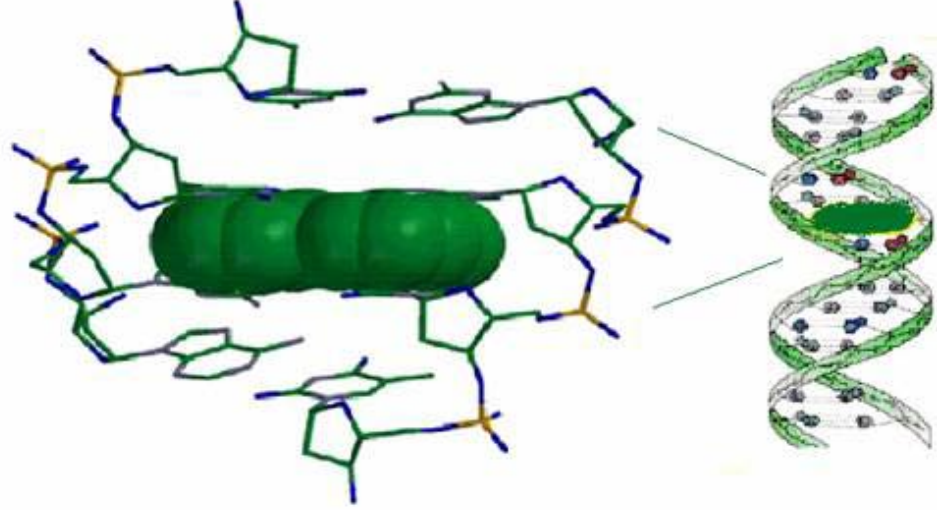
Bu bağlanma modu, elektrolitlerin ve suyun nükleik asitlerin çevresindeki davranışlarını kontrol eder ve organik ligantlara etkisi çok azdır. Negatif yüklü şeker fosfat omurgası ile çevresinde kümelenen pozitif yüklü iyonlar (Na^+ , K^+ veya Mg^{2+}) yada poliaminlerin (spermine ve spermidin gibi, Şekil 1.6.) gelişigüzel bağlanmaları, karakteristik spesifik olmayan elektrostatik bağlanmalardır (Tam 2007).



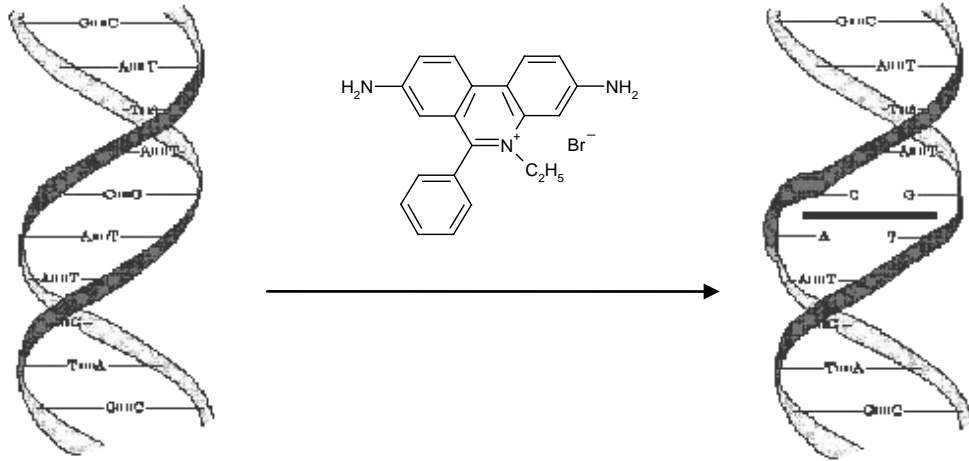
Şekil 1.6. Sperminin 12 baz çiftli B-DNA ile elektrostatik etkileşimi.

İnterkalasyon

1961 yılında Lerman, poliaromatik ve düzlemsel moleküllerin DNA heliks yapısındaki komşu baz çiftleri arasına girmesini interkalasyon olarak adlandırmıştır (Şekil 1.7.). İnterkalasyon kompleksinin kararlılığı, düzlemsel aromatik sistem ile Watson-Crick baz çiftlerinin üst üste çakışması ile van der Waals etkileşimini artmasının sonucudur. Etidyum bromür ve proflavin bilinen ilk interkatörlerdir (Şekil 1.8.).



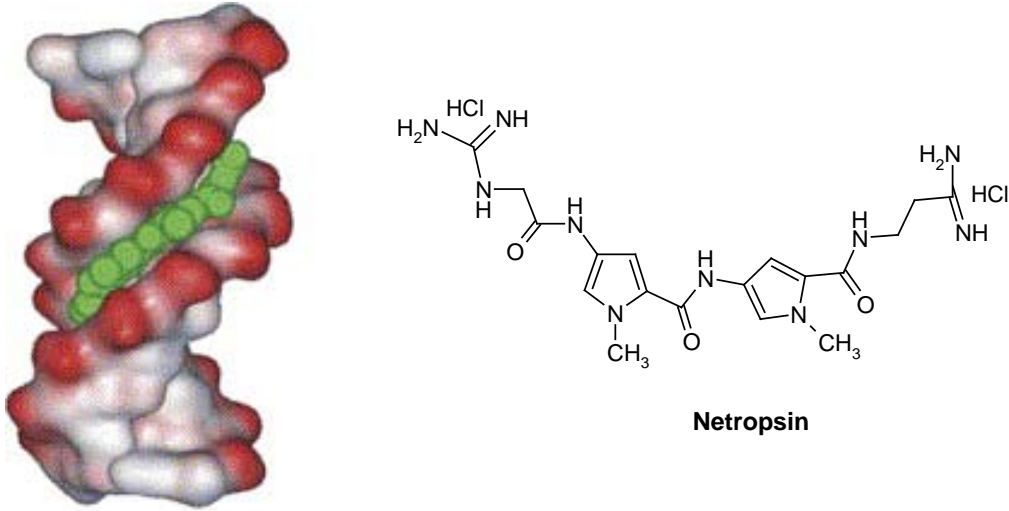
Şekil 1.7. Düzlemsel bir molekülün DNA baz çiftlerine interkalasyonu.



Şekil 1.8. Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu.

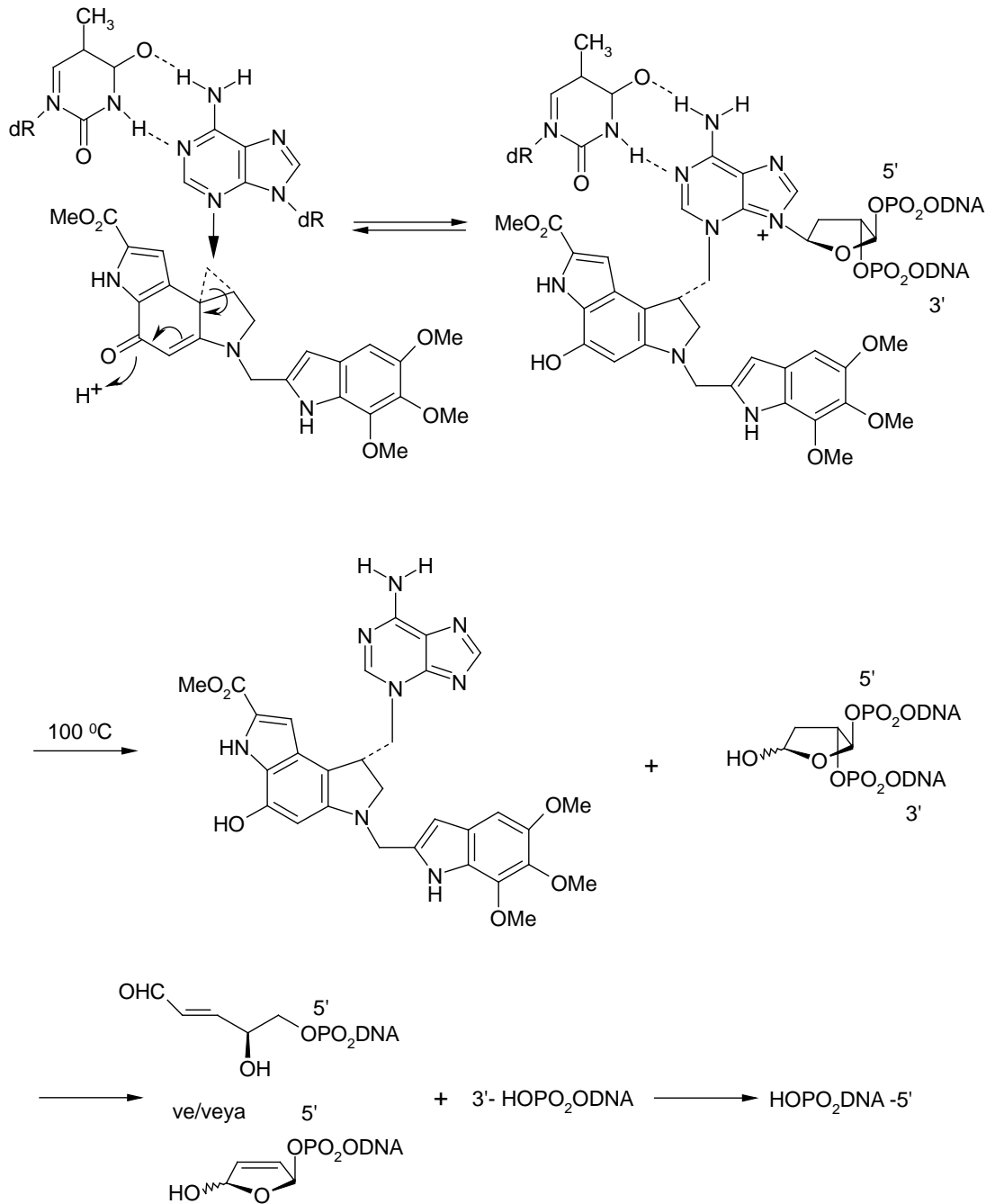
Oluklara bağlanma

Büyük ve küçük oluğa bağlanan ligandlar, baz çiftlerinde bulunan fonksiyonel gruplar ile doğrudan hidrojen bağı yaparlar. Genellikle küçük moleküller DNA küçük oluğuna bağlanırlar. Duocarmycin, Netropsin ve Distamycin (Şekil 1.9.). DNA oluğuna bağlanan antikanser antibiyotiklerdir (Chaires 2006).

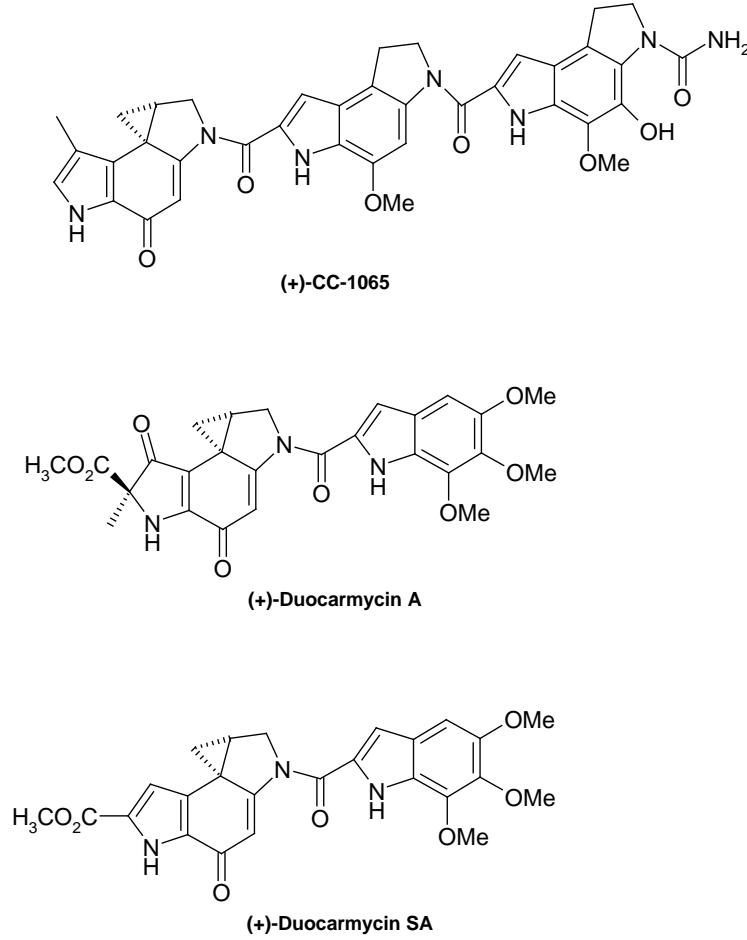


Şekil 1.9. Netropsinin DNA oluğuna bağlanması.

CC-1065, (+)-Duocarmycin A ve SA'nın, DNA küçük oluğuna bağlanıp DNA'da selektif alkilasyon yaparak (Şekil 1.10.) biyolojik etki gösteren son derece etkili antitümör antibiyotiklerin bir sınıfını temsil ettiği bilinmektedir. CC-1065 antibiyotiği bilinen en toksik antitümör antibiyotiktir (Martin 1981; Ichimura 1990).



Şekil 1.10. Duocarmycin SA ile DNA alkilasyonu.



Şekil 1.11. CC-1065, (+)-Duocarmycin A ve SA antibiyotiklerinin yapıları.

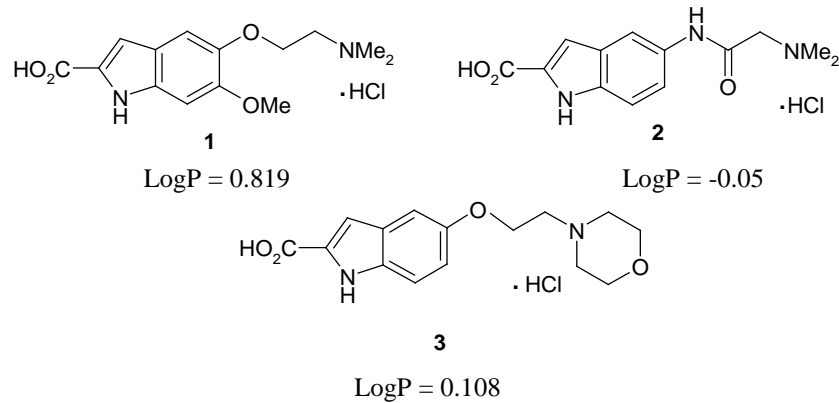
CC-1065 antibiyotiğine yapısal olarak çok benzeyen (+)-Duocarmycin A ve SA (Şekil 1.11.) gibi bazı antibiyotiklerin toksik etkisinin daha az olması bizi farklı süstitüe (+)-Duocarmycin antibiyotiği analogları sentezlemeye yöneltmiştir.

İlaçların biyoyararlanımı, ilacın klinik uygulamalar için, geliştirilip geliştirilemeyeceği bakımından önemli bir faktördür. Bununla beraber fizikokimyasal özellikler, çözünürlük, geçirgenlik, pKa değeri ve lipofilik/hidrofilik denge biyoyararlanımı etkileyen önemli faktörlerdir. Çözünürlüğü zayıf olan bileşikler genellikle yeni bir ilaç keşfetme veya geliştirme sürecinde yetersiz kalabilir, çünkü bu özellikler bileşiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin yanında, hayvan modelinde antitümör aktiviteyi de etkileyebilir (Kapuriya 2011). Bu sebeple sentezlenen analogların suda çözünür olması çok önemlidir.

Bu tez kapsamında; (+)-Duocarmycin A ve SA antibiyotiklerinin yapısında bulunan C-5 karbonunda tersiyer amino fonksiyonel gruba sahip üç tane (**1-3**) suda çözünen indol-2-karboksilik asit hidroklorür analogu sentezlendi (Şekil 1.12). Sentezlenen indol-2-karboksilik asit hidroklorür analoglarının DNA kesim etkileri Agaroz Jel Elektroforezi tekniği ile Cu^{2+} varlığında ve yokluğunda, pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) ve Calf Thymus DNA (8-15 kb) kullanılarak belirlendi. Sentezlenen ligandların LogP değerleri ALOGPS 2.1 programı ile hesaplandı (Tetko 2004).

Ligandların LogP değerleri ALOGPS 2.1 programı ile hesaplanmış (Tetko 2004); **1**, **2** ve **3** nolu ligandlar için sırasıyla 0.819, -0.005 ve 0.108 olarak bulunmuştur. Lipinski (1997) tarafından önerilen kurala göre bir ilacın logP değerinin -0.4 ile +5.6 arasında olması gerekmektedir. Ayrıca ligandların molekül ağırlıkları da Lipinski kuralı ile uyum içerisindedir.

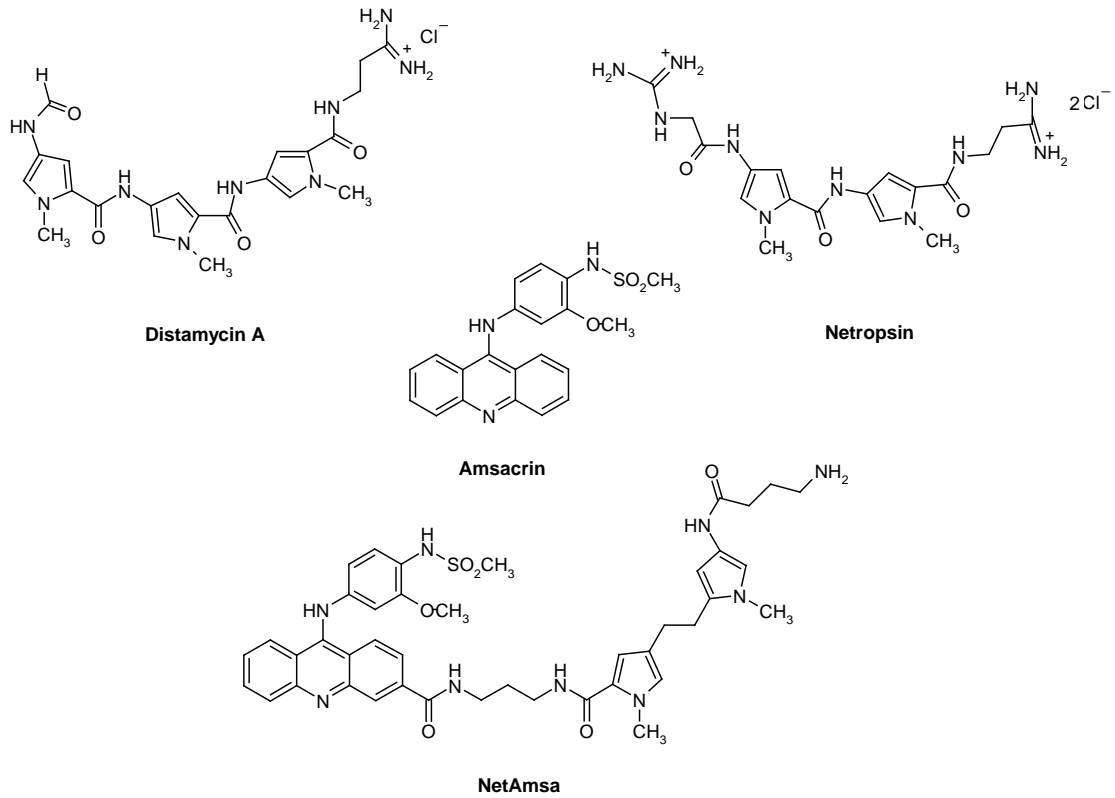
Pfizer kuralları olarak da bilinen Lipinski kuralları, bir kimyasal bileşiğin farmakolojik veya biyolojik aktivitesine bağlı olarak, o kimyasal bileşiğin insanlarda oral aktif ilaç olabilirliğini açıklayan pratik bir kuraldır. 1997 yılında Christopher A. Lipinski tarafından formüle edilen bu kural, birçok tedavi edici ilacın genellikle küçük ve lipofilik olmasının gözlenmesi temeline dayanır. Bu kural insan vücudunda ilaç farmakokinetiği için, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltımı da içine alan (ADME) moleküler özelliğin önemini açıklar. Bununla birlikte, bu kural bileşiğin farmakolojik olarak aktif olup olmadığını öngöremez.



Şekil 1.12. DNA'ya bağlanan indol-2-karboksilik asit hidroklorür analogları (**1-3**).

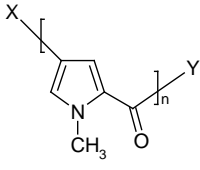
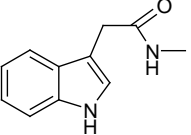
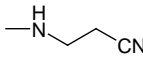
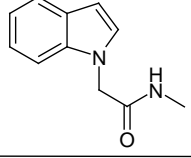
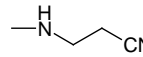
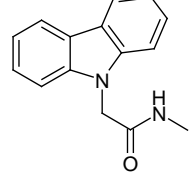
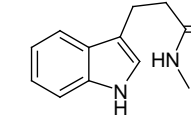
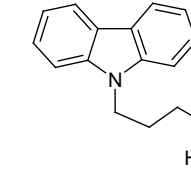
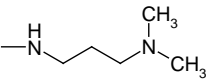
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hotzel ve arkadaşları tarafından, distamycin A-netropsin iskeletine interkalatör olan amsacrin eklenerek sentezlenen ve combilexine olarak adlandırılan antitümör ilaçları (Şekil 2.2.) örnek alınarak, ana iskeletinde indol, karbazol veya nitro grubu içeren farklı moleküller sentezlenip, bu moleküller amid grubu ile farklı polar yada lipofilik fonksiyonları olan, pirol veya oligopirollerle bağlanmıştır (Şekil 2.1.). Daha sonra bu moleküllerin (**4a-o**) termal denatürasyon ve etidyum bromür ile yerdeğiştirme (floresans titrasyon tekniği) ile DNA bağlanma ilgilerini araştırılmış ve Topoizomerez I inhibisyonu da belirlenmiştir. Moleküllerin DNA bağlanma ilgilerinin ve topoizomerez inhibisyonunun zayıf olduğu sonucuna varılmıştır (Hotzel 2002).



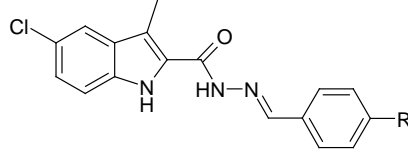
Şekil 2. 1. DNA küçük oluşuna bağlandığı bilinen distamycin A ve netropsin, interkalatör amsacrin ve tipik bir combilexinelere tipik bir örnek: NetAmsa.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

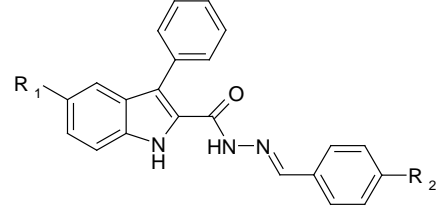
X	4	Y	n	
				
		-OCH ₃	1	a
		-OCH ₃	2	b
			1	c
		-OCH ₃	1	d
		-OCH ₃	2	e
			1	f
		-OCH ₃	1	g
		-OCH ₃	1	h
		-OCH ₃	2	i
		-OCH ₃	1	j
		-OCH ₃	2	k
			1	l
		-OCH ₃	2	m
O ₂ N-		-OCH ₃	3	n
		OH	2	o

Şekil 2. 2. Hotzel ve arkadaşları tarafından sentezlenen moleküller.

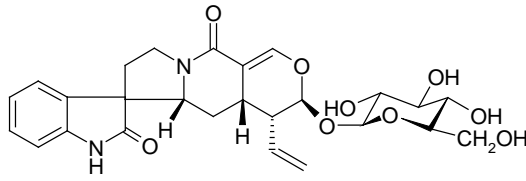
Zhang ve arkadaşları tarafından, bir seri indol-2-karboksilik asit benzilidin-hidrazidleri apoptozu indükleyici etkili yeni bir sınıf olarak rapor edilmiştir. Hem **5** hem de **6** molekülünün kanser hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiş (**5**) nolu bileşiğin tübülün polimerizasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Zhang 2004).

5a. R=NO₂

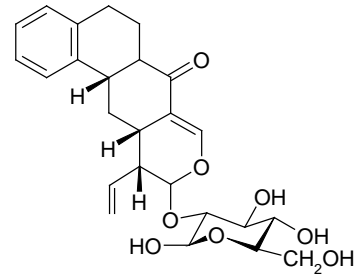
b. R=H

6a. R₁=R₂=pMeb. R₁=Cl, R₂=pNO₂c. R₁=Cl, R₂=pOMe

Pham ve arkadaşları tarafından, *Alangium javanicum* ve *Alangium grisolleoides* bitkilerinden diklorometan-metanol ekstratı hazırlanmış ve bu ekstraktın Cu²⁺ varlığında DNA kesimine sebep olduğu tespit edilmiştir. Ekstrakt fraksiyonlandırılarak DNA kesimine sebep olan aktif bileşik bulunmaya çalışılmıştır. *A. javanicum*'dan Javaniside (**7**) ve *A. grisolleoides* Alangiside (**8**) maddelerinin Cu²⁺ varlığında DNA kesiminde etkili olduğu belirlenmiştir (Pham 2005).



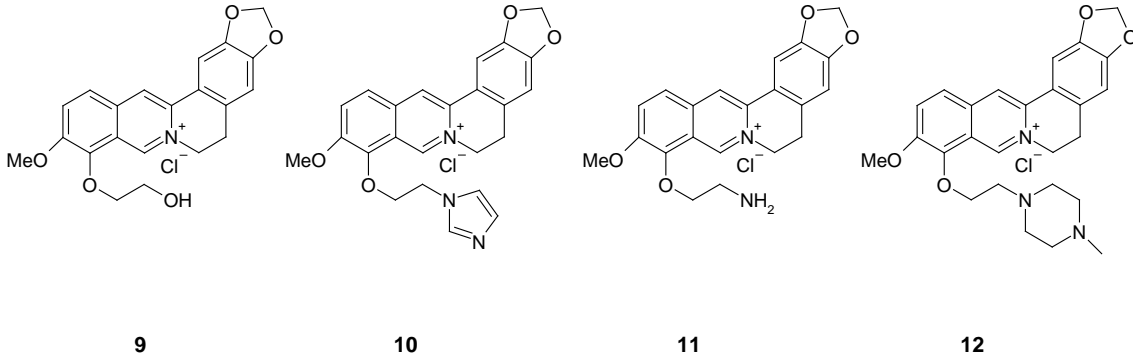
7



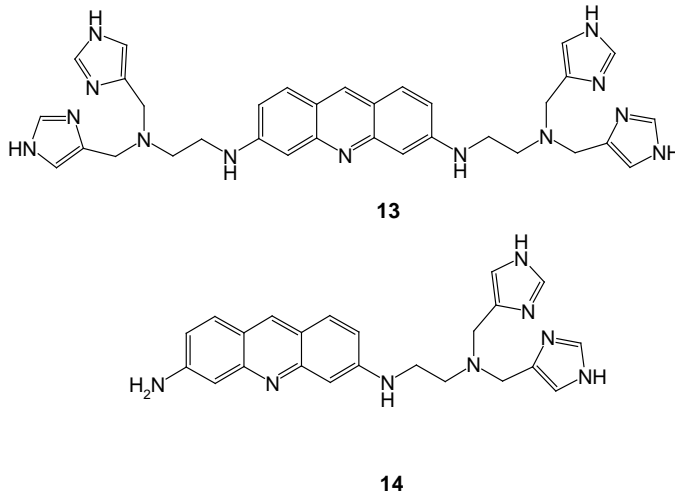
8

2. KAYNAK ÖZETLERİ

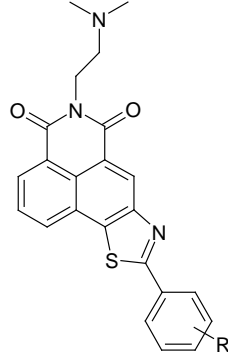
Berberinden çıkılarak modifiye edilmiş dört tane yeni berberine analogu sentezlenmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Spektrofotometrik titrasyon ve etidyum bromür yerdeğiştirme deneyleri sonucu berberin türevlerinin, özellikle bir amino grubu içeren (**11**), calf thymus DNA'ya daha güçlü bağlandığını göstermiştir (Pang 2005).



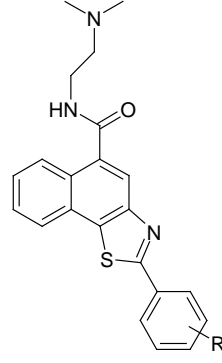
Wilson ve arkadaşları tarafından, akridine konjuge imidazol halkası içeren bileşikler (**13-14**) sentezlenmiş. Sentezlenen bileşiklerin metallerle [Hg(II), Fe(III), Cd(II), Zn(II), V(V), ve Pb(II)] kompleksleri oluşturulmuş ve DNA fotokimyasal kesim çalışmaları yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucu bileşik **14**'ün DNA'ya daha iyi bağlandığı ve metal kompleksleriyle DNA'nın fotokimyasal kesiminin arttığını tespit edilmiştir (Wilson 2005).



Naftalimitten türeyen yeni heterosiklik fenil naftotiazolun karboksiamit analogları sentezlenmiş, antitümör ve DNA kesim etkileri çalışılmıştır. Tüm ligantların antitümör ve DNA fotokesim aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ligantlardan **16b** ve **16c**'nin sitotoksitesinin, **16d**'nin ise DNA kesim etkisinin diğer ligandlara oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Zhiqiang 2005).



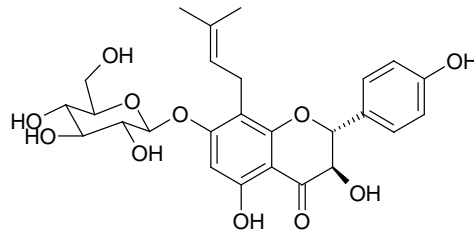
15



16

- a. R₁=H
- b. R=*p*-OCH₃
- c. R=*m*-NO₂
- d. R=*p*-CH₃

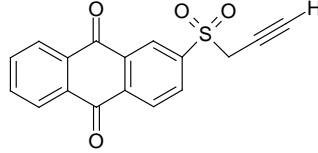
Ma ve arkadaşları tarafından, *Commiphora africana*'nın metanol-su ekstraktının Cu²⁺ varlığında DNA'yı kestiği gözlemlenmiştir. Ham ekstrakt fraksiyonlandırılarak, DNA kesimine sebep olan aktif bileşik saflaştırılmış ve bu bileşik phellamurin (**17**) olarak adlandırılmıştır (Ma 2005).



17

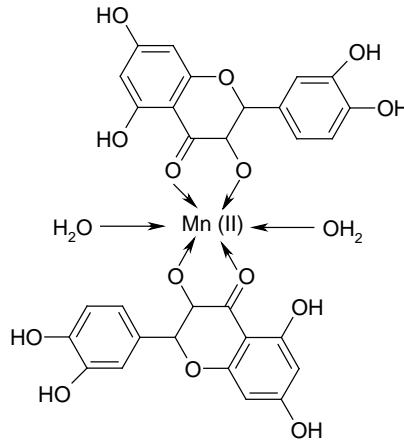
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Propargilik sülfonlar pH'ya bağlı DNA kesim ajanı olarak bilinirler. Haruna ve arkadaşları tarafından propargylik sülfon (**18**) sentezlenmiş ve bu bileşiğin DNA ile güçlü interkalasyon yaptığı ve DNA alkilasyonunu başlattığı rapor edilmiştir. Propargylic sülfon (**18**) yapısındaki antrakinon kromofor grubunun 1 elektron yükseltgenmesi sonucu DNA kesimine sebep olduğu belirtilmiştir (Haruna 2006).



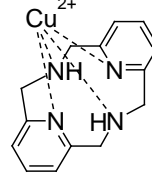
18

Quercetin manganaz (II) kompleksi sentezlenmiş (**19**) ve DNA'nın hidrolitik kesimi araştırılmıştır. Kompleksin plazmid DNA'da tek ve çift zincirden kesimi başlattığı gözlemlenmiştir. DNA kesiminin kompleksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Jun 2007).

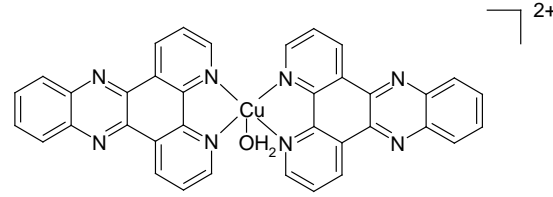


19

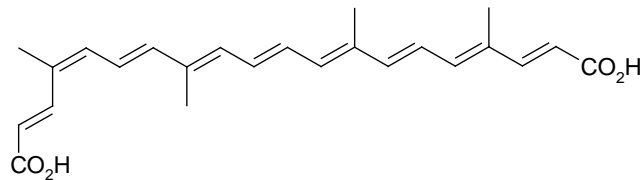
Wang ve arkadaşları tarafından, piridin içeren taç eterlerin Cu^{2+} kompleksi (**20**) sentezlenip, bu kompleksin DNA kesimi üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, Cu^{2+} kompleksinin supercoiled DNA'da fosfodiester bağımlı hidrolizlediğini göstermiştir (Wang 2008).

**20**

Begum ve arkadaşları tarafından sentezlenen **21** ligandının yapısı X-ray ile aydınlatılmış ve kompleksin CT DNA'ya bağlandığı tespit edilmiştir. Kompleksin (**21**) indirgeyici ajan varlığında plazmid DNA'yı kestiği gözlemlenmiş ve kimyasal nükleaz aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Begum 2009).

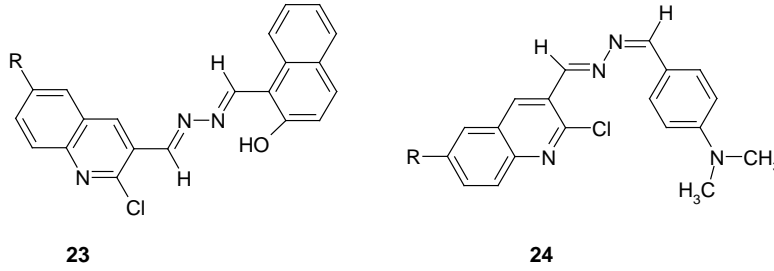
**21**

Ouyang ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada norbixin (**22**) ve Cu^{2+} 'nin DNA hasarına sinerjik etkisi araştırılmıştır. Norbixinin supercoiled plazmid DNA'da bakıra bağlı DNA hasarını arttırdığı, bu hasarın konsantrasyon ve etkileşim zamanına bağlı olduğu gözlemlenmiştir (Ouyang 2008).

**22**

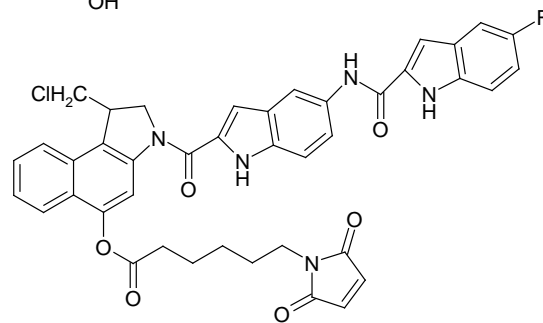
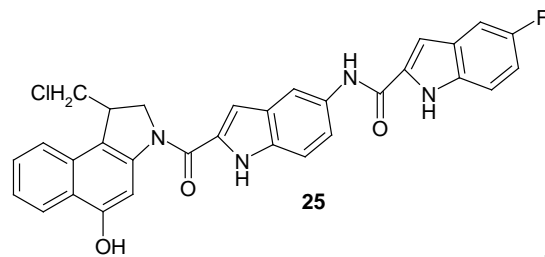
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lamani ve arkadaşları tarafından, farklı sübstitüe quinolin schiff bazları (**23a-c**, **24a-c**) sentezlenerek, antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA bağlanma ilgileri araştırılmıştır. Sonuç olarak tüm schiff bazlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca UV-visible absorbans ve viskozimetre çalışmaları sonucu sentezlenen schiff bazlarının DNA'ya bağlandığı, fakat **3a**'nın bağlanma sabitinin diğer bazlara oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Lamani 2008).

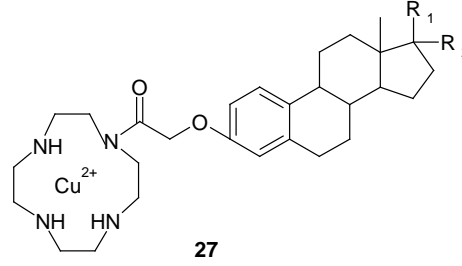


- a. R = H
- b. R = CH₃
- c. R = OCH₃

Wang ve ark. CC-1065 antibiyotikinin, insan albümin proteinine *in vitro* çok güçlü bağlanan prodrug analogu (+)-FDI-CBIM (**26**) sentezleyerek, antitümör aktivitesini çalışmışlar. FDI-CBIM analogunun daha önce sentezledikleri (+)-FDI-CBI (**25**) analoguna oranla lösemi, kolon kanseri, meme kanseri ve yumurtalık kanserinde daha etkili ve daha az toksik olduğunu tespit etmişler (Wang 2008).

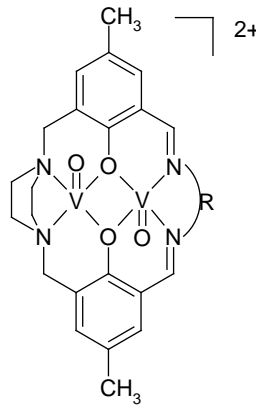


Yang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, bir seri bakır (II) kompleksi sentezlenmiş (**27a-d**) ve karakterize edilmiştir. Komplekslerin DNA kesim aktiviteleri plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiş ve komplekslerin bakır varlığında konsantrasyona bağlı olarak DNA kesimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. **27a** ligandının en güçlü kesim aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Yang 2008).



- a. $R_1=R_2=O$
- b. $R_1=R_2=H$
- c. $R_1=OH, R_2=H$
- d. $R_1=OH, R_2=C\equiv C$

Leelavathy ve arkadaşları tarafından bir seri yeni simetri olmayan makrosiklik binükleer bis-fenokso köprülü oxidovanadyum (IV) kompleksleri sentezlenmiştir. DNA kesim çalışmaları aromatik dimin içeren komplekslerin, alifatik dimin içeren komplekslere oranla DNA ile daha iyi etkileştiğini göstermiştir (Leelavathy 2009).

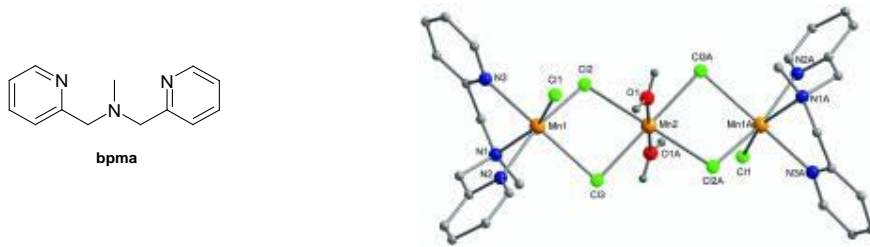


- a. $-(CH_2)-$
- b. $-(CH_2)_3-$
- c. $-(CH_2)_4-$
- d.
- e.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

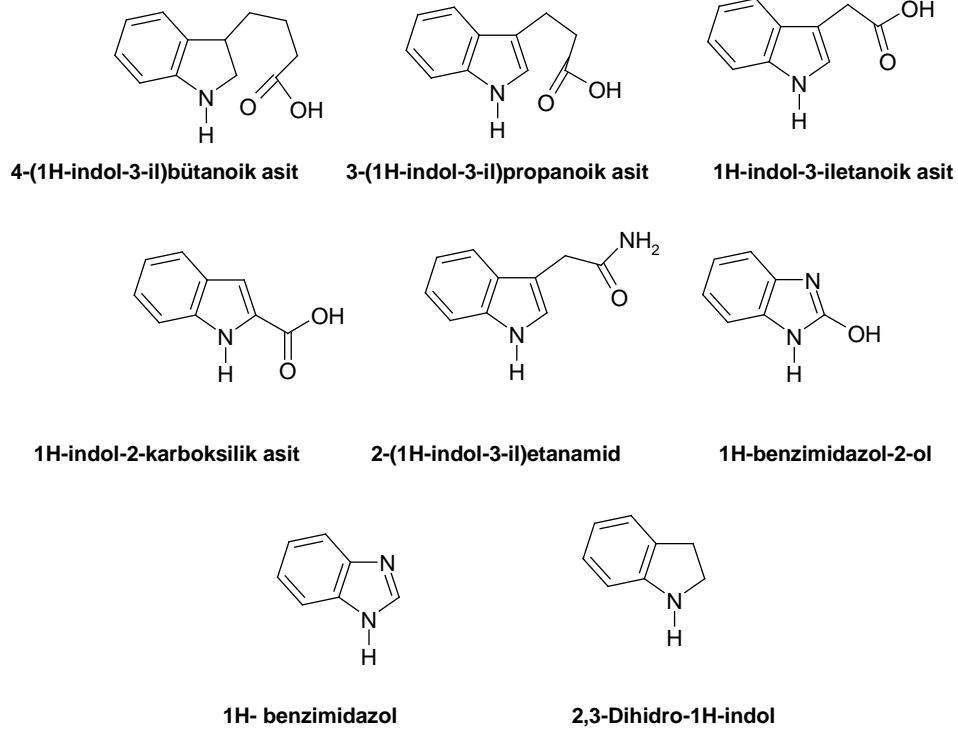
Patra ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada heterosiklik bazların L-glutamin bakır (II) kompleksleri sentezlenip DNA bağlanma ve kesim aktiviteleri çalışılmıştır. Absorpsiyon spektroskopisi çalışmaları, floresans bağlanma çalışmaları, termal denatürasyon çalışmaları ve viskozimetre ölçümleriyle komplekslerin DNA'ya bağlandığı gözlemlenmiş, DNA kesim aktivitesi olduğu yapılan elektroforez sonucunda rapor edilmiştir (Patra 2009).

Qian ve arkadaşları sentezledikleri bpma [N,N-bis(2-pyridylmethyl)methylamine)] bileşiğinin mangan(II) komplekslerini hazırlayıp, bu komplekslerin kristal yapısını karakterize etmişler (Şekil 2.6.), DNA bağlanma ve DNA kesim aktivitelerini çalışmışlardır. UV titrasyon deney sonuçlarına göre, komplekslerin bağlanma sabitlerinin interkalatör olduğu bilinen etidyum bromürün bağlanma sabitinden yaklaşık 100 kat daha düşük olduğunu, dolayısıyla güçlü interkalasyon etki göstermediğini belirlemişlerdir. Komplekslerin DNA kesim aktiviteleri elektroforez tekniği ile pBR322 plasmid DNA kullanılarak çalışılmış, ve hem konsantrasyona hem de reaksiyon süresine bağlı olarak pBR322 plasmid DNA kesiminin arttığı tespit edilmiştir. DNA kesim reaksiyonlarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşup oluşmadığını tespit etmek için, DNA kesim deneyleri hidroksil radikal söndürücü (DMSO), süperoksit söndürücü (SOD), singlet oksijen söndürücü (L-Histidin), peroksit söndürücü (katalaz) ve şelatlama ajanı (EDTA) varlığında tekrarlanmıştır. Sonuç olarak DMSO, SOD, L-Histidin ve katalaz varlığında kesiminin önlenmediği, EDTA varlığında ise DNA kesiminin büyük ölçüde önlenmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuç Mn^{2+} kompleksinin DNA kesiminde anahtar rol oynadığını göstermiştir (Qian 2010).

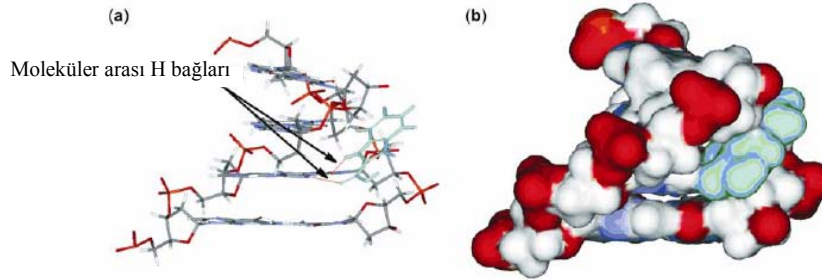


Şekil 2.3. Mangan (II) kompleksinin kristal yapısı

Pandya ve arkadaşları tarafından yapısal olarak birbirine benzeyen sekiz tane indol türevinin DNA bağlanma ilgileri floresans baskılama ve moleküler modelleme metotları ile çalışılmıştır. Sekiz ligandın da DNA'da pürin-pirimidine bağlandığı tespit edilmiştir. Moleküler modelleme çalışmalarında 1H-indol-2-karboksilik asit ve 1H-benzimidazol-2-ol nolu ligandların DNA'ya elektrostatik olarak daha güçlü bağlandığı tespit edilmiştir (Pandya 2010).



Şekil 2.4. Çalışmada kullanılan indol türevleri.

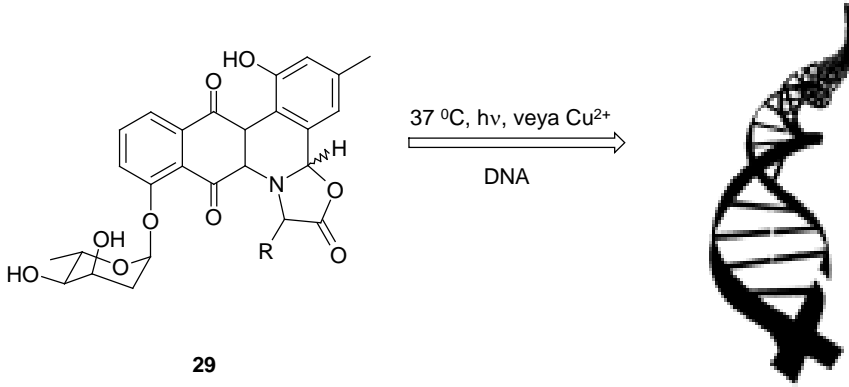


Şekil 2.5. 1H-indol-2-karboksilik asidin moleküler modelleme çalışmaları. **a.** moleküler arası İki hidrojen bağıyla bağlanan İlaç-ligand kompleksi (Hidrojen bağları kırmızı ile gösterilmiştir.) **b.** Aynı kompleksin van der Waals yüzeyi.

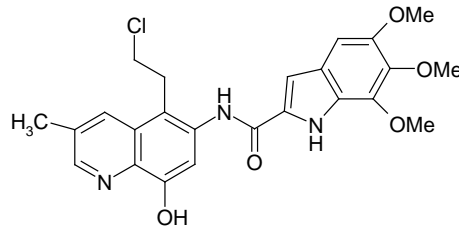
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Naqvi ve arkadaşları tarafından aloin ve aloe emodin gibi zengin polifenol kaynağı olan *Aloe vera*'nın su ekstraktının DNA kesim etkisi çalışılmış. Bakır varlığında DNA kesimine sebep olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktın C(II)'yi Cu(I)'e indirgeme gücü olduğu, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri oluşturabileceği ve böylece DNA kesimine sebep olduğu rapor edilmiştir (Naqvi 2010).

Cottreau ve arkadaşları tarafından antiviral, antitümör ve antibakteriyal gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip tetrasiklin olan Jadomycinlerin (**29**) DNA kesim aktiviteleri araştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi deneyleri sonucunda jadomycin ailesinin bazı üyelerinin DNA kesim ajanı olarak davrandığı, kesimin Cu(II) varlığında veya fotokesim ile arttığı tespit edilmiştir (Cottreau 2010).

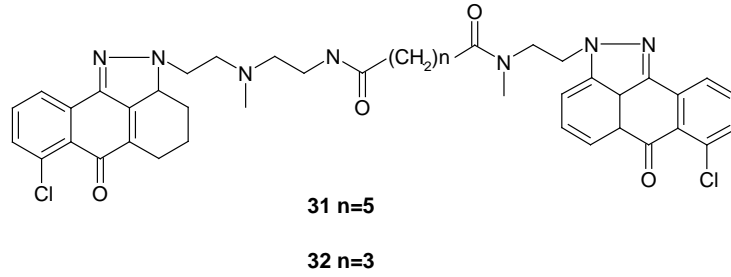


Chavda ve arkadaşları tarafından CC-1065 ve duocarmycinin *seco*-cyclopropylpyrido[*e*]indolone (CPyl) analogu (**30**) sentezlenmiş, DNA bağlanma ve in vivo anti cancer çalışmaları yapılmıştır. Ligandın DNA sarmalında küçük olukta AT zengin bölgeye bağlanma ilgisinin olduğu ve adenin bazına kovalent olarak bağlandığı; sitotoksite çalışmalarında ise fare ve insan tümör hücreleri için toksik olduğu ve bu hücrelerin büyümesini önlediği rapor edilmiştir (Chavda 2010).

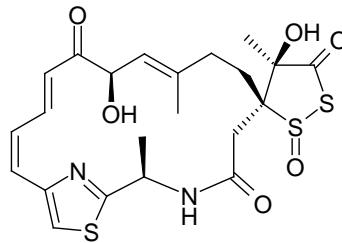


30

Zhang ve arkadaşları tarafından bir seri piperazin ünitesi içeren DNA bisinterkalatör bisantrapirazol bileşikleri (**31**, **32**) moleküler modelleme ve doking yöntemi ile dizayn edilmiş ve sentezlenmiştir. Sentezlenen moleküllerin DNA Topoizomeraz I, II üzerine antikanser etkisi hesapsal ve deneysel olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak sentezlenen bileşiklerin DNA Topoizomeraz I ve II'yi inhibisyon aktivitesi olduğu ve DNA çift zincirinde kırıklara sebep olduğu gözlemlenmiştir (Zhang 2011).



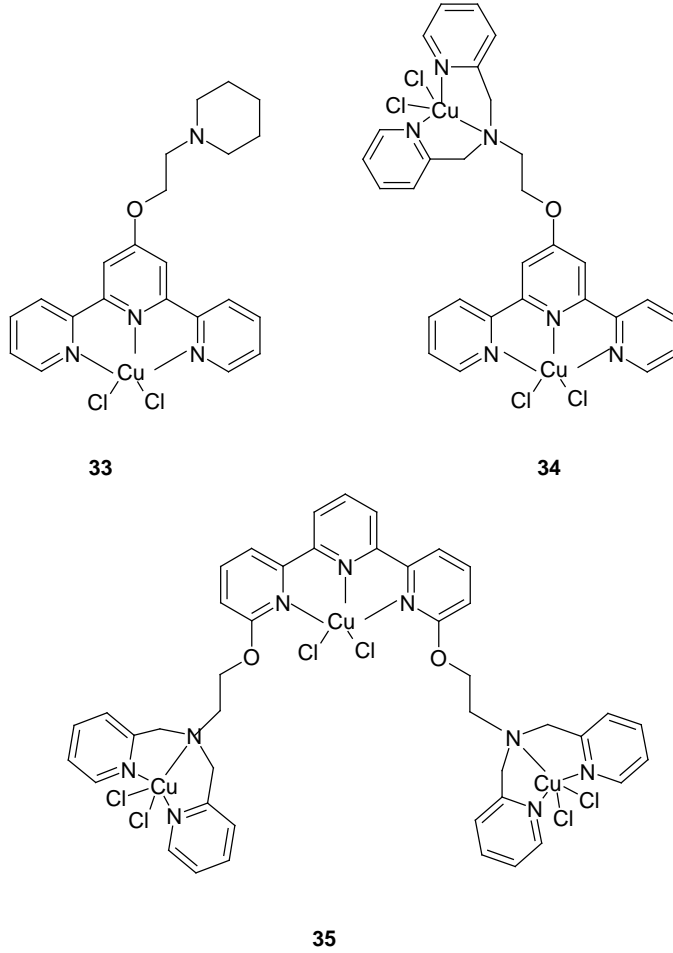
Fekry ve arkadaşları *Streptomyces*'ten elde edilen doğal ürün leinamycinin çift zincirli DNA yapısını alkilleme mekanizmasını araştırmışlar. Leinamycinin tipik bir interkalasyon ajanı olduğunu ve tek zincirli DNA'yı alkillemediğini, tiyol ile aktive edildiğinde leinamicynin konsantrasyona bağlı olarak supercoiled plazmid DNA'yı open circular forma dönüştürdüğünü tespit etmişlerdir (Fekry 2011).



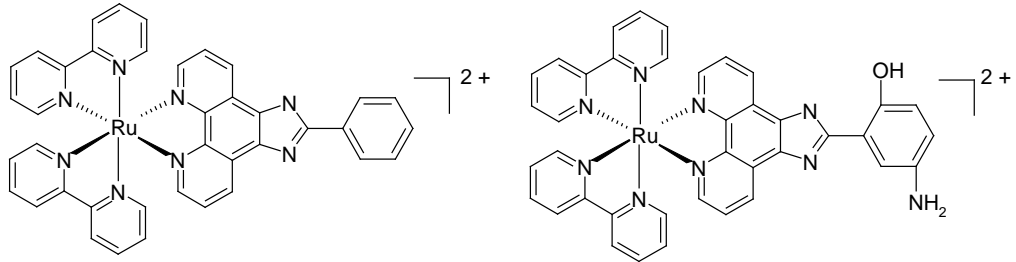
Leinamycin

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yeni disübstitüe terpiridin ligandı ve bu ligandın üç tane bakır (II) ile oluşturduğu kompleksi hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. DNA bağlanma ilgisi UV/vis spektrofotometre ve floresans indikatör ile yer değiştirme deneyleri, DNA kesim etkisi ise agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar aynı grup tarafından daha önce hazırlanmış olan (33) ve (34) kompleksleriyle karşılaştırıldığında, kesim aktivitesinin bakır merkezi sayısına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Üç tane bakır içeren kompleksin (35) nükleaz aktivitesinin yüksek olması DNA kesimi ile hücrel toksikoloji arasında bir bağlantı olup olmadığının araştırılmasına sebep olmuş ve sonuç olarak bu kompleksin dört kanser hücresi üzerinde yüksek toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Suntharalingam 2012).

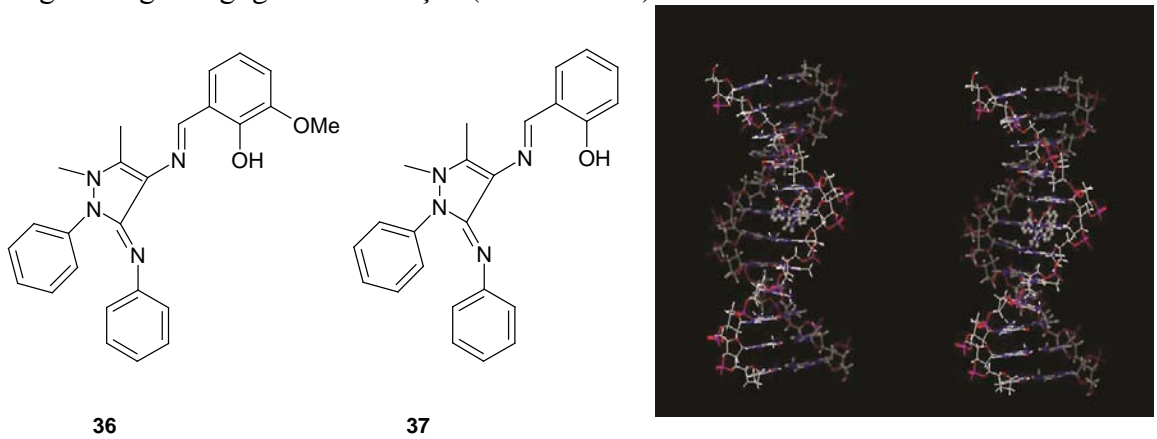


Liu ve arkadaşları tarafından iki yeni ligant APIP, HAPIP ve bunların rutenyum kompleksleri $[\text{Ru}(\text{byp})_2(\text{APIP})](\text{ClO}_4)_2$ ve $[\text{Ru}(\text{byp})_2(\text{HAPIP})](\text{ClO}_4)_2$ sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. DNA bağlanma sabitlerine göre bu komplekslerin DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak bağlandığı, DNA kesim çalışmaları sonucu ise supercoiled pBR322 DNA'yı konsantrayona bağlı olarak open circular forma dönüştürdüğü tespit edilmiştir (Liu 2012).



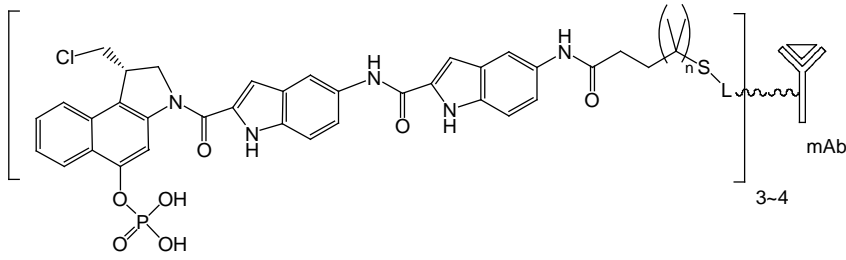
Şekil. 2.6. Komplekslerin yapıları.

Raman ve arkadaşları yeni 4-aminoantipyrine türevi Schiff bazları (**36**, **37**), bunların metal komplekslerini sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Elde edilen bileşiklerin CT-DNA ile olan kompleksleri elektronik absorpsiyon spektroskopisi, viskozite ölçümleri ve siklik voltametri yöntemleri ile analiz edilmiştir. Metal komplekslerin CT-DNA ile etkileşimleri moleküler modelleme yöntemi ile de araştırılmış olup deneysel ile hesapsal verilerin sonucuna göre kompleksin DNA küçük oluşuna bağlandığı gözlemlenmiştir (Raman 2012).



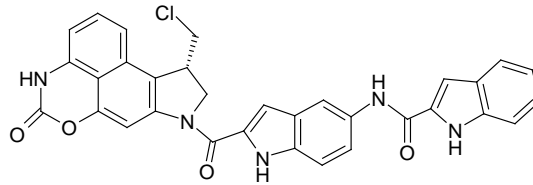
Şekil 2.7. Raman ve ark. tarafından sentezlenen moleküller ve CT-DNA etkileşim gösterimleri.

Zhao ve arkadaşları tarafından CC-1065 antibiyotikinin fosfat ön ilaç analogu (38) sentezlenmiş ve biyolojik değerlendirilmesi yapılmıştır. 1,2,9,9a-tetrahidrosiklopropa[e]indol-4-on (CBI) kısmındaki fosfat grubunun çözünürlüğü ve sulu çözeltide kararlılığı arttırdığı belirtilmiş, fosfat varlığında bu bileşikler aktif DNA alkilleyici ajana dönüşebileceği rapor edilmiştir. Aynı zaman da bileşiğin antikora bağlanarak *in vitro* daha güçlü antijen-seçici sitotoksik aktivite ve *in vivo* antitümör aktivite gösterdiğini tespit edilmiştir (Zhao 2012).



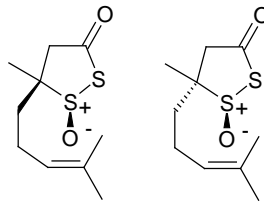
38

Wolfe ve arkadaşları, seco-CBI-indole₂'yi sentezleyerek bunu doğal ürün olan CC 1065 ve duocarmycin ailesinin, salındığında yan ürün bırakmadan hidrolizlenebilen tek heterosiklik karbamat öncü bileşik (prodrug) olarak rapor etmişlerdir. Siklik karbamatın hem biyolojik hem de kimyasal koşullarda daha önce sentezlenen karbamatlara oranla daha kararlı olduğunu, ve böylece toksisitesinin daha az ve etkin dozun diğer karbamatlara oranla 150 kat daha az olduğunu belirtmişlerdir (Wolfe 2012).



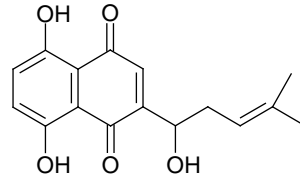
seco-CBI-indole₂

Keerthi ve arkadaşları tarafından, insan kanser hücrelerinde IC50 değeri nanomolar seviyesinde olan, Streptomyces'ten türeyen, doğal ürün leinamycin antibiyotığının küçük bir analogu (**39**) sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu küçük analogun, doğal ürüne benzer şekilde, tiyolle aktive edilen DNA kesimine sebep olduğu fakat DNA sarmalını alkillemediği gözlemlenmiştir. Peroksitleri söndürme etkisi olan katalaz enziminin DNA kesimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuç tiyole bağlı zincir kesiminde reaktif oksijen türleri oluştuğunun göstergesidir (Keerthi 2013).



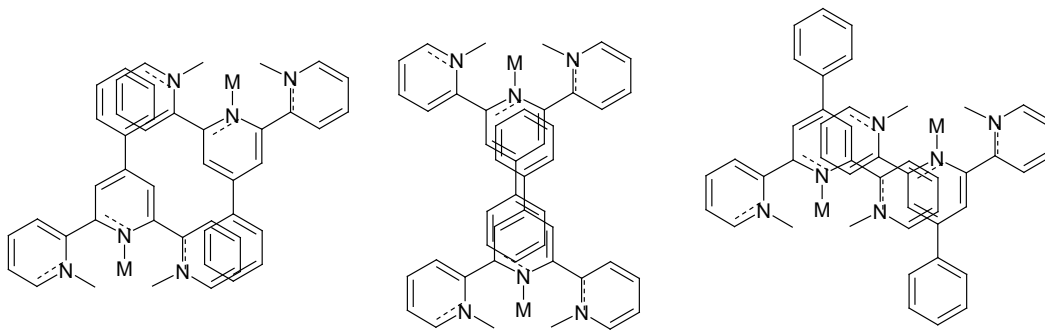
39

Shikonin (β -alkannin), bir naphthazarin türevi, anti inflamatuvar, antitümöral, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite gibi birçok etki gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, Cu(II) varlığında shikoninin supercoiled plazmid DNA'da kesime sebep olduğu tespit edilmiştir. Mg(II), Ca(II), ve Ni(II) gibi diğer metal iyonları test edildiğinde bunların inaktif olduğu, sadece Fe(II)'nin DNA kesim reaksiyonunda aynı etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Bakıra bağlı DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin etkisini analiz etmek için değişik spesifik radikal söndürücüler (Süperoksit için SOD, H₂O₂ için katalaz, hidroksil radikali için, tiyoüre, potasyum iyodür ve singlet oksijen için sodyum azid) kullanılarak agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. SOD, katalaz, tiyoüre, potasyum iyodür ve sodyum azid kullanıldığında plazmid DNA'nın büyük ölçüde korunduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç shikoninin serbest radikaller oluşturarak DNA kesimini gerçekleştirdiğini göstermektedir (Cheng 2011).



Shikonin

Bu çalışmada Phterpy kompleksleri, $[\text{Mn}(\text{Phterpy})_2][\text{N}(\text{CN})_2]_2 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**40**), $[\text{Fe}(\text{Phterpy})_2](\text{NO}_3)_2$ (**41**), $[\text{Ni}(\text{Phterpy})_2](\text{NO}_3)_2$ (**42**), $[\text{Ni}(\text{Phterpy})_2]\text{Cl}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (**43**), $[\text{CD}(\text{Phterpy})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (**44**) ve $[\text{Zn}(\text{Phterpy})_2]\text{Cl}_2$ (**45**) (Phterpy=4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine), hazırlanmış ve tüm komplekslerde aromatik Phterpy ligandlarının intermoleküler π - π etkileşimler ile kendi kendini paketlediği gözlenmiştir (Şekil 2.10.). Bu komplekslerin DNA fotokesimine metal iyonlarının etkisi çalışılmıştır. CT DNA'ya bağlanma sıralaması **40**>**43**>**42**, **44**, **41**, **45** şeklindedir. 365 nm UV ışığı altında **40**, **42** ve **43** komplekslerinin DNA'yı kestiği gözlemlenmiştir. Bir seri kontrol deneyleri dizayn edilmiş ve bu deneylerde DMSO, sodyum azid, SOD, katalaz, potasyum iyodür, EDTA, D_2O , EtSH ve Histidin kullanılmıştır. EDTA DNA kesimini inhibe ederken DMSO, sodyum azid, SOD, katalaz, potasyum iyodür, D_2O , EtSH ve Histidin kesimi kısmen inhibe etmiştir. Bu sonuçlar kesimde hem singlet oksijen hem de hidroksil radikallerinin etkili olduğunu göstermiştir (Chen 2013).



Şekil 2.8. Phterpy ligandı içeren kompleksler için olası kristal paketleme etkileşimleri

Yapılan literatür analizi sonucunda, DNA kesimi gerçekleştiren, DNA'yı tanıyabilen, DNA ile interkalasyon yapan veya DNA'ya bağlanabilen bir çok molekül sentezlendiği görülmektedir. İndol-2-karboksilik asit hidroklorürlerin DNA ile etkileşimi birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve bu moleküllerin DNA küçük oluşuna bağlandığı rapor edilmiştir, fakat yapılan çalışmalarda indol-2-karboksilik asit hidroklorürlerin DNA kesim etkisi çalışılmamıştır. Bu tez kapsamında DNA küçük oluşuna bağlandığı bilinen Duocarmycin antibiyotikinin yapısında bulunan indol karboksilik asit ünitesi içeren ligantlar sentezlenip, bu ligantların DNA kesim etkisi bakır varlığında ve yokluğunda agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. DNA kesim çalışmalarında bakır kullanmamızın nedeni tümör hücrelerinde bakır seviyesinin artmasından kaynaklanmaktadır. Tümörlerin büyümesinde bakırın rolü kapsamlı bir şekilde çalışılmış, bazı çalışmalarda tümör taşıyan fare, sıçan ve insanlarda bakır dağılımını esas alınarak rapor edilmiştir. Literatürde birkaç çalışmada kanser hastalarında hem serum hem de tümör bakır seviyesinde sağlıklı bireylere göre artış olduğu belirtilmiştir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Normal Bireyler ve Kanser Hastalarında Serum ve Doku Bakır Seviyeleri.

Kanser	Normal bakır seviyesi (µg/dL)	Kanser bakır seviyesi (µg/dL)	Referans
Serum seviyesi			
Meme kanseri	122.4	222.7	Yücel, 1994
Prostat kanseri	84.1	124.0	Habib, 1980
Ovarium (yumurtalık) kanseri	92.9	139.5	Chan, 1993
Lösemi (kan kanseri)	114.0	328.0	Carpentein, 1986
Kolorektal kanser (kalın bağırsak kanseri)	98.8	165.0	Gupta,1991
Akciğer kanseri	143.0	188.2	Scanni, 1977
Doku seviyesi			
Meme kanseri	9.3	21.0	Rizk, 1984
Mesane kanseri	1.5	2.8	Margalioth, 1983
Ovarium (yumurtalık) kanseri	1.2	2.1	Margalioth, 1983
Lösemi (kan kanseri)	15.0	52.0	Carpentieri, 1986
Kolorektal kanser (kalın bağırsak kanseri)	1.7	2.7	Gupta, 1991

Ayrıca, birkaç çalışmada kanser hastalarında dört önemli element: bakır, çinko, demir ve selenyum seviyelerine odaklanmıştır. Bu çalışmalar kanser hastalarında çinko, demir ve selenyum konsantrasyonlarının önemli ölçüde düştüğünü, bakır konsantrasyonunun ise aynı yaşta normal dokular ile kıyaslandığı zaman, yüksek olduğunu (2, 3 kat) göstermiştir. Tümörlerde yüksek bakır konsantrasyonunun nedeni tam olarak bilinmemekte, fakat kanser hücrelerinde fazla bulunan bakır bağlayan protein seruloplazminin endojen anjiojenik stimulan olabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,2-Dikloroetan; 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehit; 4-(2-kloroetil)morfolin hidroklorür; 4-Nitrofenol; 5-Amino-1H-indol-2-karboksilik asit; 5-nitro-1H-indol-2-karboksilik asit etil ester; Agaroz; Asetik asit; Calf Thymus DNA; Celite; Dietileter; Dimetilamin; Dimetilformamit; Dimetilsülfoksit-*D*₆; Dimetilsülfoksit; Etidyum bromür; Etil 2- metilasetoasetat; Etil alkol; Etil asetat, Etilendiamintetraasetikasit, Glasiyel asetik asit; Hekzan; Hidroklorik asit; Jel yükleme tamponu, Kloroform-*D*₁; L-Histidin; lityum hidroksit monohidrat; metanol; metilkloroasetat; N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür; N,N-dimetilglisin hidroklorür; Pd/C (%10); Potasyum hidroksit; Potasyum karbonat; Sezyum karbonat; Sodyum karbonat; Sodyum Klorür; Sodyum asetat; Sodyum metoksit; Sodyum nitrit; 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloksi (TEMPO); tetrahidrofuran, Tiyoüre; Toluene; Trietilamin; Trizma Baz, Merck, Sigma, Fluka ve Across'tan temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Aletler

¹H NMR (Bruker 400 MHz), ¹³C NMR (Bruker 100 MHz), Yatay DNA Elektroforez (Biolab), Güç Kaynağı (Biorad-power PAC 3000), Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), Sterilizatör (Heraus), Laminar air flow (Kendro-Hera KS12), Çalkalayıcı Orbital İnkübatör (Zehring zhw-200b), -20 Derin Dondurucu (Sanyo), Santrifüj (Universal 320 R, Hettich), pH meter (Mettler-toledo), Otoklav (Hiramaya-HV-502), Çeker Ocak, Evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), Terazi (Mettler Toledo), Vorteks (Heidolph), Mikro Santrifüj (Eppendorf) ve Buzdolabı (Arçelik) cihazları kullanılmıştır.

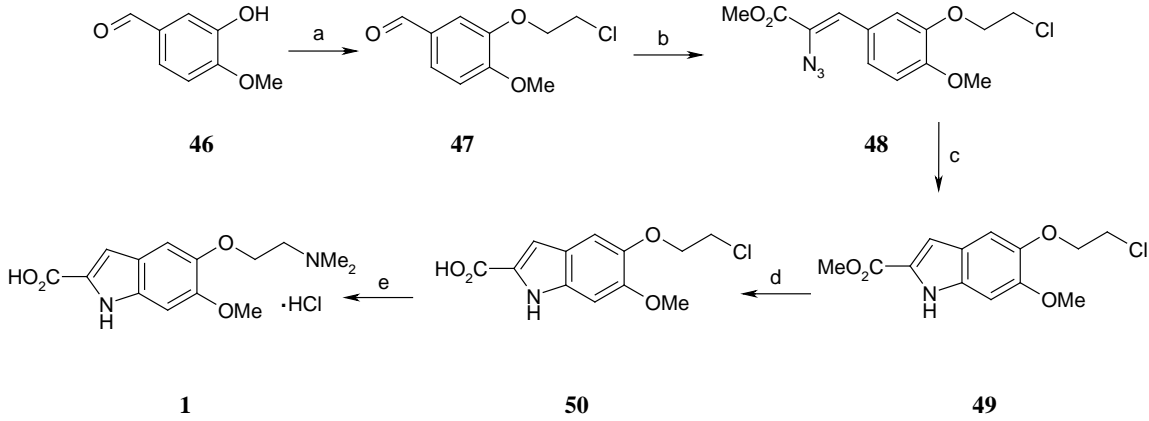
3. 2. Metot

3.2.1. Sentez Çalışmaları

Bu tez kapsamında; (+)-Duocarmycin A ve SA antibiyotiklerinin yapısında bulunan C-5 karbonunda tersiyer amino fonksiyonel gruba sahip üç tane (**1-3**) suda

çözünen indol-2-karboksilik asit hidroklorür analogu sentezlendi (Tietze 2006, Tietze 2007).

3.2.1.1. 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**)



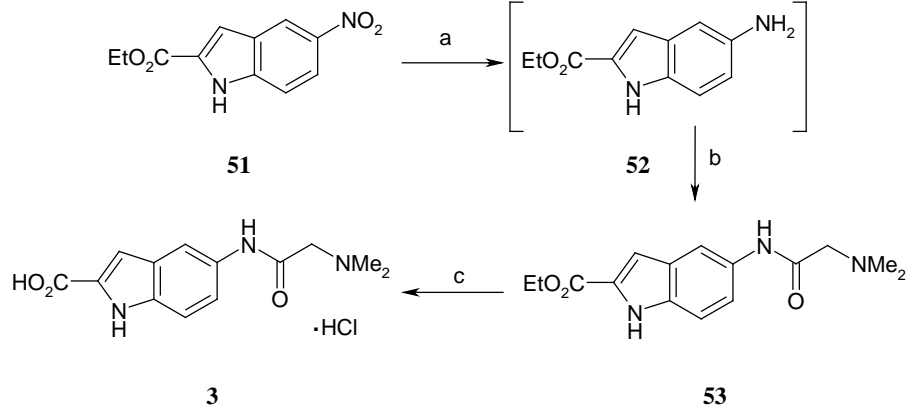
Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** (CH₂Cl)₂, K₂CO₃, DMF, 70 °C **b.** N₃CH₂CO₂Me, NaOMe/MeOH, MeOH, -30 °C - 0 °C, 16 saat **c.** toluen, reflaks, 4 saat **d.** Cs₂CO₃, EtOH/H₂O, reflaks 8 saat **e.** Me₂NH, Na₂CO₃, H₂O, 100 °C, 1.5 saat.

Şekil 3.1. 1 nolu ligandın sentez şeması

C-5 pozisyonunda dimetilaminoetoksi grubu ve C-6 pozisyonunda metoksi grubu içeren, indol karboksilik asit **1**, indol halkasının oluşması için, Hemetsberger metodu takip edilerek hazırlandı (Şekil 3.1.). Bunun için, benzaldehit **46** 1,2 dikloroetan ile potasyum karbonat varlığında O-alkillenerek **47** elde edildi. **47** bileşiğinde, metil α-azidoasetat ile sodyum metoksit baz olarak kullanılarak α-azidocinnamate **48** elde edildi. **48**, 115 °C de dört saat karıştırılarak indol karboksilik asit türevi **49**, **45**'ten elde edildi. **49**'daki metilester kısmının hidrolizini takiben dimetil amin ile kloro grubunun nükleofilik sübsitasyonu ile dizayn edilen indol karboksilik asit türevi **1** iki basamakta sentezlendi.

3.2.1.2. 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür

(2)

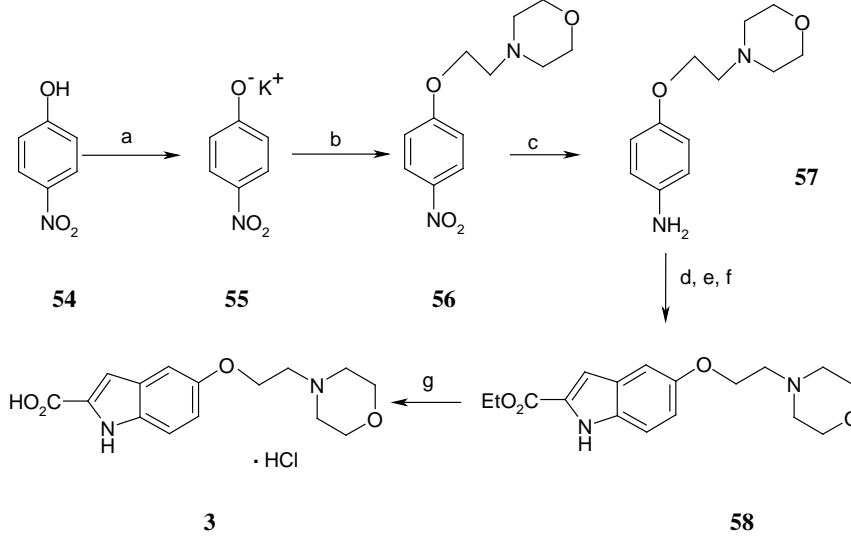


Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** Pd/C/H₂, EtOAc, oda sıcaklığı, 5 saat; **b.** *N,N*-dimetilglisin hidroklorür, EDC·HCl, DMF, oda sıcaklığı, 21 saat **c.** LiOH·H₂O, THF/MeOH/H₂O, 60 °C, 4 saat, MeOH/HCl.

Şekil 3.2. 2 nolu ligandın sentez şeması

N,N-dimetilglisin grubu içeren, indol karboksilik asit **2** sentezine ticari olarak temin edilen ester **51**'den başlandı (Şekil 3.2.). **51**'deki nitro grubu Pd/C katalizörlüğünde hidrojenlenerek kararsız amin **52** elde edildi. Daha sonra, amin **52**, *N,N*-dimetilglisin hidroklorür ile *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC·HCl) varlığında birleştirilerek amid **53** iki basamakta elde edildi. Son olarak, elde edilen amitteki (**53**) ester kısmı, amit fonksiyonel grubunun hidrolizini önlemek için LiOH ile, THF/metanol/su içerisinde hidrolizlenerek, dizayn edilen asit **2** kantitatif verimle elde edildi.

3.2.1.3. 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3)



Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** KOH, EtOH, oda sıcaklığı, 30 dakika **b.** 4-(2-(2-kloroetil) morfolin, toluen, reflaks, 24 saat **c.** Pd/C/H₂, EtOH/ H₂O, oda sıcaklığı, 1 saat **d.** NaNO₂, HCl/ H₂O, 0 °C, 50 dakika **e.** etil 2-metil asetoasetat, NaOAc, EtOH, 0 °C-oda sıcaklığı, 3 saat **f.** EtOH/H₂O, reflaks, 40 dakika **g.** NaOH, MeOH/H₂O, reflaks, 3 saat, MeOH/HCl.

Şekil 3.3. 4 nolu ligandın sentez şeması

Morfolinetoksi sübstienti içeren, indol karboksilik asit 3, anilin 57'den Japp-Klingemann tipi Fischer indol sentezini takiben oluşan ester 58'in hidrolizlenmesi ile % 65 verimle dört basamakta hazırlandı (Şekil 3.3.). 4-nitrofenolün (54) 4-(2-(2-kloroetil)-morfolin ile alkiasyonu sonucu nitro bileşiği 56 elde edildi. Elde edilen nitro bileşiğinin (56) Pd/C katalizörlüğünde indirgenmesi sonucu ile 54'ten anilin (57) elde edildi.

3.2.2. DNA Kesim Çalışmaları

DNA kesiminin incelemenin bir yolu supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I); open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya linear (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Agaroz Jel Elektrofrezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin

yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir (Şekil 3. 5.).

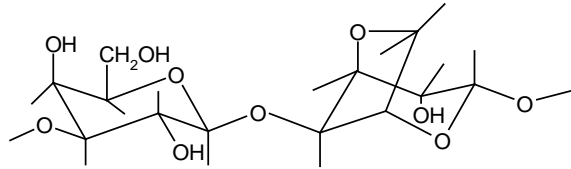
DNA kesim çalışmaları agaroz jel elektroforezi tekniği kullanılarak çalışıldı (Thorne 1996).

3. 2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroforez tekniği de bu prensibe dayanır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması, ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği teknikleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforezi tekniği, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır.

Agaroz jelde örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. DNA şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı anottan katoda doğru hareket eder.

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir (Şekil 3.4.). Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür.



Şekil 3.4. Agarozun molekül yapısı.

3.2.2.1.1. Agaroz Jellerde DNA'nın Hareket Hızını Etkileyen Etmenler

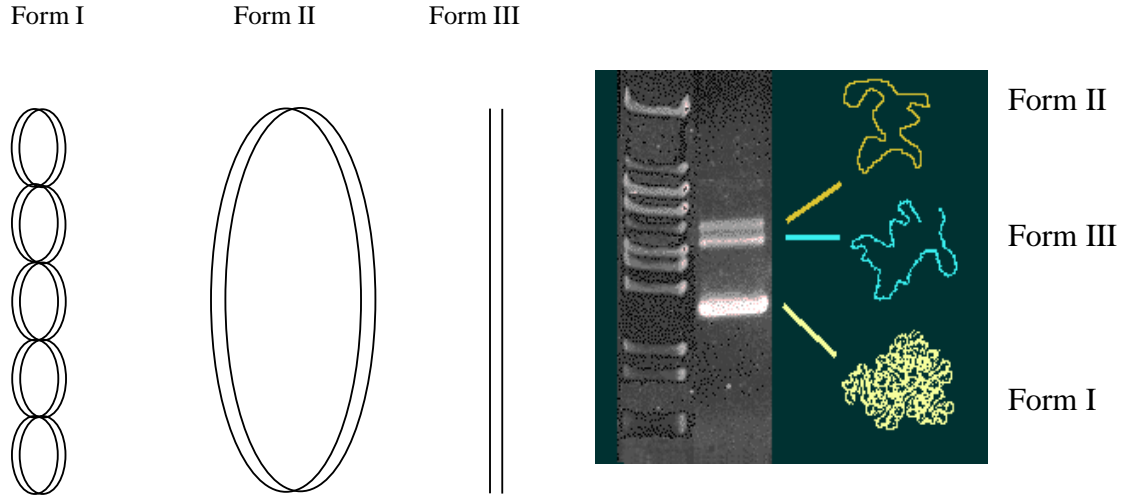
DNA molekülünün büyüklüğü: Çift zincirli doğrusal DNA moleküllerinin jeldeki hızı, baz çifti sayısının logaritması ile ters orantılıdır. Büyük moleküller, sürtünmemin büyük olması ve jeldeki porlar arasından yol bularak ilerlediklerinden daha yavaş hareket ederler.

Agaroz konsantrasyonu: Belirli büyüklükteki doğrusal DNA molekülü, değişik agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı hızlarda ilerler. DNA'nın elektroforez hareketliliğinin logaritması ile jel konsantrasyonu arasında bir ilişki vardır. Dolayısıyla değişik konsantrasyonlarda jeller kullanılarak farklı boyutlardaki DNA moleküllerini ayırmak mümkündür (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Değişik miktarlarda agaroz içeren jellerde ayırma aralıkları.

Jeldeki agaroz miktarı (% w/v)	Doğrusal DNA moleküllerinin etkili ayırma aralığı (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

DNA'nın Konformasyonu: Plazmid DNA'nın üç formu vardır. **i)** Supercoiled (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I); **ii)** open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II); **iii)** linear (doğrusal DNA, iki zincirde bir veya birden fazla kırık, Form III) Agaroz Jel Elektroforezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu genellikle en yavaş hareket eder (Boyer 1993). Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir (Şekil 3. 5.).



Şekil 3.5. Plazmid DNA

Uygulanan Voltaj: Düşük voltajlarda doğrusal DNA parçalarının hareket hızları uygulanan voltaj ile doğru orantılıdır. Elektriksel alanın gücü arttıkça büyük molekül ağırlıklı DNA parçalarının hareketi farklı ölçülerde artar.

Baz bileşimi ve sıcaklık: DNA moleküllerinin agaroz jellerdeki davranışları, baz bileşimlerinden ve jelin yürütüldüğü sıcaklık derecesinden çok fazla etkilenmez. Değişik boylardaki DNA moleküllerinin agaroz jeldeki bağıl hareketleri 4-30 °C arasında değişmez. Jeller genellikle oda sıcaklığında yürütülür.

İnterkalasyon yapan ajanların varlığı: Agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'nın gözlenmesi için kullanılan floresan karakterdeki etidyum bromür doğrusal DNA moleküllerinin elektroforetik hareketini %15 oranında azaltır.

Elektroforez tamponunun bileşimi: DNA'nın elektroforetik hareketi elektroforez tamponunun bileşimi ve iyonik gücü tarafından etkilenir. İyonların yokluğunda elektriksel iletkenlik minimum düzeyde olduğu için DNA'nın hareketi çok yavaştır. Çok yüksek iyonik güçteki tamponun kullanılması halinde elektriksel iletkenlik çok fazladır ve çok miktarda ısı açığa çıkar. Bu durumda jel eriyebilir veya DNA denatüre olabilir.

3. MATERYAL VE METOT

Doğal çift zincirli DNA'lar için değişik tamponlar kullanılabilir. Bunlar arasında EDTA (pH 8.0), pH'sı 7.5-8.5 olan 50 mM konsantrasyondaki Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) ya da Tris-fosfat tamponları sayılabilir. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanırlar.

Tablo 3.2. Sıklıkla kullanılan elektroforez tamponları

Tampon	Çalışılan çözelti	Konsantre stok çözelti (litrede)
Tris-asetat (TAE)	1x: 0.04 M Tris-asetat 0.001 M EDTA	50x: 242 g trizma base 57.1 mL Glasiyel asetik asit 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-fosfat (TPE)	1x: 0.09 M tris-fosfat 0.002 M EDTA	50x: 540 g trizma base 77.5 µL %85 fosforik asit (1.679 g/mL) 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-borat (TBE)	1x: 0.09 M tris-borat 0.002 M EDTA	50x: 540 g trizma base 55 g borik asit 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)

3.2.2.1.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz (1 g) 100 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. 60°C'ye soğutuldu. 1.5 µL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletildi.

3.2.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Yapılışı

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 mL Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı Jel Görüntüleme Sistemi ile çekildi.

3.2.2.1.4. Plazmid Saflaştırma

pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak saflaştırıldı (Birnboim 1979). pBluescript M13+ plazmid DNA'nın saflığına, hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanlarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorban ölçümü ile hesaplandı (50 µg/mL için $A_{260}=1.0$).

3.2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

DNA kesim çalışmaları için, sentezlenen ligantların (1), (2), (3) su içerisinde 1 mM 1,0 mL stok çözeltileri hazırlandı.

Bakır (II) klorür çözeltisi su içerisinde 1 mM olacak şekilde 10 mL stok çözeltisi hazırlandı.

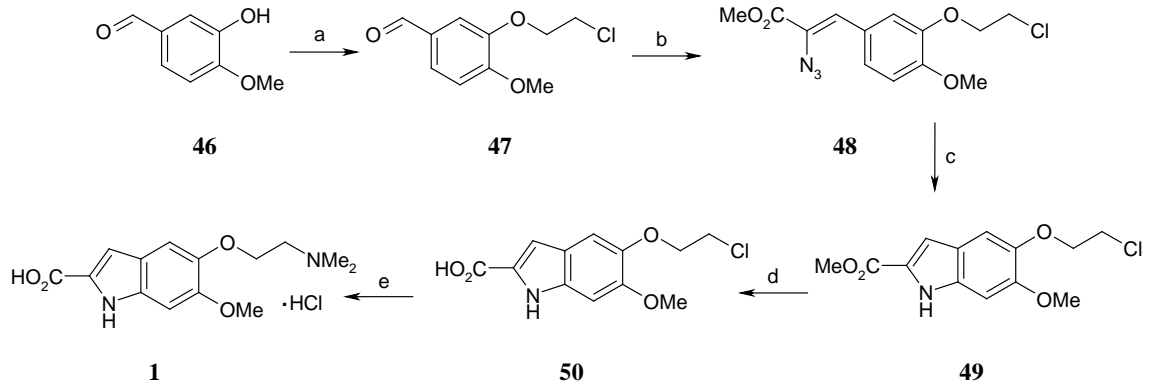
Radikal söndürücü olarak kullanılan L-Histidin, Tiyüre, TEMPO ve DMSO için sırasıyla 250 mM, 1 M, 500 mM ve 10 M konsantrasyonlarında, su içerisinde stok çözeltiler hazırlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Ligantların sentez çalışmaları

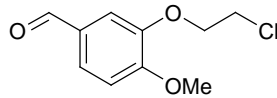
Suda çözünebilen üç tane indol-2-karboksilik asit hidroklorür analogu sentezlendi (Tietze 2006; Tietze 2007).

4.1.1. 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1) Sentezi



Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** $(CH_2Cl)_2$, K_2CO_3 , DMF, 70 °C **b.** $N_3CH_2CO_2Me$, $NaOMe/MeOH$, $MeOH$, -30 °C - 0 °C, 16 saat **c.** toluen, reflaks, 4 saat **d.** Cs_2CO_3 , $EtOH/H_2O$, reflaks 8 saat **e.** Me_2NH , Na_2CO_3 , H_2O , 100 °C, 1.5 saat.

3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksibenzaldehit (47)

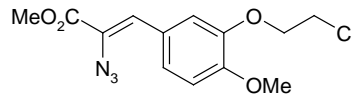


3-hidroksi-4-metoksibenzaldehit (**46**; 10.0 g, 65.7 mmol, 1.0 eq), K_2CO_3 (45.4 g, 329 mmol, 5.0 eq), 1,2-dikloroetan (104 mL, 1.31 mol, 19 eq) ve DMF (300 mL) 65-70 °C'de 16 saat karıştırıldı. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, 1,2-dikloroetan

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

vakum altında uçuruldu. Kalan karışımın üzerine buz ilave edildi ve karışım sırasıyla Et₂O (2x250 mL) ve EtOAc (3x250 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar su (3x400 mL) ve doygun tuz çözeltisi ile (2x400 mL) ekstrakte edildi, MgSO₄ ile kurutuldu ve çözücü vakum altında uçuruldu. EtOAc/hekzan ile kristallendirildi ve renksiz katı kristal 3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksibenzaldehit (**47**; 11.47 g, %81) oluştu. $R_f = 0.63$ (EtOAc/PE, 3:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta=3.89$ (t, *J* 6.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 3.98 (s, 3H, OMe), 4.35 (t, *J* 6.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 7.02 (d, *J* 8.2 Hz, 1H, 5-H), 7.44 (d, *J* 1.8 Hz, 1H, 2-H), 7.52 (dd, *J* 8.2 Hz, 1.8 Hz, 1H, 6-H), 9.87 (s, 1H, CHO) ppm.

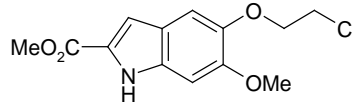
Metil 2-Azido-3[3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksifenil]akrilat (**48**)



NaN₃ (22.2 g, 341 mmol, 13.6 eq) yavaş yavaş, DMSO (100 mL) içerisindeki metilkloroasetat (20 mL, 227 mmol, 9.0 eq) çözeltisine ilave edildi. 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra, su (150 mL) ilave edildi ve karışım Et₂O (3x100 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar MgSO₄ ile kurutuldu ve vakum altında hacmi 50 mL olana dek çözücü uçuruldu. Daha sonra metanol (50 mL) içerisinde 3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksibenzaldehit (**47**; 5.37 g, 25 mmol, 1.0 eq) çözeltisi eklendi ve karışım -30 °C'ye soğutuldu. Daha sonra yarım saat süresince -30 °C'de 5.4 M NaOMe/MeOH (35 mL) ile etkileştirildi, 0 °C'ye soğutuldu ve metanol (50 mL) ilave edildi. 0 °C'de 16 saat karıştırıldıktan sonra su (200 mL) ilave edildi ve karışım CH₂Cl₂ (3x200 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar doygun tuz çözeltisi (200 mL) ile yıkandı, MgSO₄ ile kurutuldu ve vakum altında çözücüsü uçuruldu. Elde edilen açık sarı katı Metil 2-Azido-3[3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksifenil]akrilat (**48**; 6.47 g, % 83) sonraki basamakta herhangi bir saflaştırma yapılmadan kullanıldı. $R_f = 0.44$ (PE/EtOAc, 2:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta=3.89$ (t, *J* 6.1 Hz, 2H, 2''-H₂), 3.92-3.93 (2xs, 6H, OMe, CO₂Me), 4.34 (t, *J* 6.1 Hz, 2H, 1''-H₂), 6.87(s, 1H, 1'-H), 6.91 (d,

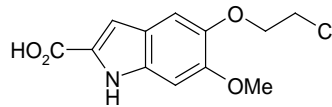
J 8.4 Hz, 1H, 5-H), 7.41 (dd, J 8.4 Hz, 2.1 Hz, 1H, 6-H), 7.58 (d, J 2.0 Hz, 1H, 2-H) ppm.

Metil 5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilat (**49**)



Toluen (200 mL) içerisindeki metil 2-Azido-3[3-(2-Kloroetoksi)-4-metoksifenil]akrilat (**48**; 3.41 g, 10.9 mmol) çözeltisi 4 saat reflaks edildi. Oda sıcaklığına getirildikten sonra karışım vakum altında konsantre edildi, oluşan kristaller süzüldü ve vakum altında kurutularak açık sarı katı Metil 5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilat (**49**; 2.21 g, % 71) elde edildi. $R_f = 0.24$ (PE/EtOAc, 2:1). ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 3.81\text{-}3.83$ (2xs, 6H, OMe, CO_2Me), 3.93 (t, J 5.2 Hz, 2H, 2'- H_2), 4.21 (t, J 5.2 Hz, 2H, 1'- H_2), 6.92 (s, 1H, 7-H), 7.02 (d, J 1.8 Hz, 1H, 3-H), 7.16 (s, 1H, 4-H), 11.66 (br. s, 1H, NH) ppm.

5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik Asit (**50**)



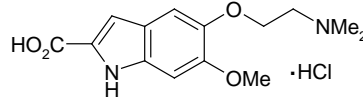
Metil 5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilat (**49**; 2.00 g, 7.05 mmol, 1 eq), Cs_2CO_3 (3.45 g, 10.6 mmol, 1.5 eq), %95 EtOH (40 mL) ve su (20 mL) içeren süspansiyon 8 saat reflaks edildi. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözücü vakum altında uçuruldu, kalan kısma 50 mL su ilave edildi ve elde edilen çözelti 2 M HCl ile asitlendirildi. Oluşan çökelti filtre edilerek izole edildi, su (100mL) ile yıkandı. Vakum altında kurutularak bej renkli katı 5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

karboksilik Asit (**50**; 1.80 g, %95) elde edildi. $R_f = 0.30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1, % 1 konsantre HCl). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 3.80$ (s, 3H, OMe), 3.94 (t, J 5.3 Hz, 2H, 2'-H₂), 4.21 (t, J 5.3 Hz, 2H, 1'-H₂), 6.89 (s, 1H, 7-H), 6.95 (d, J 2.1 Hz, 1H, 3-H), 7.15 (s, 1H, 4-H), 11.47 (br. s, 1H, NH), 12.63 (br. s, 1H, CO₂H) ppm.

5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik Asit

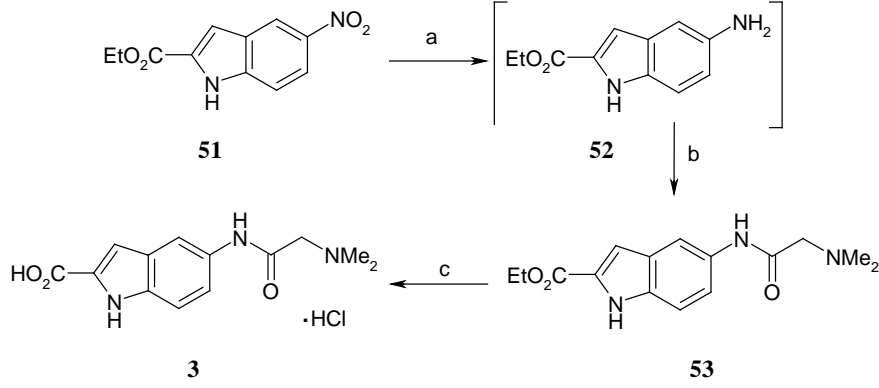
Hidroklorür (1)



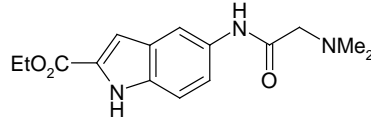
5-(2-Kloroetoksi)-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit (**50**; 300 mg, 1.11 mmol, 1 eq), % 40 sulu Me_2NH (2.81 mL, 22.2 mmol), Na_2CO_3 (295 mg, 2.78 mmol, 2.5 eq) ve su (20 mL) karışımı 100 °C'de 1.5 saat ısıtıldı. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözücü vakum altında uçuruldu. Kalan kısım su (15 mL) içerisinde çözüldü ve elde edilen çözelti 2M HCl ile pH 1 olana kadar asitlendirildi, çözelti evapore edildi ve elde edilen ham üründen, silika jelde ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 10:1, %1 konsantre HCl), kolon kromatografisi ile suda çözünen yeşil renkli katı madde elde edildi. Silika jel filtre edilerek uzaklaştırıldı ve kalan kısım vakumda kurutuldu. $^1\text{H NMR}$ spektrumu incelendiğinde yapının saf olmadığı anlaşıldı. Silika jelde ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 11:1, %1 konsantre HCl), tekrar kolon kromatografisi yapıldı ve suda çözünen yeşil renkli katı 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**; 120 mg, %35) elde edildi. $R_f = 0.30$ ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 10:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.88$ (s, 6 H, NMe_2), 3.50 (t, J 5.0 Hz, 2 H, 2'-H₂), 3.82 (s, 3 H, OMe), 4.32 (t, J 5.0 Hz, 2 H, 1'-H₂), 6.93 (s, 1 H, 7-H), 6.97 (d, J 1.8 Hz, 1 H, 3-H), 7.24 (s, 1 H, 4-H), 10.51 (br. s, 1 H, NH^+), 11.55 (br. s, 1 H, NH), 12.66 (br. s, 1 H, CO₂H) ppm.

4.1.2.5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür

(2) Sentezi



Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** Pd/C/H₂, EtOAc, oda sıcaklığı, 5 saat; **b.** *N,N*-dimetilglisin hidroklorür, EDC.HCl, DMF, oda sıcaklığı, 21 saat **c.** LiOH.H₂O, THF/MeOH/H₂O, 60 °C, 4 saat, MeOH/HCl.

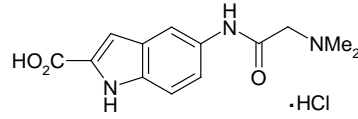
Etil 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilat (53)

EtOAc (125 mL) içerisinde 5-nitro-1*H*-indol-2-karboksilik asit etil ester (**51**; 750 mg, 3.20 mmol, 1.3 eq), Pd/C (% 10, 300 mg, 2.55 mmol, 1.0 eq) katalizörlüğünde 5 saat boyunca 60 psi basınçta H₂ gazı ile, oda sıcaklığında, hidrojenlendi. Daha sonra reaksiyon karışımı celite üzerinden süzüldü, celite sırasıyla CH₂Cl₂ (400 mL) ve MeOH (400 mL) ile yıkandı. Filtrat evaporatörde kurutuldu. Elde edilen 5-amino-1*H*-indol-2-karboksilik asit etil ester bileşiği kararsız olduğundan izole edilmeden bir sonraki adıma geçildi. 5-amino-1*H*-indol-2-karboksilik asit etil ester (**52**) DMF (30 mL) içerisinde çözüldü ve çözelti 0°C' ye soğutuldu. Reaksiyon karışımına EDC.HCl (1.84 g, 9.60 mmol, 3.8 eq) ve *N,N*-dimetilglisin hidroklorür (670 mg, 4.80 mmol, 1.9 eq) eklendi ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığına ısıtıldı. Oda sıcaklığında 21 saat karıştırıldıktan sonra, çözelti EtOAc (100 mL) ve su (100 mL) ile seyreltildi. Karışımın pH'sı doymun

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

NaHCO₃ çözeltisi ile 9'a ayarlandı ve karışım EtOAc (4x150 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fraksiyonlar su (4x200 mL) ve doymuş tuz çözeltisi (300 mL) ile yıkandı, MgSO₄ ile kurutuldu, çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Silika jelde Kolon kromatografisi (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) ile açık kahve renkli Etil 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilat (**53**; 670 mg, % 73) elde edildi. *R*_f = 0.46 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (t, *J* 7.2 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 2.40 (s, 6 H, NMe₂), 3.11 (s, 2 H, 1'-H₂), 4.41 (q, *J* 7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 7.18 (d, *J* 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 7.36 (d, *J* 8.8 Hz, 1 H, 7-H), 7.43 (dd, *J* 8.4 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 6-H), 8.06 (br. s, 1 H, 4-H), 8.89 (br. s, 1 H, NH), 9.14 (br. s, 1 H, NH) ppm.

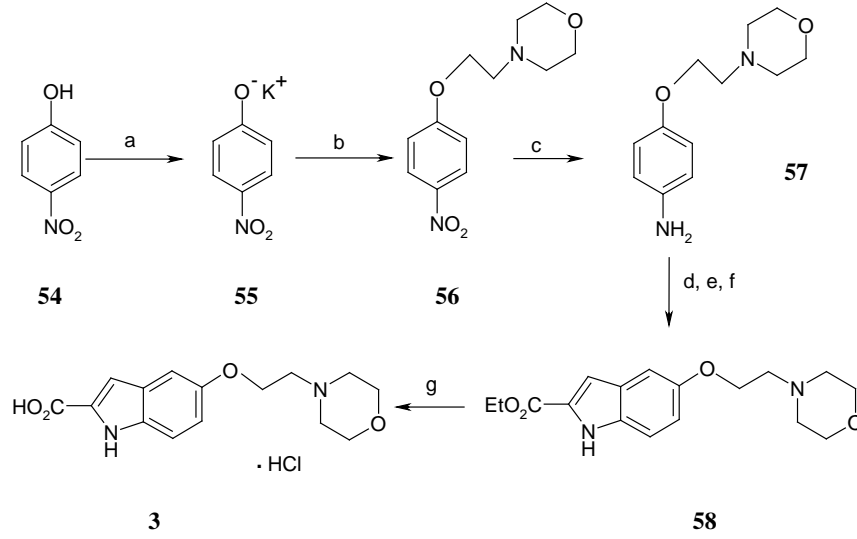
5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2)



Etil 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilat (**63**; 0.200 g, 0.69 mmol, 1 eq), THF (6 mL), MeOH (2 mL) ve su (2 mL) karışımı LiOH.H₂O (0.035 g, 0.830 mmol, 1.2 eq) ile etkileştirildi ve 60 °C' de 4 saat karıştırıldı. Daha sonra çözücü vakum altında uzaklaştırıldı ve kalıntı suda çözüldü. Elde edilen çözelti pH 1 olana kadar 2 M HCl ile asitlendirildi, uygun basınçta su uzaklaştırıldı. Karışım aseton/EtOH (1:1) içerisine alındı. Oluşan çökelti (LiCl) filtre edilerek uzaklaştırıldı. Filtrat evaporatörde kurutuldu. Ham maddeden silika jelde kolon kromatografisi (CH₂Cl₂/MeOH, 5:1, % 0.5 HCl) ile açık sarı renkli 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**; 240 mg, kant.) elde edildi. *R*_f = 0.19 (CH₂Cl₂/MeOH, 5:1, % 0.5 HCl) ¹H NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): δ = 2.89 (s, 6 H, NMe₂), 4.16 (s, 2 H, 1'-H₂), 7.08 (d, *J* 2.0 Hz, 1 H, 3-H), 7.41-7.43 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 8.02 (br. s, 1 H, 4-H), 10.10 (br. s, 1 H, NH⁺), 10.84 (br. s, 1 H, NH), 11.78 (br. s, 1 H, NH), 12.94 (br. s, 1H, CO₂H) ppm.

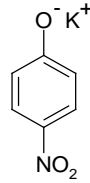
4.1.3. 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**)

Sentezi



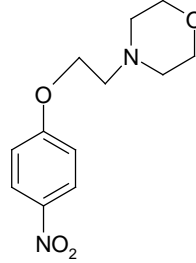
Kullanılan kimyasal maddeler: **a.** KOH, EtOH, oda sıcaklığı, 30 dakika **b.** 4-(2- kloroetil) morfolin, toluen, reflaks, 24 saat **c.** Pd/C/H₂, EtOH/ H₂O, oda sıcaklığı, 1 saat **d.** NaNO₂, HCl/ H₂O, 0 °C, 50 dakika **e.** etil 2-metil asetoasetat, NaOAc, EtOH, 0 °C-oda sıcaklığı, 3 saat **f.** EtOH/H₂O, reflaks, 40 dakika **g.** NaOH, MeOH/H₂O, reflaks, 3 saat, MeOH/HCl.

Potasyum 4-Nitrofenoksi (55)



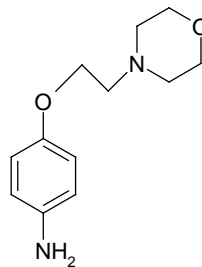
Etanol (30 mL) içerisindeki potasyum hidroksit çözeltisi (5.16 g, 100 mmol, 1 eq), etanol (20 mL) içerisindeki 4-Nitrofenol (**54**, 14 g, 100 mmol, 1 eq) çözeltisine eklendi. Oda sıcaklığında yarım saat karıştırıldıktan sonra sarı-turuncu potasyum 4-nitrofenoksi tuzu (**55**) elde edildi. Elde edilen potasyum 4-nitrofenoksit tuzu süzüldü ve soğuk etanol (10 mL) ile yıkandı ve kurutuldu (13.4 g, % 76.0). E.N. > 300 °C. ¹H NMR (400Mz, D₂O): δ =6.41 (d, *J* 1,9 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.95 (d, *J* 2.3 Hz, 2H, 3-H, 5-H) ppm.

4-[2-(4-Nitrofenoksi)etil]morfoline (56)



Potasyum 4-Nitrofenoksi tuzu (**55**; 7.10 g, 40 mmol, 1.0 eq) toluen (100 mL) içerisinde çözüldü ve üzerine, toluen (100 mL) içerisindeki 4-(2-kloroetil)morfolin (6.50 g, 43 mmol, 1.1 eq) çözeltisi eklendi. Karışım 24 saat reflaks edildi. Oda sıcaklığına soğuduktan sonra oluşan kristaller filtre edildi, toluenle yıkandı ve filtrat vakum altında konsantre edilerek açık sarı katı 4-[2-(4-Nitrofenoksi)etil]morfoline (**56**; 7.2 g, % 57) elde edildi. $R_f = 0.67$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.52-2.61$ (m, 4H, 3-H₂, 5-H₂), 2.86 (t, J 5.6 Hz, 2H, 1'-H₂), 3.59-3.76 (m, 4H, 2-H₂, 6-H₂), 4.21 (t, J 5.6 Hz, 2H, 2'-H₂), 6.96-6.99 (m, 2H, 2''-H, 6''H), 8.20-8.24 (m, 2H, 3''-H, 5''H) ppm.

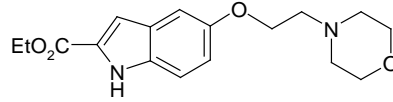
4-[2-Morfolin-4-il)etoksifenil]amin (57)



4-[2-(4-Nitrofenoksi)etil]morfoline (**56**, 3.0g, 23.8 mmol) bileşiğinin %95 (40 mL) etanol içerisindeki çözeltisi Pd/C (% 10, 175 mg) katalizörlüğünde 1 saat boyunca 58 psi basınçta H₂ gazı ile, oda sıcaklığında, hidrojenlendi. Oluşan katı celite üzerinden

süzüldü, celite sırasıyla EtOH (100 mL) ve MeOH (50 mL) ile yıkandı. Filtrat vakum altında kurutularak kırmızı kahve yağimsı 4-[2-Morfolin-4-il)etoksifenil]amin (**57**; 2.6 g, kant.) bileşiği elde edildi. $R_f = 0.54$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.56$ (m, 4H, 3''-H₂, 5''-H₂), 2.76 (t, J 5.8 Hz, 2 H, 2'-H₂), 3.35 (br. s, 2 H, NH₂), 3.73 (m, 4H, 2''-H₂, 6''-H₂), 4.03 (t, J 5.8 Hz, 2 H, 1'-H₂), 6.61-6.64 (m, 2 H, 2-H, 6-H), 6.73-6.76 (m, 2 H, 3-H, 5-H) ppm.

Etil 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilat (**58**)

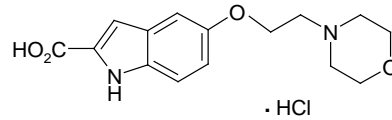


4-[2-Morfolin-4-il)etoksi fenil]amin (**57**, 2.0 g, 9 mmol, 1.0 eq) bileşiğinin su (19 mL) ve konsantre HCl (6mL) içerisinde 0°C' de karışan çözeltilisine, NaNO_2 ' nin (0.68 g, 9,75 mmol, 1.1 eq) su (1.9 mL) içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edildi ve oluşan karışım 0°C' de 30 dakika karıştırıldı (**A çözeltisi**). EtOH (14.5 mL) içerisindeki NaOAc (7.65 g, 93 mmol, 9.8 eq) çözeltisine, Etil 2-metilasetoasetat (1.35 mL, 9.45 mmol, 1.0 eq) damla damla ilave edildi. Bu sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldıktan sonra, buz (9 g) ilave edildi (**B Çözeltisi**). Daha sonra A çözeltisi bir kanül yardımı ile B çözeltisine 0°C'de transfer edildi, karışım oda sıcaklığına getirildi ve yaklaşık 2,5 saat karıştırıldı. Daha sonra, reaksiyon karışımı 0°C' de doymuş Na_2CO_3 çözeltisi ile bazifiye edildi ve CH_2Cl_2 (3x100 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar su (2x100 mL) ile yıkandı, MgSO_4 ile kurutuldu ve çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Kalan kısım susuz EtOH (7.5 mL) içerisinde çözüldü ve taze hazırlanmış susuz EtOH içerisindeki doymuş HCl çözeltisi (7.5 mL) ile etkileştirildikten sonra, 40 dakika riflaks edildi. Oda sıcaklığına soğuduktan sonra çözücüsü uçurulduktan sonra kalan kısım, su (25 mL) ve CH_2Cl_2 (100 mL) karışımında ekstrakte edildi. Su fazı doymuş Na_2CO_3 çözeltisi ile bazifiye edildikten sonra CH_2Cl_2 (3x100 mL) ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar doymuş tuz (200 mL) ile yıkandı, MgSO_4 ile kurutuldu ve çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Silika jelde kolon

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

kromatografisi (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1) yapıldıktan sonra, *i*Pr₂O ile kristallendirilerek sarı renkli Etil 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilat (**58**; 1 g, % 36) elde edildi. $R_f = 0.45$ (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.41$ (t, J 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.61 (m, 4H, 3''-H₂, 5''-H₂), 2.84 (t, J 5.7 Hz, 2 H, 2'-H₂), 3.76 (m, 4H, 2''-H₂, 6''-H₂), 4.15 (t, J 5.7 Hz, 2H, 1'-H₂), 4.40 (q, J 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 6.99 (dd, J 9.0 Hz, 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 7.08 (d, J 2.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.13 (d, J 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 7.30 (d, J 9.0 Hz, 1 H, 7-H), 9.13 (br. s, 1H, NH) ppm.

5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**)



5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilat (**58**, 730 mg, 2.3 mmol, 1 eq) MeOH (6 mL) içerisindeki süspansiyonu, NaOH' ın (110 mg, 2.7 mmol, 1.17 eq) su (4 mL) içerisindeki çözeltisi ile etkileştirildi ve 3 saat riflaks edildi. Oda sıcaklığına getirildikten sonra, 1 M HCl ile pH 6 olarak ayarlandı ve çözücüsü uçuruldu. Kalan kısım metanolde (5 mL) çözüldü, damla damla 1 M HCl ilave ederek kahverengi katı 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) çöktürüldü. Süzüntü evapore edildikten sonra silika jelde kolon kromatografisi (MeOH, % 1 kons. HCl) ile kalan 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) elde edildi. $R_f = 0.56$ (MeOH, % 1 kons. HCl) ¹H NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 3.07$ - 3.61 (m, 6H, 2'-H₂, 3''-H₂, 5''-H₂), 3.76- 4.06 (m, 4H, 2''-H₂, 6''-H₂), 4.43 (t, J 5.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 6.98 (dd, J 8.9 Hz, 2.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.01 (d, J 1.8 Hz, 1 H, 3-H), 7.20 (d, J 2.3 Hz, 1 H, 4-H), 7.37 (d, J 8.9 Hz, 1 H, 7-H), 11.39 (br. s, 1H, NH⁺), 11.65 (s, 1H, NH), 12.85 (br. s, 1H, CO₂H) ppm.

4.2. DNA Kesim Çalışmaları

Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının DNA kesim çalışmaları Agaroz Jel Elektrofrez tekniği ile pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) ve Calf Thymus DNA (8-15 kb) kullanılarak Cu²⁺ varlığında ve yokluğunda belirlendi.

Tüm reaksiyonlar 0,5 mL Eppendorf tüp içerisinde, fosfat tamponunda (14.29 mM NaCl, 7.14 mM fosfat, pH 7.4) ve karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında 1, 8 ve 24 saatte gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinden sonra numunelere % 50 gliserollü yürütme tamponu (3 µL; % 0.1 brom fenol mavisi, 150 mM EDTA, 2 mM Tris içerisinde % 1 SDS, 1 mM asetat, pH 8) ilave edildi ve sulu etidyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) içeren agaroz jele (plazmid DNA için %1, Calf Thymus DNA için % 0.7) yüklendi. Elektrofrez 60 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 90 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi.

4.2.1. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (1), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (2), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (3) ligantlarının pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkileri

Sentezlenen ligantların (1), (2), (3) plazmid DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (1) farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.1.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.2.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve 1 içerir.

Altıncı, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (2) farklı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.1.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.2.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **2** içerir.

Onuncu, onbirinci, onikinci ve onüçüncü kuyucuklar 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorürün (**3**) farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.1.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.2.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **3** içerir.

Ondördüncü kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

4.2.2. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) ligantlarının Cu²⁺ varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkileri

Sentezlenen ligantların (**1**), (**2**), (**3**) Cu²⁺ varlığında plazmid DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**1**), Cu²⁺ varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.3.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.4.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **1** içerir.

Altıncı Yedinci, sekizinci ve dokuzuncu kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1H-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**2**), Cu²⁺ varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.3.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.4.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **2** içerir.

Onuncu, onbirinci, onikinci ve onüçüncü kuyucuklar 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1H-indole-2-karboksilik asit hidroklorürün (**3**), Cu²⁺ varlığında, farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 µM, Resim 4.3.; 250, 500, 750, 1000 µM, Resim

4.4.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve **3** içerir.

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

Onbeşinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

4.2.3. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) ligantlarının pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkilerine radikal söndürücülerin etkisi.

DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini analiz etmek için değişik spesifik radikal söndürücüler kullanılarak agaroz jel elektroforezi tekrarlandı. Süperoksit anyonu için TEMPO (50 mM), hidroksil radikalleri için tioüre (100 mM) ve DMSO (1 M), singlet oksijen için histidin (25 mM) konsantrasyonlarında çalışıldı (Resim 4.5.)

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**, 500 μM) içerir.

Üçüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 μM) ve histidin (50 mM) içerir.

Dördüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 μM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Beşinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 μM) ve tioüre (25 M) içerir.

Altıncı kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 μM) ve DMSO (1 M) içerir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yedinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**, 500 µM) içerir.

Sekizinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM) ve histidin (50 mM) içerir.

Dokuzuncu kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Onuncu kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM) ve tioüre (25 M) içerir.

Onbirinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM) ve DMSO (1 M) içerir.

Onikinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**, 500 µM) içerir.

Onüçüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM) ve histidin (50 mM) içerir.

Ondördüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Onbeşinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM) ve tioüre (25 M) içerir.

Onaltıncı kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM) ve DMSO (1 M) içerir.

4.2.4. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) ligantlarının Cu²⁺ varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA kesim etkilerine radikal söndürücülerin etkisi

Cu²⁺ varlığında, DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini analiz etmek için dizayn edilen deneyde, bakır yokluğunda yapılan deney Cu²⁺ varlığında tekrar edildi (resim 4.6.).

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**, 500 µM) ve Cu²⁺ (500 µM) içerir.

Üçüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve histidin (50 mM) içerir.

Dördüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Beşinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve tioüre (25 M) içerir.

Altıncı kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **1** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve DMSO (1 M) içerir.

Yedinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**, 500 µM) ve Cu²⁺ (500 µM) içerir.

Sekizinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve histidin (50 mM) içerir.

Dokuzuncu kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Onuncu kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve tioüre (25 M) içerir.

Onbirinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **2** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve DMSO (1 M) içerir.

Onikinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**, 500 µM) ve Cu²⁺ (500 µM) içerir.

Onüçüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve histidin (50 mM) içerir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Ondördüncü kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve TEMPO (100 mM) içerir.

Onbeşinci kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve tioüre (25 M) içerir.

Onaltıncı kuyucuk pBluescript M13+ plazmid DNA, **3** (500 µM), Cu²⁺ (500 µM) ve DMSO (1 M) içerir.

4.2.5. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) ligantlarının Calf Thymus DNA kesim etkileri

Sentezlenen ligantların (**1**), (**2**), (**3**) Calf Thymus DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript Calf Thymus DNA içeren kontroldür.

İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**1**) farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.7.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **1** içerir.

Altıncı, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**2**) farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.7.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **2** içerir.

Onuncu, onbirinci, onikinci ve onüçüncü kuyucuklar 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorürün (**3**) farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µM, Resim 4.7.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **3** içerir.

Ondördüncü kuyucuk sadece Calf Thymus DNA içeren kontroldür.

4.2.6. Sentezlenen 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**1**), 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorür (**2**), 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorür (**3**) ligantlarının Cu^{2+} varlığında Calf Thymus DNA kesim etkileri

Sentezlenen ligantların (**1**), (**2**), (**3**) Cu^{2+} varlığında Calf Thymus DNA kesim etkileri incelenirken kuyucuk içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Birinci kuyucuk sadece Calf Thymus DNA içeren kontroldür.

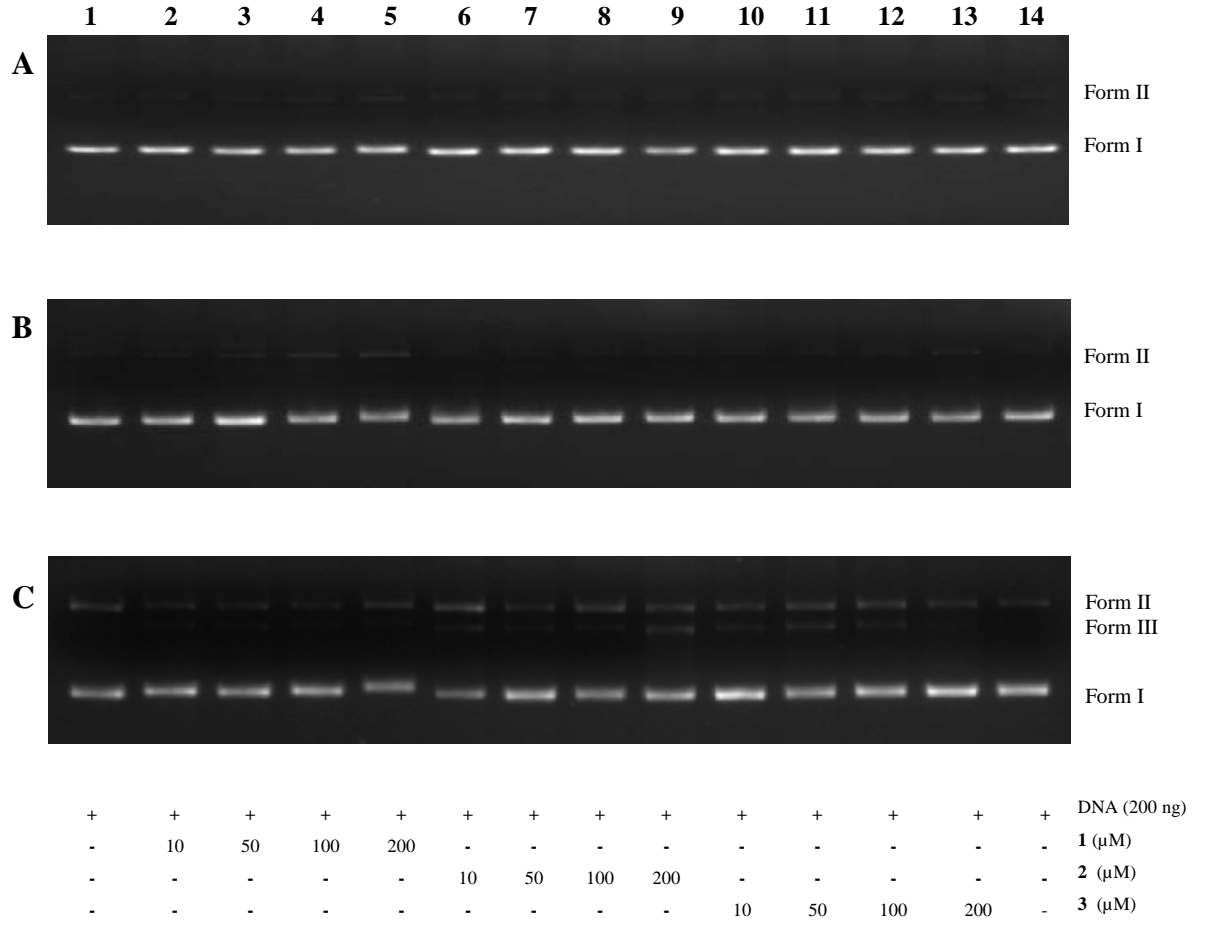
İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)etoksi]-6-metoksi-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**1**), Cu^{2+} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 μM , Resim 4.8.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **1** içerir.

Altıncı, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu kuyucuklar 5-[2-(Dimetilamino)asetilamino]-1*H*-indol-2-karboksilik asit hidroklorürün (**2**), Cu^{2+} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 μM , Resim 4.8.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **2** içerir.

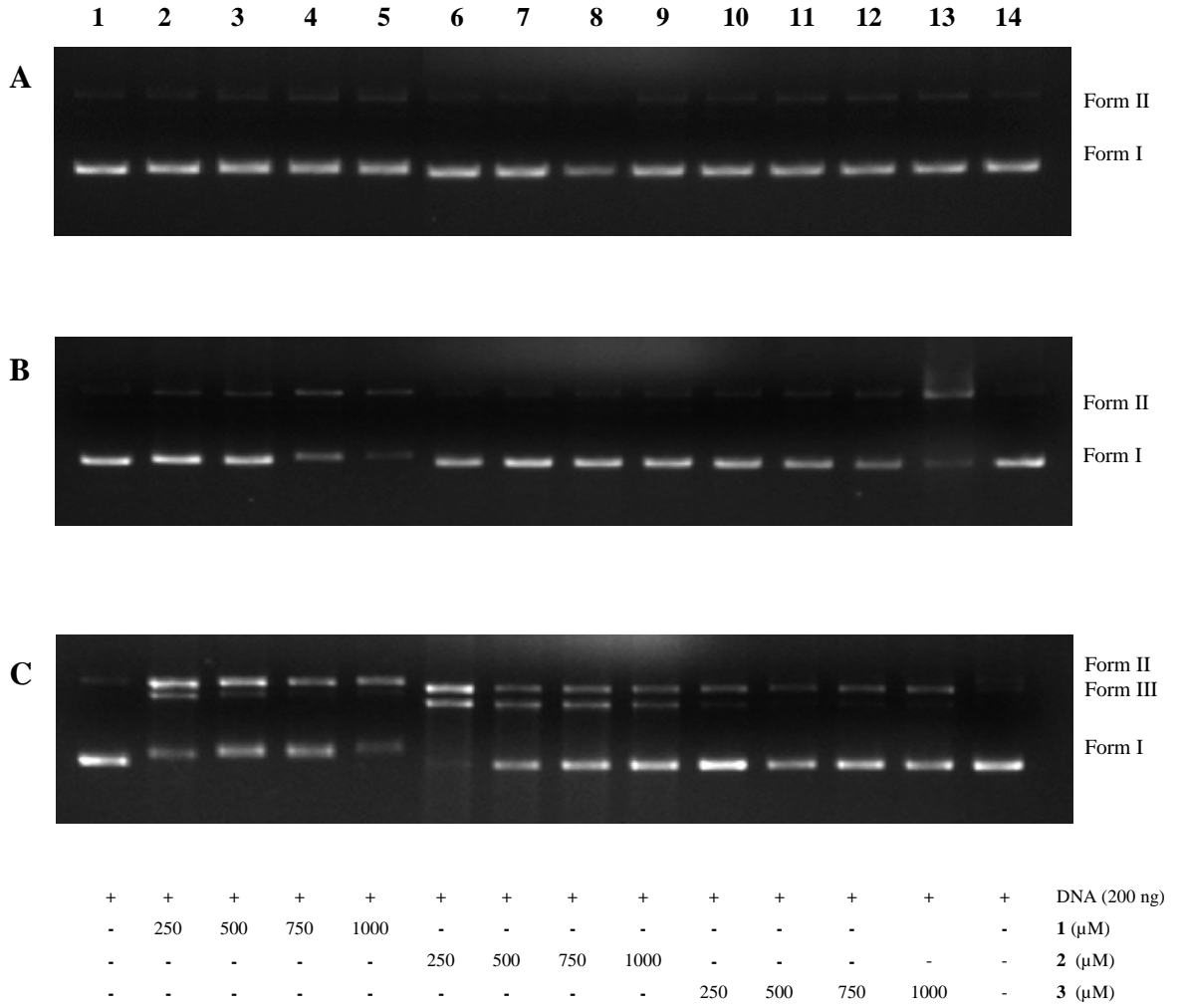
Onuncu, onbirinci, onikinci ve onüçüncü kuyucuklar 5-[2-Morfolin-4-il)etoksi]-1*H*-indole-2-karboksilik asit hidroklorürün (**3**), Cu^{2+} varlığında, farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 μM , Resim 4.8.) DNA kesim etkisini incelemek için tasarlandı. Calf Thymus DNA ve **3** içerir.

Ondördüncü kuyucuk Cu^{2+} nin tek başına DNA üzerine etkisini incelemek için dizayn edilen kontroldür. Calf Thymus DNA ve CuCl_2 içerir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

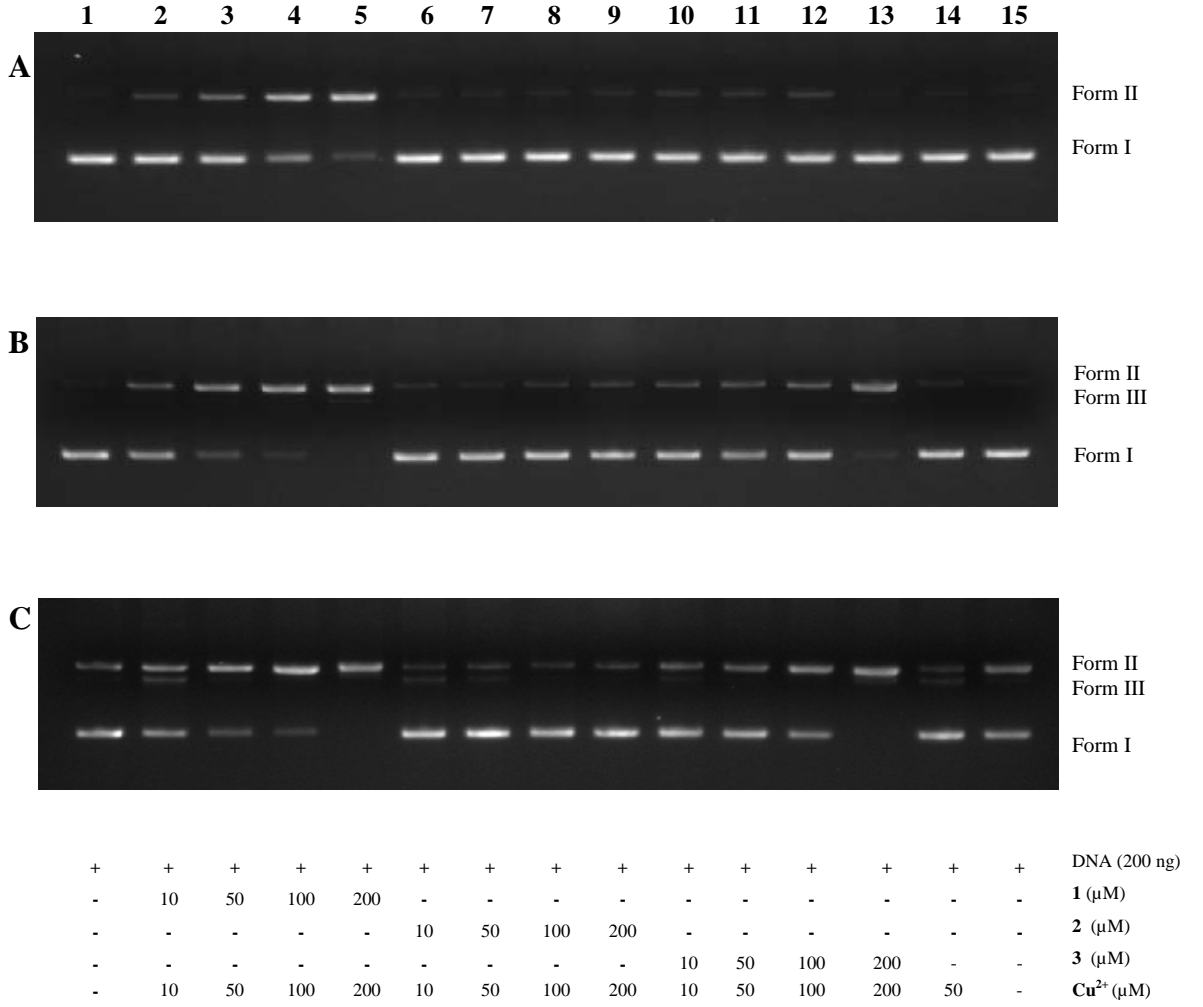


Resim 4.1. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), **(1)**, **(2)** ve **(3)** ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi (İnkübasyon süreleri A: 1 saat, B: 8 saat, C: 24 saat.)

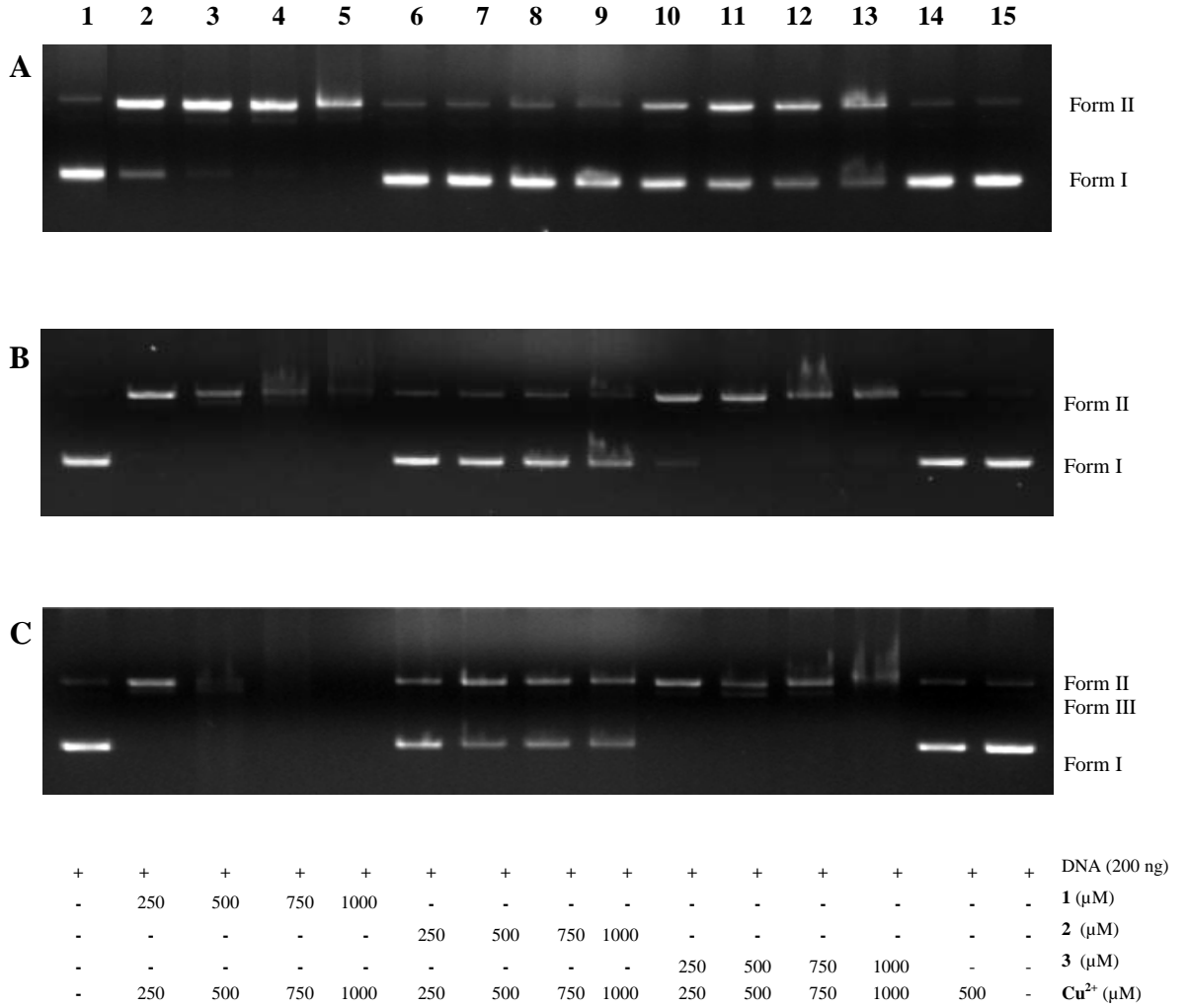


Resim 4.2. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonununun Agaroz Jel Elektrofrezisi (İnkübasyon süreleri A: 1 saat, B: 8 saat, C: 24 saat).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

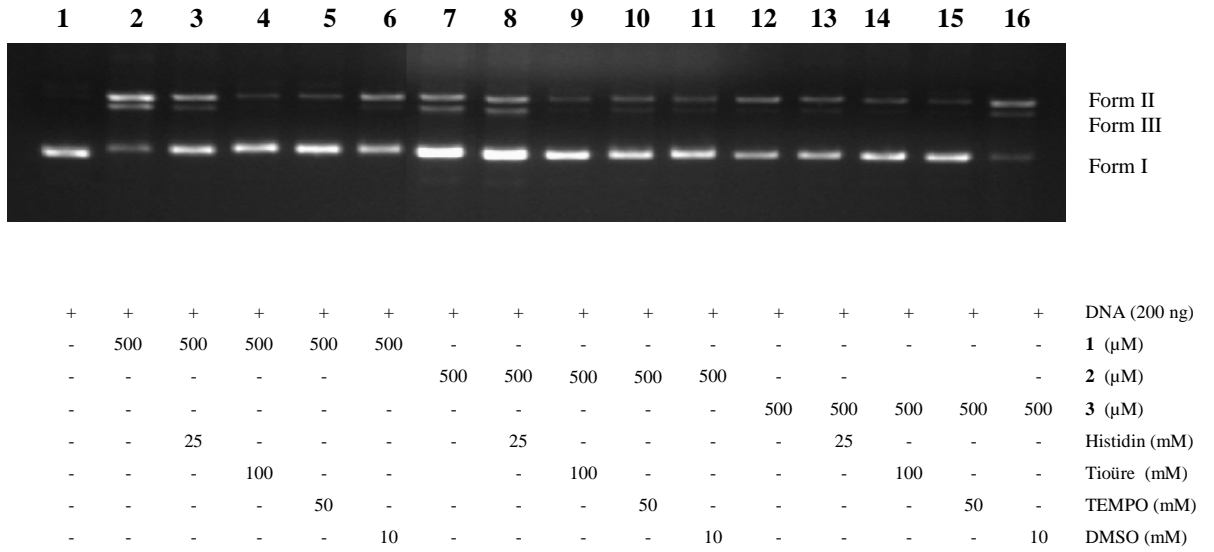


Resim 4.3. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi (İnkübasyon süreleri A: 1 saat, B: 8 saat, C: 24 saat).

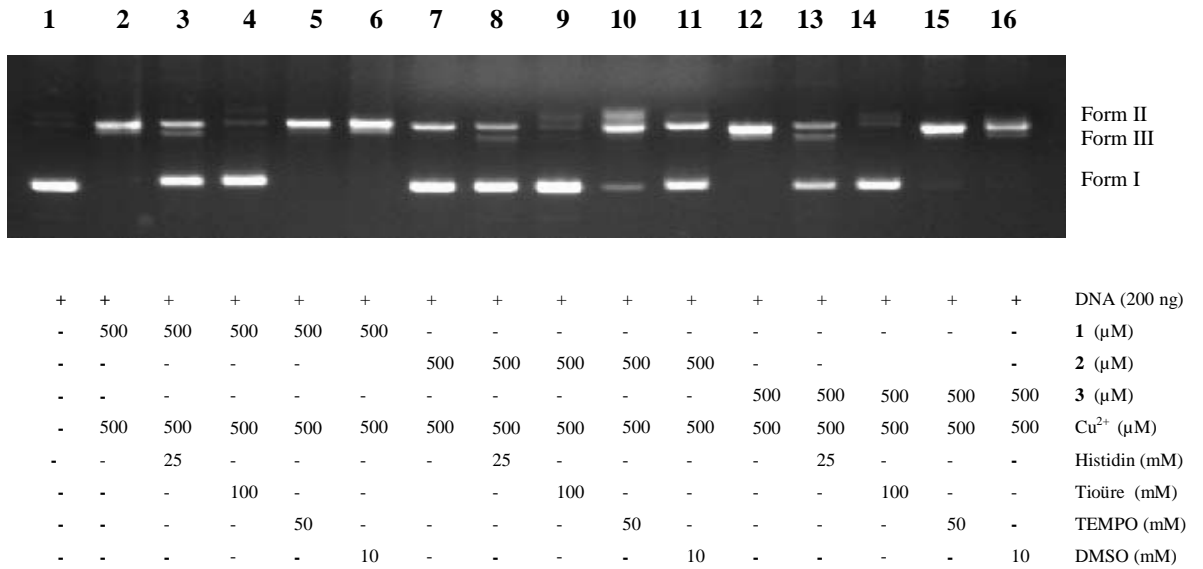


Resim 4.4. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi (İnkübasyon süreleri A: 1 saat, B: 8 saat, C: 24 saat).

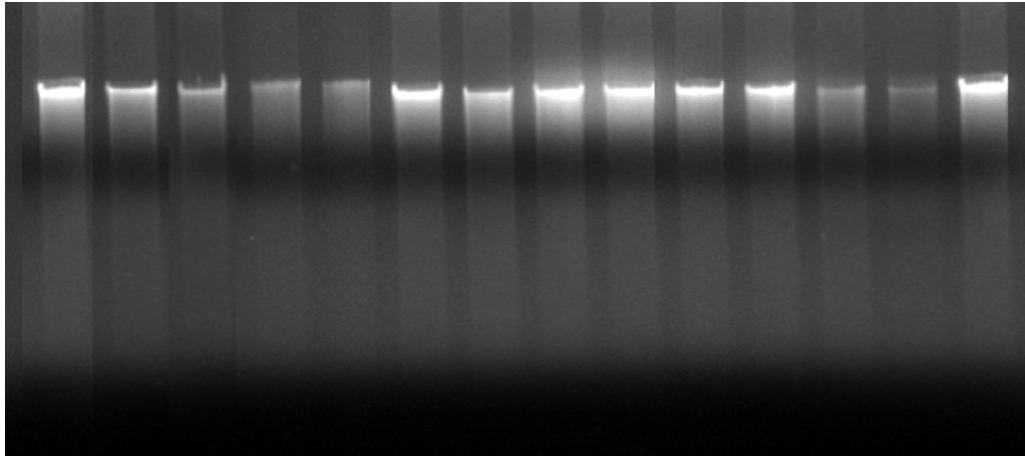
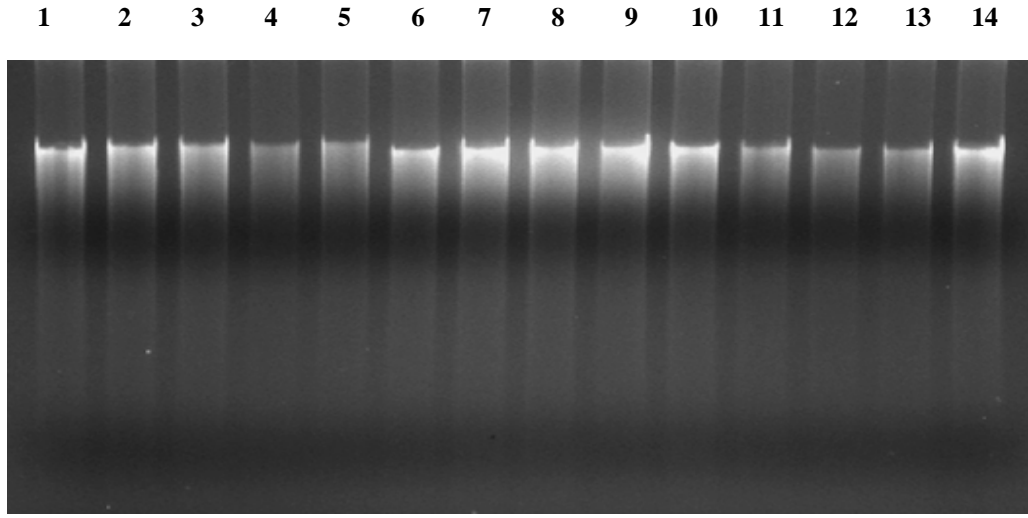
4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Resim 4.5. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonuna bazı radikal söndürücülerin etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi (İnkübasyon süresi: 24 saat)



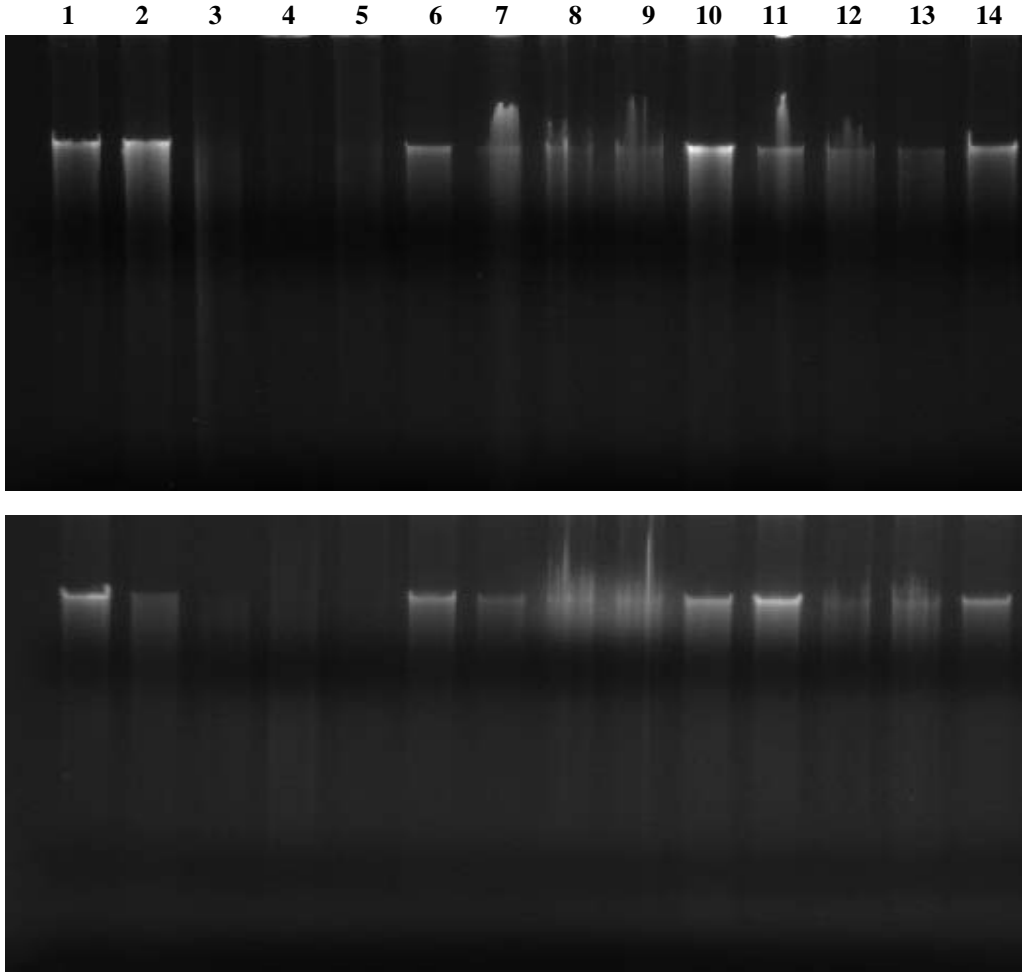
Resim 4.6. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında (1), (2) ve (3) ile kesim reaksiyonuna bazı radikal söndürücülerin etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi (İnkübasyon süresi: 24 saat).



+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DNA (300 ng)
-	250	500	750	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (μ M)
-	-	-	-	-	250	500	750	1000	-	-	-	-	-	2 (μ M)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	500	750	1000	-	3 (μ M)

Resim 4.7. Calf Thymus DNA'nın, **(1)**, **(2)** ve **(3)** ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi (İnkübasyon süreleri A: 24 saat, B: 32).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI



+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DNA (300 ng)
-	250	500	750	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (µM)
-	-	-	-	-	250	500	750	1000	-	-	-	-	-	-	2 (µM)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	500	750	1000	-	-	3 (µM)
-	250	500	750	1000	250	500	750	1000	250	500	750	1000	500	-	Cu ²⁺ (µM)

Resim 4.8. Calf Thymus DNA'nın, (1), (2) ve (3) ile bakır (II) klorür varlığında kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi (İnkübasyon süreleri A: 24 saat, B: 32).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

C-5 pozisyonunda dimetilaminoetoksi grubu ve C-6 pozisyonunda metoksi grubu içeren, indol karboksilik asit **1**, indol halkasının oluşması için, Hemetsberger metodu takip edilerek hazırlandı (Şekil 3.1.). Bunun için, benzaldehit **46** 1,2 dikloroetan ile potasyum karbonat varlığında O-alkillenerek **47** elde edildi. **47** bileşiğinde, metil α -azidoasetat ile sodyum metoksit baz olarak kullanılarak -azidocinnamate **48** elde edildi. **48**, 115 °C de dört saat karıştırılarak indol karboksilik asit türevi **49**, **45**'ten elde edildi. **49**'daki metilester kısmının hidrolizini takiben dimetil amin ile kloro grubunun nükleofilik sübsitasyonu ile dizayn edilen indol karboksilik asit türevi **1** iki basamakta sentezlendi.

N,N-dimetilglisin grubu içeren, indol karboksilik asit **2** sentezine ticari olarak temin edilen ester **51**'den başlandı (Şekil 3.2.). **51**'deki nitro grubu Pd/C katalizörlüğünde hidrojenlenerek kararsız amin **52** elde edildi. Daha sonra, amin **52**, *N,N*-dimetilglisin hidroklorür ile *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC.HCl) varlığında birleştirilerek amid **53** iki basamakta elde edildi. Son olarak, elde edilen amitteki (**53**) ester kısmı, amit fonksiyonel grubunun hidrolizini önlemek için LiOH ile, THF/metanol/su içerisinde hidrolizlenerek, dizayn edilen asit **2** kantitatif verimle elde edildi.

Morfolinetoksi sübstienti içeren, indol karboksilik asit **3**, anilin **57**'den Japp-Klingemann tipi Fischer indol sentezini takiben oluşan ester **58**'in hidrolizlenmesi ile % 65 verimle dört basamakta hazırlandı (Şekil 3.3.). 4-nitrofenolün (**54**) 4-(2-kloroetil)-morfolin ile alkilasyonu sonucu nitro bileşiği **56** elde edildi. Elde edilen nitro bileşiğinin (**56**) Pd/C katalizörlüğünde indirgenmesi sonucu ile **54**'ten anilin **57** elde edildi.

Sentez çalışmaları tamamlandıktan sonra DNA kesim çalışmaları yapıldı. DNA kesim çalışmaları için *E. coli* bakterisinden izole edilen pBluescript M13+ plazmid DNA ve Calf Thymus DNA kullanılarak DNA jel elektroforezi deneyi yapıldı. Sentezlenen ligantların Kesim etkileri Cu^{2+} varlığında ve yokluğunda çalışıldı.

Ligantların (1-3) DNA kesim çalışmaları Cu^{2+} varlığında (Resim 4.3 ve 4.4.) ve yokluğunda (Resim 4.1. ve 4.2) Agaroz jel elektroforezi ile pBluescript m13+ plazmid DNA kullanılarak yapıldı ve konsantrasyona bağlı olarak supercoiled plazmid DNA'yı open circular veya liner forma dönüştüğü gözlemlendi. Sentezlenen ligandların kesim

çalışmaları, 10-200 µM konsantrasyon aralığında, ligandlar (1-3) ile DNA 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra elektroforez yapıldı ve kayda değer bir sonuç elde edilemeyince inkübasyon süresi arttırılarak (8 ve 24 saat) deney tekrarlandı ve zamana bağlı olarak DNA kesiminin arttığı gözlemlendi. Konsantrasyon arttırılınca kesimde nasıl bir değişiklik olacağını test etmek için deney 250-1000 µM konsantrasyon aralığında 1, 8 ve 24 saat inkübasyona bırakılarak tekrar edildi ve DNA kesiminin ligand konsantrasyonu ve reaksiyon süresi ile paralel olarak arttığı gözlemlendi (Resim 4.1, 4.2., 4.3., 4.4. A, B, C).

C-5 pozisyonunda dimetilaminoetoksi grubu ve C-6 pozisyonunda metoksi grubu içeren, indol karboksilik asidin (1) tek başına düşük konsantrasyonda (10, 50, 100, 200 µM) DNA'yı kesme etkisinin az olduğu fakat artan inkübasyon sürelerine (1, 8 ve 24 saat) bağlı olarak kesimin arttığı gözlemlendi (Resim 4.1, A, B, C, Kuyucuk 2-5). Aynı deneyler yüksek konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µM) tekrarlandığında kesimin hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak arttığı (Resim 4.2, A, B, C; Kuyucuk 2-5) belirlendi. Ligandın (1) Cu²⁺ varlığında kesim etkisi çalışıldığında, kesim etkisinin ligandın tek başına gösterdiğinden daha fazla olduğu ve hem artan konsantrasyona hem de artan inkübasyon süresine bağlı olarak arttığı gözlemlendi (Resim 4.3, A, B, C; Kuyucuk 2-5 ve Resim 4.4, A, B, C; Kuyucuk 2-5). 200 µM konsantrasyonda 18 ve 24 saatte supercoiled formun (SC, Form I) tamamının open circular (OC, Form II) veya liner (L, Form III) forma dönüştüğü tespit edildi (Resim 4.33, B, C, Kuyucuk 5). 500-1000 µM konsantrasyon aralığında 1 saatte supercoiled formun tamamının OC (Form II) dönüştüğü (Resim 4.4, A, Kuyucuk 3-5), inkübasyon süresi arttırıldığında ise SC (Form I) formun çok küçük fragmentlere parçalandığı gözlemlendi (Resim 4.4, B, C; Kuyucuk 3-5).

N,N-dimetilglisin grubu içeren, indol karboksilik asidin (2) tek başına düşük konsantrasyonda (10, 50, 100, 200 µM) 1 ve 8 saat inkübasyon süresinde plazmid DNA'yı kesim etkisinin yok denecek kadar az olduğu (Resim 4.1, A, B; Kuyucuk 6-9), 24 saatte ise plazmid DNA'yı kısmen kestiği gözlemlendi (Resim 4.1, C; Kuyucuk 6-9). Aynı deneyler yüksek konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µM) tekrarlandığında kesimin yine 1 ve 8 saat inkübasyon süresinde yok denecek kadar az olduğu, 24 saat inkübasyonda kesimin gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.2, A, B, C; Kuyucuk 6-9).

Ligandın (2) Cu^{2+} varlığında kesim etkisi incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda kesimin 1 ve 8 saatte az olduğu (Resim 4.3, A, B; Kuyucuk 6-9), 24 saatte ise kısmen (OC, Form II) ve liner (L, Form III) forma dönüşümün gerçekleştiği görülmektedir (Resim 4.3, A, B; Kuyucuk 6-9). Yüksek konsantrasyonda ise kesimin konsantrasyon ve zamana paralel olarak arttığı gözlemlendi (Resim 4.4, A, B, C; Kuyucuk 6-9). Ligandın (2) kesim etkisinin diğer lidantlara (1, 3) oranla daha az olduğu belirlendi.

Morfolinetoksi sübstienti içeren, indol karboksilik asit 3 tek başına düşük konsantrasyonda (10, 50, 100, 200 μM) DNA kesim etkisinin az olduğu fakat artan inkübasyon sürelerine (1, 8 ve 24 saat) bağlı olarak kesimin az da olsa arttığı gözlemlendi (Resim 4.1, A, B, C, Kuyucuk 10-13). Aynı deneyler yüksek konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 μM) tekrarlandığında 1 saatte kesimin çok az olduğu (Resim 4.2, A; Kuyucuk 10-13), 8 saatte 1000 μM konsantrasyonda ligandın etkili olduğu (Resim 4.2, B; Kuyucuk 13), 24 saatte ise tüm konsantrasyonlarda kesimin olduğu gözlemlendi (Resim 4.2, C; Kuyucuk 10-13). Aynı deneyler Cu^{2+} varlığında tekrarlandığında 1 saatte kesimin çok az olduğu (Resim 4.3, A; Kuyucuk 10-13), 8 ve 24 saatte ise özellikle 1000 μM konsantrasyonda kesimin arttığı (Resim 4.3, B, C; Kuyucuk 13), tüm SC formun OC ve L forma veya daha küçük fragmentlere parçalandığı gözlemlendi.

DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin etkisini analiz etmek için değişik spesifik radikal söndürücüler kullanılarak agaroz jel elektroforezi tekrarlandı. Süperoksit anyonu için TEMPO (50 mM), hidroksil radikali için tioure (100 mM), ve DMSO (1M), singlet oksijen için histidin (25 mM) konsantrasyonlarında çalışıldı.

pBluescript m13+ plazmid DNA kullanılarak kesim reaksiyonlarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşup oluşmadığını ve bu oluşan reaktif oksijen türlerinin kesim mekanizmasındaki rollerini tespit etmek için ligantların (1-3) bakır varlığında ve yokluğunda DNA kesim etkisi üzerine radikal söndürücüler kullanılarak deneyler, DNA kesiminin anlamlı olduğu 500 mM konsantrasyon ve 24 saat inkübasyon süresinde tekrarlandı. Bakır yokluğunda histidin (Kuyucuk 3, 8, 13) DNA kesimini büyük çoğunlukla, tiourenin (Kuyucuk 4, 9, 14) ve TEMPO'nun (Kuyucuk 5, 10, 15) kesimin tamamına yakını ve DMSO'nun (Kuyucuk 6, 11, 16) ise kesimi kısmen inhibe ettiği gözlenmiştir (Resim 4.5). Bakır varlığında ise histidin (Kuyucuk 3, 8, 13), DNA

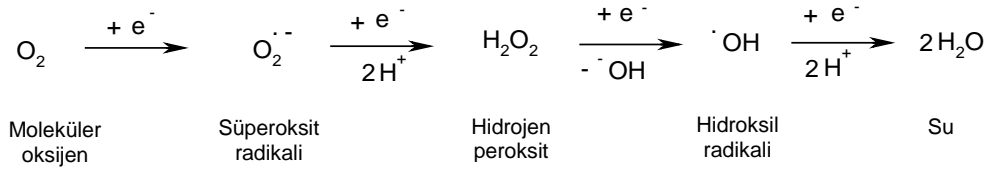
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

kesimini büyük çoğunlukla, tiyoürenin (Kuyucuk 4, 9, 14), kesimin tamamına yakını TEMPO'nun (Kuyucuk 5, 10, 15) ve DMSO'nun (Kuyucuk 6, 11, 16) ise kesimi kısmen inhibe ettiği gözlenmiştir (Resim 4.6.). Bu sonuçlar kesimde hem singlet oksijen hemsüperoksit radikali hem de hidroksil radikallerinin etkili olabileceğini göstermiştir. Oluşan hidroksil radikalının DNA şekerinden hidrojen atomu kopararak DNA kesimine sebep olduğu düşünülmektedir (Şekil 5.3.).

Bu reaktif oksijen türleri, moleküler oksijenin, biradikal doğasının sonucu yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğiliminde olmasından dolayı oluşur ve DNA şekerinden hidrojen atomu kopararak ya da DNA bazlarıyla etkileşerek zincir kesimine ya da alkilasyona sebep olur.

Reaktif oksijen türleri, atom veya molekül olabilir ve en az bir çiftleşmemiş elektron içerirler, son derece reaktif olup kısa ömürlüdürler.

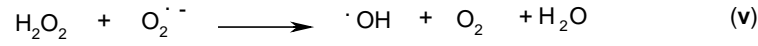
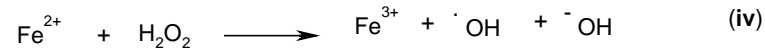
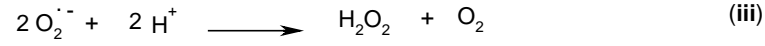
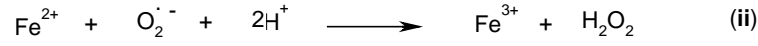
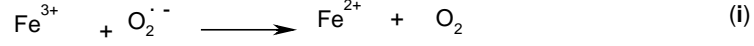
Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Oksijenin ard arda indirgenmesi sonucu oksijen kaynaklı iki serbest radikal, süperoksit ve hidroksil radikali, nispeten daha kararlı ara ürün olan peroksit (H_2O_2) ve zararsız son ürün su oluşur (şekil 5.1.).



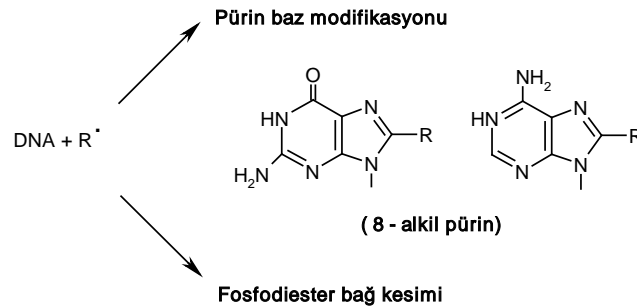
Şekil 5.1. Moleküler oksijenin indirgenmesi.

Oksijen kaynaklı olan süperoksit radikali oksijene bir elektron transferi sonucu oluşur. Süperoksit bir indirgen ajan olarak davrandığında oksijene dönüşür (i). Süperoksit oksitleyici ajan olarak davrandığında hidrojen peroksit oluşur (ii). Süperoksitin self-redoks reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit oluşur (iii). Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına rağmen oksiradikal kimyada ve patolojide önemli bir maddedir. Çünkü kendisi diğer zararlı oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşmasını sağlar. Hidrojen peroksit Fe^{2+} ile reaksiyona girerek OH radikalini oluşturur, bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinir (iv).

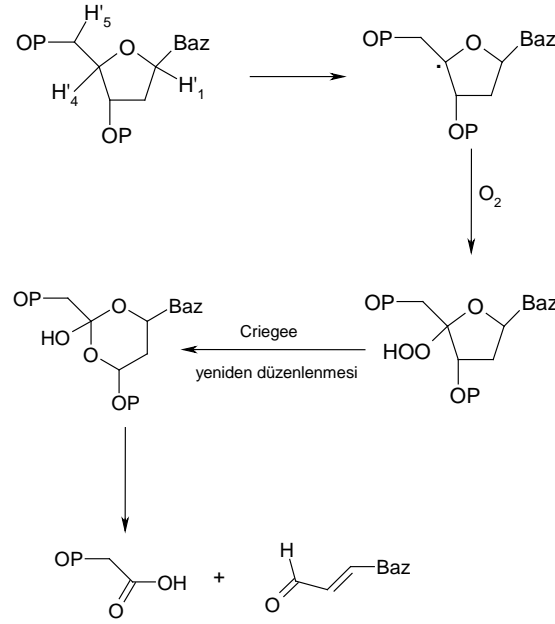
Hidroksi radikali aynı zamanda demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu sonucu da oluşturulabilir (v). Harber-Weiss reaksiyonu, Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumu (iv) ve süperoksit ile Fe^{3+} 'ün indirgenmesi (i) reaksiyonlarını içerir.



Hidroksil radikali elektrofilik ve çok reaktif bir radikaldir. Hidrojen atomuna etkili biçimde ($k=10^9 M^{-1}s^{-1}$) saldırabilir, ayrıca çift bağa da hızlıca ($k=10^{10} M^{-1}s^{-1}$) bağlanabilir. DNA'da bulunan fosfat grupları ile reaksiyonu ise yavaştır ($k<10^7 M^{-1}s^{-1}$). Dolayısıyla, hidroksil radikali DNA şekerinden hidrojen atomu kopararak ya da DNA bazlarıyla etkileşerek zincir kesimine ya da alkilasyona sebep olur (Şekil 5.2.). DNA şekerinden hidrojen atomu koparılması DNA şeker fosfat belkemiğinin kesimi ile sonuçlanır. 4' pozisyonundan hidrojen atomu koparılması ile sonuçlanan DNA kesimi için olası mekanizma şekil 5.2.'de gösterilmiştir (Breen 1995).



Şekil 5.2. Radikaller ile oluşan DNA modifikasyon şeması.



Şekil 5.3. DNA şekerinden 4' pozisyonundan hidrojen atomu koparılması

Ligantların (**1-3**) Cu^{2+} varlığında (Resim 4.8.) ve yokluğunda (Resim 4.7.) Agaroz jel elektroforezi ile Calf Thymus DNA'yı kesim etkisi hem konsantrasyona (250, 500, 750, 1000 μM) hem de zamana (24 ve 32 saat) bağlı olarak çalışıldı. Ligand **1** ve Ligand **3** Cu^{2+} yokluğunda konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DNA'da kesime sebep olurken (Resim 4.7, A, B; Kuyucuk 2-5 ve Kuyucuk 10-13) Ligand **2**'nin DNA kesiminde çok az etkisi olduğu (Resim 4.7, A, B; Kuyucuk 6-9) gözlemlendi. Cu^{2+} varlığında ise tüm ligandlar konsantrasyona ve zaman bağlı olarak DNA kesimine sebep olurken (Resim 4.8.), ligand **1**'in kesim etkisinin en fazla olduğu tespit edildi (Kuyucuk 2-5).

Bu çalışmada sentezlenen (+)-Duocarmycin antibiyotiği analoglarının bakır varlığında ve yokluğunda DNA kesimine sebep olduğu ayrıca bakır varlığında kesimin büyük ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. C-5 pozisyonunda dimetilaminoetoksi grubu ve C-6 pozisyonunda metoksi grubu içeren, indol karboksilik asit **1**'in hem bakır varlığında hem de bakır yokluğunda DNA kesiminde diğer ligantlara oranla daha etkili olduğu elektroforez sonuçlarından anlaşılmaktadır. Morfolinetoksi sübstienti içeren, indol karboksilik asit **3** de DNA kesiminde oldukça etkindir, N,N-dimetilglisin grubu içeren,

indol karboksilik asit **2**'nin kesim etkisi diğer ligantlara göre daha azdır. **1** nolu ligandın kesim etkisinin daha fazla olması, C-5 pozisyonunda bulunan dimetilaminoetoksi grubu ve C-6 pozisyonunda bulunan metoksi gruplarının DNA ile daha güçlü bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Pandya, 2010). Tüm ligandlarda bakır varlığında kesim arttığı tespit edilmiştir. Bazı kanser türlerinde, tümör hücrelerinde bakır miktarının sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında 2-3 kat daha fazla olması (Tablo 2.1.) sonucun önemini göstermektedir. Cu^{2+} varlığında ve Cu^{2+} yokluğunda DNA kesiminde değişik spesifik radikal söndürücüler ile reaktif oksijen türlerinin etkisi çalışıldığında plazmid DNA'nın büyük ölçüde korunduğu gözlemlenmiştir, bu sonuç sentezlenen indol karboksilik asitlerin serbest radikaller oluşturarak DNA kesimini gerçekleştirdiğini göstermektedir.

İndol karboksilik asitlerin DNA küçük oluşuna bağlandığı bilinmektedir (Pandya, 2010), bu çalışma ile DNA kesim etkileri de olduğu da tespit edilmiştir.

DNA kesiminde reaktif oksijen türlerinin etkisini araştırmak için reaksiyonlar histidin, tioure, TEMPO ve DMSO varlığında tekrarlandı ve bu radikal söndürücülerin DNA kesimini inhibe ettiği gözlemlendi. DNA kesim reaksiyonlarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluştuğu, DNA kesiminin histidin, tioure, TEMPO ve DMSO ile kısmen inhibe olmasından anlaşılmaktadır (Qian 2010; Fekry 2011).

Ligandların LogP değerleri ALOGPS 2.1 programı ile hesaplanmış (Tetko 2004); **1**, **2** ve **3** nolu ligandlar için sırasıyla 0.819, -0.005 ve 0.108 olarak bulunmuştur. Lipinski (Lipinski et al, 1997) tarafından önerilen kurala göre bir ilacın logP değeri -0.4 ile +5.6 arasında olması gerekmektedir. Ayrıca ligandların molekül ağırlıkları da Lipinski kuralı ile uyum içerisindedir.

Pfizer kuralları olarak da bilinen Lipinski kuralları, bir kimyasal bileşiğin farmakolojik veya biyolojik aktivitesine bağlı olarak, o kimyasal bileşiğin insanlarda oral aktif ilaç olabilirliğini açıklayan pratik bir kuraldır. 1997 yılında Christopher A. Lipinski tarafından formüle edilen bu kural, birçok tedavi edici ilacın genellikle küçük ve lipofilik olmasının gözlenmesi temeline dayanır.

Bu kural insan vücudunda ilaç farmakokinetiği için, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltımı da içine alan (ADME) moleküler özelliğin önemini açıklar.

Bununla birlikte, bu kural bileşiminin farmakolojik olarak aktif olup olmadığını öngöremez.

Lipinski kuralına göre bir ilaçta beş taneden fazla H bağı donörü veya 10 taneden fazla H bağı akseptörü varsa, ilacın moleküler ağırlığı 500 daltondan fazla ve logP değeri 5'ten büyükse, bu ilacın zayıf absorpsiyon ve geçirgenliğe sahip olacağı belirtilmiştir. Genellikle, oral olarak aktif ilaçların belirtilen bu kriterlerden birden fazlasını ihlal etmemesi gerekir.

Bu kural, ilaç keşfedilirken farmakolojik aktif öncü yapının basamak basamak aktivitesini ve seçiciliğini arttırmak için optimize edilirken dikkate alınması gereken önemli bir kuraldır. Lipinski kurallarına uyan ilaç adaylarının klinik denemelerde zayıf kalma riski düşüktür ve bundan dolayı piyasaya ulaşmada şansları yüksek olur. Ligandların LogP değeri bu aralıkta olması moleküllerin kimyasal nükleaz ve antikanser ajanı olarak kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

Bu çalışmaların devamı olarak, sentezlenen ligandların DNA bağlanma ilgileri için floresans spektroskopisi, termal denatürasyon, viskozimetrik çalışmalar ve sitotoksite çalışmaları için MTT deneyi yapılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Wlaler, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed. Garland Science, Pp: 120-121. New York, Amsterdam.
- Arcamone, F., Penco, S., Orezzi, P., Nicoletta, V., Pirelli, A. 1964. Structure and synthesis of distamycin. *Nature*, 4949: 1064-1065.
- Baguley, B.C., Falkenhaus, E.M. 1978. The interaction of ethidium with synthetic double-stranded polynucleotides at low ionic strength. *Nucleic Acids Research*, 5: 161-171.
- Baraldi, P.G., Bovero, A., Fruttarolo, F., Preti, D., Tabrizi, M.A., Pavani, M.G., Romagnoli, R. 2004. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Medicinal Research Reviews*, 24: 475-528.
- Baraldi, P.G., Preti, D., Fruttarolo, F., Tabrizi, M.A., Romagnoli, R. 2007. Hybrid molecules between distamycin A and active moieties of antitumor agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15: 17-35.
- Bailly, C., Graham, B.J., Manlio, P. 1998. Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by minor-groove binding conjugates structurally related to netropsin and distamycin, in: *Advances in DNA Sequence-Specific Agents*. Elsevier, Pp: 97-156.
- Begum, M.S.A., Saha, S., Hussain, A., Chakravarty, A.R. 2009. Synthesis, Crystal Structure and DNA Cleavage Activity of (aqua)bis(dipyridophenazine)copper(II) Complex. *Indian Journal of Chemistry*, 48A: 9-14.
- Beria, I., Baraldi, P.G., Cozzi, P., Caldarelli, M., Geroni, C., Marchini, S., Mongelli, N., Romagnoli, R. 2004. Cytotoxic α -halogenoacrylic derivatives of distamycin A and congeners. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47: 2611-2623.
- Bignell, G.R., Santarius, T., Pole, J.C.M., Butler, A.P., Perry, J., Pleasance, E., Greenman, C., Menzies, A., Taylor, S., Edkins, S., Campbell, P., Quail, M., Plumb, B., Matthews, L., McLay, K., Edwards, P.A.W., Rogers, J., Wooster, R., Futreal, P.A., Stratton, M.R. 2007. Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence level resolution. *Genome Research*, 17: 1296-1303.
- Birnboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 24: 1513-1523.
- Breen A.P., Murphy, J.A. 1995. Reactions of Oxyl Radicals With DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6): 1033-1077.
- Carpentieri, U., Myers, J., Thorpe, L., Daeschner, C.W., Haggard, M.E. 1986. Copper, zinc and iron in normal and leukemic lymphocytes from children. *Cancer Research*, 46: 981-84.
- Caponigro, F., Lorusso, D., Fornari, G., Barone, C., Merlano, M., Airoidi, M., Schena, M., MacArthur, R., Weitman, S., Jannuzzo, M., Crippa, S., Fiorentini, F., Petroccione, A., Comis, S., Phase I. 2010. Dose-escalation study of brostallicin, a minor groove binder, in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66: 389-394.
- Chaires, J.B. 2006. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453(1): 26-31.

Chargaff, E., Vischer, E., Doniger, R., Green, C., Misani, F. 1949. The composition of the desoxyribose nucleic acids of thymus and spleen. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 405-416.

Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C. 2002. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2: 563-572.

Chan, A., Wong, F., Arumanayagam, M. 1993. Serum ultrafiltrable copper, total copper and ceruloplasmin concentrations in gynecological carcinoma. *Annals of Clinical Biochemistry*, 30: 545-549.

Chavda, S., Babu, B., Yanow, S.K., Jardim, A., Spithill, T.W. 2010. A Novel Achiral seco-cyclopropylpyrido[e]indolone (CPyI) Analog of CC-1065 and the Duocarmycins: Synthesis, DNA Interactions, In Vivo Anticancer and Anti-parasitic Evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18: 5016-5024.

Chen, G.J., Wang, Z.G., Kou, Y.Y., Tian, J.L., Yan, S.P. 2013. Impact of metal on the DNA photo-induced cleavage activity of a family of Pterpy complexes. *Journal of Inorganic Chemistry*, 122: 49-56.

Cheng, H.M., Qiu, Y.K., Wu, Z., Zhao, Y.F. 2011. DNA damage induced by shikonin in the presence of Cu(II) ions: potential mechanism of its activity to apoptotic cell death. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(1): 12-19.

Cottreau, K.M., Spencer, C., Wentzell, J.R., Graham, C.L., Borissow, C.N., Jakeman, D.L., McFarland, S.A. 2010. Diverse DNA-cleaving capacities of the jadomycins through precursor-directed biosynthesis. *Organic Letters*, 12(6): 1172-1175.

Denny, W.A., Graham, B.J., Manlio, P., 1998. *New Developments in the Use of Nitrogen Mustard Alkylating Agents as Anticancer Drugs, Advances in DNA Sequence specific Agents*. Jai Press Inc. London.

Denny, W.A. 2000. DNA minor groove alkylating agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 10: 459-474.

Fekry, M.I., Szekely, J., Dutta, S., Breydo, L., Zang, H., Gates, K.S. 2011. Noncovalent DNA binding drives DNA alkylation by leinamycin: evidence that the Z,E-5-(thiazol-4-yl)-penta-2,4-dienone moiety of the natural product serves as an atypical DNA intercalator. *Journal of American Chemical Society*, 133: 17641-17651.

Fonsega, G.C., Bickelhaupt, F.M., Snijders, J.G., Baerends, E.J. 1999. The nature of the hydrogen bond in DNA base Pairs: the role of charge transfer and resonance assistance. *Chemistry-A European Journal*, 5: 3581-3594.

Gao, X., Mirau, P., Patel, D.J. 1992. Structure refinement of the chromomycin dimer-DNA oligomer complex in solution. *The Journal of Molecular Biology*, 223: 259-279.

Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M., Lubensky, I., Duan, D.R., Florence, C., Pozzatti, R., Walther, M.M., Bander, N.H., Grossman, H.B., Brauch, H., Pomer, S., Brooks, J.D., Isaacs, W.B., Lerman, M.I., Zbar, B., Linehan, W.M. 1994. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics*, 7: 85-90.

Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2: 48-58.

Gupta, S.K., Shukla, V.K., Vaidya, M.P., Roy, S.K., Gupta, S. 1991. Serum trace elements and Cu/Zn ratio in breast cancer patients. *Journal of Surgical Oncology*, 46: 178-181.

Habib, F.K., Dembinski, T.C., Stich, S.R. 1980. The zinc and copper content of blood leukocytes and plasma from patients with benign and malignant prostates. *Clinica Chimica Acta*, 104: 329-335.

Hamilton, P.L., Arya, D.P. 2012. Natural product DNA major groove binders. *Natural Product Reports*, 29: 134-143.

Haruna, K.I., Kanazaki, H., Tanabe, K., Dai, W.M., Nishimoto, S.I. 2006. Effects of Structural Modification on The DNA Binding Properties and Photo-induced Cleavage Reactivity of propargylic Sulfones Conjugated with An Anthraquinone Structure. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14: 4427-4432.

Harman, D. 1962. Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life. *Radiation Research*, 16: 753-763.

Hubbard, R.D., Fidanze, S., John, B.T., David, J.T. 2007. Alkylating and platinum antitumor compounds, in: *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier, Pp: 129-148, Oxford.

Hotzel, C., Marotto, A., Pindur, U. 2002. Design, synthesis, DNA-binding and cytotoxicity evaluation of new potential combilexins. *European Journal of Chemistry*, 37: 367-378.

Ichimura, M., Ogawa, T., Takahashi, K., Kobayashi, E., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Takahashi, I., Nakano, H. 1990. Duocarmycin SA, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. *Journal of Antibiotics*, 43: 1037-1038.

Jun, T., Bochu, W., Liancai, Z., 2007. Hydrolytic Cleavage of DNA by Quercetin Manganese(II) Complexes, *Colloid Surface B*, 55: 149-152.

Kapuriya, N., Kakadiya, R., Dong, H., Kumar, A., Lee, P.C., Zhang, X., Chou, T.C., Lee, T.C., Chen, C.H., Lam, K., Marvania, B., Shah, A., Su T.L. 2011. Design, synthesis, and biological evaluation of novel water-soluble N-alkylated mustards as potential anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19: 471-485.

Keerthi, K., Rajapakse, A., Sun, D., Gates, K.S. 2013. Synthesis and characterization of a small analogue of the anticancer natural product leinamycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 21(1): 235-241.

Kielkopf, C.L., White, S., Szewczyk, J.W., Turner, J.M., Baird, E.E., Dervan, P.B., Rees, D.C. 1998. A Structural basis for recognition of A.T and T.A base pairs in the minor groove of B-DNA. *Science*, 282: 111-115.

Kopka, M.L., Chun, Y., Goodsell, D., Pjura, P., Dickerson, R.E. 1985. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Biochemistry*, 82: 1376-1380.

Lamani, D.S., Reddy, K.R.V., Naik, H.S.B., Savyasachi, A., Naik, H.R. 2008. Synthesis and DNA binding studies of novel heterocyclic substituted quinoline schiff bases: A potent antimicrobial agent. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27: 1197-1210.

Leelavathy, L., Anbu, S., Kandaswamy, M., Karthikeyan, N., Mohan, N. 2009. Synthesis and Characterization of A New Series of Unsymmetrical Macrocyclic Binuclear Vanadyl(IV) Complexes Electrochemical, Antimicrobial, DNA Binding and Cleavage Studies. *Polyhedron*, 28: 903-910.

Lerman, L.S., 1961. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3: 18-30.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23: 3-25.

Liu, Y.J., Liang, Z.H., Hong, X.L., Li, Z.Z., Yao, J.H., Huang, H.L. 2012. Synthesis, characterization, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, cellular uptake, interaction of DNA binding and antioxidant activity studies of ruthenium(II) complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 387: 117-124.

Lown, J.W. 1994. DNA recognition by lexitropsins, minor groove binding agents. *Journal of Molecular Recognition* 7: 79-88.

Ma, J., Jones, S.H., Hecht, S.M. 2005. A dihydroflavonol glucoside from *Commiphora africana* that mediates DNA strand scission. *Journal of Natural Product*. 68(1): 115-117.

Margalioth, E.J., Schenker, J.G., Chevion, M. 1983. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*. 52: 868-872.

Martin, D.G., Biles, C., Gerpheid, S.A., Hanka, L.J., Krueger, W.C., McGovren, J.P., Mizesak, S.A., Neil, G.L., Stewart, J.C., Visser, J. 1981. CC-1065 (NSC 298223), a Potent New Antitumor Agent. Improved Production and Isolation, Characterization and Antitumor Activity. *Journal of Antibiotics*, 34: 1119-1125.

Naqvi, S., Ullah, M.F., Hadi, S.M. 2010. DNA degradation by aqueous extract of *Aloe vera* in the presence of copper ions. *Indian Journal of Biochemistry*, 47(3): 161-165.

Neidle, S. 2001. DNA minor-groove recognition by small molecules. *Natural Product Reports*, 18: 291-309.

Nelson, S.M., Ferguson, L.R., Denny, W.A. 2007. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents. *Mutation Research*, 623: 24-40.

Ouyang, D., Zhang, R., Yi, L., Xi, Z. 2008. A synergistic effect of Cu(2+) and norbixin on DNA damage. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8): 2802-2807.

Ozawa, S., Sugiyama, Y., Mitsuhashi, Y., Kobayashi, T., Inaba, M. 1988. Cell killing action of cell cycle phase-non-specific antitumor agents is dependent on concentration-time product. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 21: 185-190.

Pabo, C.O., Sauer, R.T. 1984. Protein-DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 293-321.

Pandya, R., Islam, M.M., Kumar, G.S., Jayaram, B. 2010. DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence. *Journal of Chemical Sciences*, 2: 247-257.

Pang, J.Y., Qin, Y., Chen, W.H., Luo, G.A., Jiang, Z.H. 2005. Synthesis and DNA-binding affinities of monomodified berberines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 13(20): 5835-5840.

Patra, A.K., Roy, S., Chakravarty, A.R. 2009. Synthesis, crystal structures, DNA binding and cleavage activity of L-glutamine copper(II) complexes of heterocyclic bases. *Inorganica Chimica Acta*, 362(5): 1591-1599.

Pham, V.C., Ma, J., Thomas, S.J., Xu, Z., Hecht, S.M. 2005. Alkaloids from *Alangium javanicum* and *Alangium grisolleoides* that mediate Cu²⁺-dependent DNA strand scission. *Journal of Natural Product*, 68(8): 1147-1152.

Pugliese, A., Martinetto, P. 1978. Biological effects of distamycin A. *G Bacteriol Virol Immunol*, 71: 198-205.

Qian, J., Ma, X.F., Xu, H.Z., Tian, J.L., Shang, J., Zhang, Y., Yan, S.P. 2010. Synthesis, Crystal Structure, DNA Binding, and Hydrolytic Cleavage Activity of a Manganese(II) Complex. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 20: 3109-3116.

Raman, N., Sobha, S. 2012. Exploring the DNA binding mode of transition metal based biologically active compounds. *Spectrochimica Acta Part A*, 85: 223-234.

Ridge, G.S., Bailly, C., Graves, D.E., Waring, M.J. 1994. Daunomycin modifies the sequence-selective recognition of DNA by actinomycin. *Nucleic Acids Research*, 22: 5241-5246.

Rizk, S.L., Sky-Peck, H.H. 1984. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Research*, 44: 5390-5394.

Scanni, A., Licciardello, L., Trovato, M., Tomirotii, M., Biraghi, M. 1977. Serum copper and ceruloplasmin levels in patients with neoplasias localized in the stomach, large intestine or lung. *Tumori*, 63: 175-180.

Suntharalingam, K., Hunt, D.J., Duarte, A.A., White, A.J., Mann, D.J., Vilar, R. 2012. A tri-copper(II) complex displaying DNA-cleaving properties and antiproliferative activity against cancer cells. *Chemistry*, 18(47): 15133-15141.

Takeda, Y., Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F., Matthews, B.W. 1983. DNA-binding proteins. *Science*, 221: 1020-1026.

Tam, V.K. 2007. Targeting Unique Nucleic Acid Structures with Small Molecules, Doktora tezi, University of California, San Diego. 217.

Tetko, I.V., Bruneau, P. 2004. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93: 3103-3110.

Tietze, F.L., Major, F. 2006. Synthesis of New Water Soluble DNA-Binding Subunits for Analogues of the Cytotoxic antibiotic CC-1065 and Their Prodrugs. *European Journal of Chemistry*, 10: 2314-2321.

Tietze, F.L., Major, F., Schuberth, I., Dirk, A.S., Krewer, B., Maksimenta, K., Bringmann, G., Magull, J. 2007. Selective treatment of cancer: synthesis, biological evaluation and structural elucidation of novel analogues of the antibiotic CC-1065 and the duocarmycins. *Chemistry-A European Journal*, 13: 4396-4409.

Tomasz, M. 1995. Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry and Biology*, 2: 575-579.

Tu S.M. in: S.T. Rosen (Ed.). 2010. Heterogeneity of Cancer, Origin of Cancers, Springer, Pp. 129-136.

Urruticochea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., Capellá, G. 2010. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16: 3-10.

Wang, Y., Jiang, J., Jiang, X., Cai, S., Han, H., Li, L., Tian, Z., Jiang, W., Zhang, Z., Xiao, Y., Wright, S.C., Larrick, J.W. 2008. Synthesis and antitumor activity evaluations of albumin-binding prodrugs of CC-1065 analog. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16: 6552-6558.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1993. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *The Journal of the American Medical Association*. 269: 1966-1967.

Weiling, F. 1991. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822-1884. *American Journal of Medical Genetics*, 40: 1-25.

Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., Dickerson, R. 1980. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, 287: 755-758.

Wilson, B., Gude, L., Fernandez, M.J., Lorente, A., Grant, K.B. 2005. Tunable DNA photocleavage by an acridine-imidazole conjugate. *Inorganic Chemistry*, 44: 6159-6173.

Wolfe, A.L., Duncan, K.K., Parelkar, N.K., Weir, S.J., Vielhauer, G.A., Boger, D.L. 2012. A novel, Unusually Efficacious Duocarmycin Carbamate Prodrug That Releases No Residual by product. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 5878-5886.

Yang, X.B., Feng, J., Zhang, Z.W., Lin, H.H., Zhou, L.H., Yu, X.Q. 2008. Synthesis, and bindin and cleavage activities of the copper (II) complexes of estrogen-macrocyclic polyamine conjugates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16: 3871-3877.

Yap, K.Y.L., Chan, A., Chui, W.K., Chen, Y.Z. 2010. Cancer informatics for the clinician: an interaction database for chemotherapy regimens and antiepileptic drugs. *Seizure*, 19: 59-67.

Yücel, I., Arpacı F., Özet, A., Döner, B., Karayılanoglu. T., Sayar. A., Berk, O. 1994. Serum copper and zinc and copper/zinc ratio in patientswith breast cancer. *Biological Trace Element Research*, (40): 31-38.

Zhang, H.Z., Drewe, J., Tseng, B., Kasibhatla, S., Cai, S.X. 2004. Discovered and SAR of Indole-2-carboxylic Acid Benzylidene-hyrazides As a New Series of Apoptosis Inducers Using A Cell-based HTS Assay, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12: 3649-3655.

Zhang, R., Wua X., Yalowich J.C., Hasinoff B.B. 2011. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of bisintercalating DNA-binding piperazine-linked bisanthrapyrazole compounds as anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19: 7023-7032.

Zhao, R.Y., Erickson, H.K., Leece, B.A., Reid, E.E., Goldmacher, V.S., Lambert, J.M., Chari, R.V. 2012. Synthesis and biological evaluation of antibody conjugates of phosphate prodrugs of cytotoxic DNA alkylators for the targeted treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 766-787.

Zhigang, L., Q. Y., Xuhong, Q. 2005. Novel heterocyclic family of phenyl naphthothiazole carboxamides derived from naphthalimides: synthesis, antitumor evaluation, and DNA photocleavage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13: 3149-3155.

7. EKLER

EK 1. Elektroforezde kullanılan çözeltiler

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

Agaroz Jel (% 1)

1.0 g	Agaroz
100 mL	TAE tamponu

Agaroz Jel (% 0.7)

0.7 g	Agaroz
100 mL	TAE tamponu

Jel Yürütme Tamponu (50x; pH 8.2)

Tris bazi	242 g
Glasiyel asetik asit	15 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	100 mL
d H ₂ O	1L

Saf su ile 1:50 oranında seyreltilerek kullanılır.

EK 2. Agaroz Jelin Hazırlanması

1. Elektroforez aygıtı ile sağlanan plastik tepsinin kenarları otoklav bandı ile sarılarak bir kalıp oluşturulur ve plaka yatay konumda, düzgün bir yere yerleştirilir.

2. Agaroz 250 mL'lik bir erlen içerisinde bulunan Tris asetat tamponuna ilave edilir ve erlen agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında tutulur (Agaroz taneciklerinin mümkün olan en kısa sürede erimesi sağlanmalıdır.)

3. Agaroz çözeltisi 60 °C'ye kadar soğutulur. Daha sonra 1.5 µL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edilir ve karıştırılır.

4. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya dökülür.

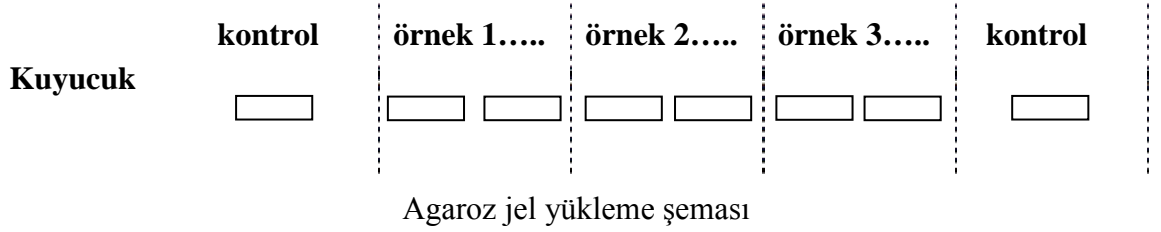
5. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletilir. Jel donduktan sonra tarak ve otoklav bandı dikkatle çıkarılır.

DİKKAT!!! Etidyum bromür kuvvetli bir mutajen ve oldukça toksiktir. Bu boyayı içeren çözeltilerle çalışırken mutlaka eldiven giyilmelidir.

EK 3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

1. Eppendorf tüplerinde bulunan örneklere 3 μ L yükleme tamponu ilave edilir.
2. Jelin kuyucukları elektroforez tamponu ile doldurulur ve hazırlanan DNA örnekleri uygun bir pipet ile tampon dolu kuyucuklara dikkatlice yüklenir.
3. Jel elektroforez tankına yerleştirilir ve tank maksimuma kadar Tris asetat tamponu ile doldurulur. Tankın kapağı kapatılır ve elektrik bağlantıları yapılır. DNA katottan (siyah uçtan) anoda (kırmızı uca) doğru hareket eder. Elektroforez 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika süreyle yürütülür.
4. Elektrik akımı kesilir, tel bağlantıları ve kapak çıkarılır.

✓ *Jel yükleme tamponları üç amaç için kullanılırlar: i) Örneğin yoğunluğunu artırarak DNA'nın kuyucuğa düzgün olarak yüklenmesini sağlarlar, ii) Örneği renklendirerek yükleme işlemini basitleştirirler, iii) Elektriksel alanda anoda doğru hareket ederler.*



EK 4. Bakteri kültürünün hazırlanması

Bakteri üretmek için gerekli besiyerinin bileşenleri

Luria Bertani broth (LB)

Trypton	10 g
NaCl	5 g
Yeast ekstrakt	5 g
d H ₂ O	1L

250 mL'lik erlenlere 50 mL konularak 121 °C'da 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra ampisilin (100 mg/mL) ilave edildi, ilave edildi.

Luria Bertani agar (LB) 10 g Trypton

Trypton	10 g
NaCl	5 g
Yeast ekstrakt	5 g
Agar	15 g
d H ₂ O	1L

121 °C'da 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra ampisilin (100 mg/mL) ilave edildi, steril petri kaplarına döküldü ve oda sıcaklığında katılaşması beklendi.

Gliserollü stoktan alınan bakteri eküvyon çubuğu yardımı ile LB katı besiyerine yayıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu katı kültürden 1 koloni alınarak sıvı besiyerine eklendi ve 1 gece 200-250 rpm hızla çalkalandı. Hazırlanan bakteri kültüründen Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanarak pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) saflaştırıldı.

EK 5. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanarak pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) saflaştırılması.

Tüm aşamalar oda sıcaklığında yapılmalıdır.

Tüm santrifüjleme aşamaları >1200 x g ile yapılmalıdır.

1. 3 mL bakteri kültürü mikro santrifüjde (6800 x g) 2 dakika santrifüjlendi.
2. Süpernatant döküldü, pellet resüspanسیون çözeltisi ile (250 µL) yeniden süspanse edildi.
3. Lizis solüsyonu (250 µL) ilave edildi ve tüpler 4-6 defa ters düz edildi (Solüsyonun berrak ve viskoz olması gerekir).
4. Nötralleştirme solüsyonu (350 µL) ilave edildi ve tüpler 4-6 defa hızlıca ters düz edildi.
5. Tüpler 5 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatant GeneJET spin kolon tüplerine aktarıldı.
7. 1 dakika santrifüjlendi, altta kalan sıvı döküldü ve tüpler yeniden aynı toplama tüplerine konuldu.
8. GeneJET spin kolonuna yıkama solüsyonu (500 µL) ilave edildi. 30-60 saniye santrifüjlendi, altta kalan sıvı döküldü ve tüpler yeniden aynı toplama tüplerine konuldu.
9. Yıkama prosedürü (8. basamak) tekrar edildi.
10. Kalan yıkama solüsyonun uzaklaştırmak için 1 dakika daha santrifüjlendi, altta kalan sıvı döküldü ve tüpler yeniden aynı toplama tüplerine konuldu.
11. GeneJET spin kolonu temiz mikrosantrifüj (eppendorf) tüplerine yerleştirildi. Elüsyon solüsyonu (50 µL) GeneJET spin kolonunun merkezine, membrana temas etmeden eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dakika santrifüjlendi.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Bircan ÇEKEN TOPTANCI
Doğum Tarihi: 12.06.1979
Doğum Yeri: Diyarbakır
Medeni Hali: Evli
Adres: Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280 Diyarbakır
Tel.: (0412) 2488550-3141
Fax: (0412)2488039
E-mail: bircan@dicle.edu.tr

Eğitim ve Akademik Kariyer

Aralık 2005-Mevcut tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Eylül 2006-Eylül 2013

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Prof. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında “(+)-Duocarmycin Antibiyotiği Analoglarının Sentezlenmesi ve DNA Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı doktora tezini bitirdim.

Şubat 2007-Haziran 2007

Institute of Chemical Technology (Prag), Organik Kimya Bölümünde Prof. Dr. Igor LINHART danışmanlığında “Benzenden Türeyen Nükleobaz Ürünlerinin Sentezi” adlı projede çalışmışım

Eylül 2003-Temmuz 2005

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında “**Sentetik Maddeler ile DNA kesimi** ” adlı yüksek Lisans tezini bitirdim.

Eylül 1998-Haziran 2002

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Eylül 1985-Şubat 1997

İlkokul öğrenimimi İnönü İlkokulunda, Ortaokul ve Lise Eğitimimi Diyarbakır Anadolu Lisesinde tamamladım.

Burslar

1. Tübitak Münir Birsal Lisansüstü Bursları Vakfı'ndan Doktora bursu.
2. 24-27 Şubat 2008 tarihinde Uludağ'da yapılan *II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu*'nda genç araştırmacı bursu.
3. Mayıs 2010-Kasım 2011 (18 ay) tarihleri arasında TÜBİTAK 109T788 nolu Araştırma Projesinden Öğrenci Bursu

Projelerde Yaptığı Görevler

1. *Çeşitli Plazmid DNA ve Bazı Proteinlerin Diazonium Tuzları ile Kesimi; Yapay Nükleazlar*, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜAP-02-FF-10, Projede Yönetici, Proje Bütçesi: 394.000.000 TL, Proje Yürütücüsü: Murat Kızıl, Proje Görevlileri: Çetin Aytekin, Naime Canoruç, Göksel Kızıl, Murat Yavuz, Bircan Çeken, 2003-2005. (Proje tamamlandı).
2. Diyarbakır Çevresinde Yetişen Bazı Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidant ve DNA'yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜAP-03-FF-63, Proje Yürütücüsü: Proje Bütçesi: 32.000.000 TL, Proje Yürütücüsü: Murat Kızıl, Proje Görevlileri: Selçuk Ertekin, Göksel Kızıl, Murat Yavuz, Deniz Barış, Bircan Çeken, 2004-2006. (Proje tamamlandı).
2. *Proflavin İçeren, (+)-Duocarmycin Antibiyotiği Analoglarının Sentezlenmesi, DNA ile Bağlanma ve DNA Kesimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Potansiyel Yapay Nükleazlar*, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜBAP-08-FF-69, Proje Bütçesi: 13.500 TL, Proje Yürütücüsü: Murat Kızıl, Proje Görevlileri: Murat Kızıl, Bircan Çeken, 2009-2010 (Proje tamamlandı).
3. *Proflavin içeren, (+)-Duocarmycin antibiyotiği analoglarının sentezlenmesi ve DNA üzerine etkilerinin araştırılması*, TÜBİTAK Projesi, TBAG 109T788, Proje Yürütücüsü: Murat Kızıl Proje Bütçesi: 218.250,00 TL, Proje Görevlileri: Murat Kızıl, Bircan Çeken, Çetin Aytekin, Şafak Özhan Kocakaya, 2010-2012 (Proje tamamlandı).
4. *Sideritis albiflora bitkisinin sekonder metabolitlerinin saflaştırılması, fenolik içeriğinin belirlenmesi ve yağ asidi analizi, antioksidan, antimikrobiyal, antikolinesteraz ve DNA hasarı önleyici etkisinin araştırılması*, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜBAP-12-ASMYO-148, Projede Araştırmacı, Proje Bütçesi: 27.400 TL, Proje Yürütücüsü: Abdulsalam Ertaş, Proje Görevlileri: Gülaçtı Topçu, Ufuk Kolak, Murat Kızıl, Mehmet Boğa, Nesrin Haşimi, Bircan ÇEKEN, Demet Dinçel, Kasım 2012–Mayıs 2015 (36 ay, Proje devam ediyor).
5. *Diazo grubu İçeren Bis-Akridin Ligantların Sentezi, Yapısal Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve DNA İle Etkileşimlerinin İncelenmesi*, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜBAP-12-FF-106, Projede Yürütücü, Proje Bütçesi: 5.000 TL, Proje Yürütücüsü: Murat Kızıl, Proje Görevlileri: Murat Kızıl, Hayrettin Dinç, Bircan Çeken, Kasım 2012–Kasım 2013 (Proje tamamlandı).

Uluslar arası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **B. Çeken** & M. Kızıl “Synthesis and DNA-cleaving activity of a series of substituted arenediazonium ions”, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34 (4), 488–498 (2008).
2. G. Kızıl, M. Kızıl ve **B. Çeken** “The protective ability of ethanol extracts of *Hypericum scabroides* Robson & Poulter and *Hypericum triquetrifolium* Turra against the protein oxidation and DNA damage” *Food Science and Biotechnology*, 18 (1), 130-136 (2009).
3. S. Emen, **B. Çeken**, G. Kızıl ve M. Kızıl “DNA Damage Protecting Activity and in vitro Antioxidant Potential of the Methanol Extract of *Cyclotrichium niveum*” *Pharm. Biol.*, 47 (3), 219-229 (2009).
4. M. Kızıl , G. Kızıl, M. Yavuz and **B. Çeken** “Protective Activity Of Ethanol Extract Of Three *Achillea* Species Against Lipid Peroxidation, Protein Oxidation and DNA Damage In Vitro” *Acta Alimentaria*, 39 (4), 450-463 (2010).
5. D. Barış, M. Kızıl, Ç. Aytekin, G. Kızıl, M. Yavuz, **B. Çeken**, S. Ertekin “In Vitro Antimicrobial And Antioxidant Activity of Ethanol Extract Of Three *Hypericum* And Three *Achillea* Species From Turkey” *International Journal of Food Properties*, 14 (2), 339-355 (2011).
6. G. Kızıl, M. Kızıl, **B. Çeken**, M. Yavuz, H. Demir “Protective Ability Of Ethanol Extracts Of *Hypericum Scabrum* L. and *Hypericum Retusum* Aucher Against The Protein Oxidation and DNA Damage” *International Journal Of Food Properties*, 14 (4), 926-940 (2011).
7. S. Emen Tanrıku, **B. Çeken**, S. Altaş, M. Pirinççioğlu, G. Kızıl, M. Kızıl, “DNA cleavage protecting activity and in vitro antioxidant potential of aqueous extract from fresh stems of *Rheum ribes*” *Acta Alimentaria*, *In press* (2012).

Sempozyumlar

A. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. D. Barış, **B. Çeken**, M. Yavuz, M. Kızıl ve Ç. Aytekin, “*Pistacia lentiscus* Ağacından Elde Edilen Mastic Sakızının *in vitro* Antimikrobiyal ve Antioksidant Özelliklerinin Araştırılması” *XVIII. Ulusal Kimya Kongresi*, BK-487, 487, Kars, 2004.
2. Kızıl, M., D. Barış, **B. Çeken**, M. Yavuz, Ç. Aytekin, “Bazı *Achillea* Türlerinin in Vitro Antimikrobiyal Ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması” *XIX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP87, Kuşadası, 30 Eylül-4 Ekim 2005.

3. Barış, D., M. Kızıl, **B. Çeken**, M. Yavuz, Ç. Aytekin, “Bazı *Hypericum* Türlerinin İn Vitro Antimikrobiyal Ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması” XIX. *Ulusal Kimya Kongresi*, BKP103, Kuşadası, 30 Eylül-4 Ekim 2005.
4. **Çeken, B.**, S. Emen, M. Kızıl, “Süstitüe Aril Radikallerin Nükleik Asitler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” XIX. *Ulusal Kimya Kongresi*, BKP111, Kuşadası, 30 Eylül-4 Ekim 2005.
5. **Çeken, B.**, M. Kızıl, S. Emen, “Arendiazonyum Tuzları ve Kanser” XX. *Ulusal Kimya Kongresi*, BKS1, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.
6. Emen, S., **Çeken, B.**, M. Kızıl, “*Cyclotrichium niveum* Bitkisinin Antioksidant, Radikal söndürücü ve DNA’yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması” XX. *Ulusal Kimya Kongresi*, BKP32, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.
7. **Çeken, B.**, Kızıl M., “Bazı *Hypericum* ve *Achillea* bitki türlerinin etanol Ekstraktlarının DNA’yı serbest radikallerden koruma Etkilerinin araştırılması” 21. *Ulusal Kimya Kongresi*, BIY014P, Malatya, 23-27 Ağustos 2007.
8. **Çeken, B.**, Kızıl, M., Kızıl M., “The Protective Ability of the Ethanol Extract of *Hypericum scabroides* Robson & Poulter Against Oxidative DNA Damage and Protein Oxidation” II. *Multidispliner Kanser Araştırma Sempozyumu, Uluslararası Katılımlı*, Uludağ, Bursa, P26, 24-27 Şubat 2008.
9. **Çeken, B.**, Kızıl, G., Emen, S., Kızıl, M., “*Hypericum Triquetrifolium* Bitkisinin Etanol Ekstraktının Oksidatif DNA Hasarı ve Protein Oksidasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması” XXII. *Ulusal Kimya Kongresi*, Mağusa, Kıbrıs, BKP009, 06-10 Ekim 2008.
10. **Çeken, B.**, Emen, S., Kızıl, G. ve Kızıl, M., “*Hypericum lysimachoides* ve *Cyclotrichium niveum* Bitkilerinin Etanol Ekstraktlarının Protein Oksidasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması” 23. *Ulusal Kimya Kongresi*, BP026, Sivas, 16-20 Haziran 2009.
11. Emen, S., **Çeken, B.**, Altaş S., Pirinççioğlu, M., Kızıl M., “*Rheum ribes* Bitkisinin Su Ekstraktının Antioksidant ve DNA’yı Serbest Radikallerden Koruma Etkisinin Araştırılması” 24. *Ulusal Kimya Kongresi*, BP 102, Zonguldak, 29 Haziran-2 Temmuz 2010.
12. Palabıyık, F., Güler, M., **Çeken B.**, Kızıl M., “*Allium sativum* L. Bitkisinin Su Ekstraktının Konsantrasyona Bağlı Olarak DNA Üzerine Antioksidant ve Prooksidant Etkisinin İncelenmesi” 25. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-066, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.
13. Kutlu, T., Takım, K., **Çeken B.**, Kızıl M., “Kiraz Yaprağı (*Prunus avium* L.) Metanol Ekstraktının Antioksidan Kapasitesinin ve Oksidatif DNA Hasarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi” 25. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-088, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.
14. Emen Tanrıkut, S., Pirinççioğlu, M., Kızıl, G., **Çeken, B.**, Kızıl, M., “Karbon Tetraklorür (CCl₄) İle Oluşturulan Doku Hasarında Nar (*Punica granatum*) Suyunun Önleyici Etkisinin Araştırılması” 25. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-154, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.

15. Özhan Kocakaya, Ş., **Çeken, B.**, Kızıl, M., “Proflavin içeren, (+)-Duocarmycin Antibiyotiği Analoglarının DNA’ya Bağlanma İlgilerinin Hesapsal Araştırılması” 25. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, OP-112, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.
16. **Çeken, B.**, Özhan Kocakaya, Ş., Güzel, V., Kızıl, M., “Diazo-Proflavin içeren Duocarmycin Antibiyotiği Türevinin Sentezi ve DNA ile Etkileşiminin İncelenmesi / Synthesis and DNA interaction of Duocarmycin Antibiotic Derivative Containing Diazo-Proflavin” 26. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-TR-008, Muğla, 01. 10. 2012-06. 10. 2012.
17. Özhan Kocakaya, Ş., **Çeken, B.**, Dinç, H., Kızıl, M., “(+)-Duocarmycin Antibiyotiği Analogunun Dizaynı, DNA Kesim Etkisi ve Moleküller Modelleme Çalışmaları / Synthesis and DNA Cleavage Ability of (+)-Duocarmycin Antibiotic Analog with Molecular Modeling” 26. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-TR-039, Muğla, 01. 10. 2012-06. 10. 2012.
18. Serçe, A., **Çeken, B.**, Kızıl, G., Kızıl, S., Kızıl, M., “Meryemana Dikeni (*Silybum marianum* (L.) Gaertner) Tohumunun Antioksidant Aktivitesi ve Oksidatif DNA Hasarı İle Protein Oksidasyonu Önleyici Etkisinin Araştırılması/The Antioxidant Activity and DNA Oxidative Damage and Protein Oxidation Protection Effect of Seeds of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertner)” 26. *Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, BP-TR-003, Muğla, 01. 10. 2012-06. 10. 2012.
19. Karataş, F., Kaya Z., Şihli, S., Gümüş, A., **Çeken B.**, Serçe, A., Kızıl, M., “*Echinacea purpurea* (Asteraceae) Bitkisinin Metanol Ekstraktının Yaşamın Kodu DNA’nın Oksidatif Hasarı ve Protein Oksidasyonu Önleyici Etkisi” *IV. Multidisipliner Kanser Kongresi*, P58, Bursa, 13-16 Aralık 2012.
20. **Çeken, B.**, Altaş, S., Kızıl, G., Kızıl, M., “Meyan Kökünün Antioksidant Aktivitesi ve Biyomolekülleri Koruyucu Etkisi” *IV. Multidisipliner Kanser Kongresi*, P15, Bursa, 13-16 Aralık 2012.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Kızıl, M., **Çeken, B.**, “Synthesis and DNA cleaving activity of a series of substituted Arenediazonium ions” *International Symposium on Drug Research & Development “From Chemistry to Medicine”*, P07, Antalya, 17-20 Mayıs 2007.
2. Kızıl, G., M. Yavuz, **B. Çeken.**, S. Emen ve M. Kızıl, “Antioxidant Activity and Protective Effect of Ethanol Extract of *Hypericum scabrum* L. on Protein Oxidation” An Advanced Course sponsored by FEBS, IUBMB and IFCC on Mechanisms, Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications, P22, Kemer, Antalya, 15-20 April 2009.
3. **Çeken, B.**, Emen, S., Erdoğan, S., Kızıl, G., Kızıl, M., “Screening of Antioxidant Properties of Methanolic Extract of *Sideritis libanotica* Labill ssp. Linearis and Protective Activity Against DNA Damage and Protein Oxidation” *International Symposium on Drug Research & Development “From Chemistry to Medicine”*, P23, Ankara, 04- 07 Mayıs 2009.

4. Emen, S., Pirinçcioğlu, M., **Çeken, B.**, Kızıl, G., Kızıl, M., “The protective Effect of Pomegranate juice and Peel Against DNA DNA Damage and Protein Oxidation” *International Symposium on Drug Research & Development “From Chemistry to Medicine”*, P24, Ankara, 04- 07 Mayıs 2009.
5. **Çeken, B.**, Kızıl, G., Yavuz, M., Kızıl, M., “Evaluation of Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Hypericum retusum* and Its Protective Effect on Protein Oxidation” *34th FEBS Congress “Life’s Molecular Interactions”*, Febs Journal Volume 276, pg 304 , Prague, Czech Republic, 04-09 July 2009.
6. **Çeken, B.**, Özhan Kocakaya, Ş., Kızıl, M., “Design, Synthesis and DNA Cleavage Ability of Duocarmycin Antibiotic Analog Containing Proflavin with Molecular Modeling” *EACR-Anticancer Agents Research Congress*, P-40, Antalya, Turkey, 13-16 October 2011.
7. **Çeken, B.**, Özhan Kocakaya, Ş., Kızıl, M., “Synthesis and DNA-binding of Duocarmycin Antibiotic Derivatives Containing Diazo-Proflavin Molecular Constructs” *12th Eurasia Conference on Chemical Sciences*, S2-PP4, Corfu, Yunanistan, 16-21 April 2012.

Katıldığı Kurslar

1. 24-28 Ocak 2005 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından *düzenlenen “Serbest Radikaller, DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi”* konulu Teorik Kursu katıldım.
2. 29 Haziran-6 Temmuz 2008 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’ nın işbirliği ile düzenlenen “Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Bozukluklar” konulu Lisansüstü Yaz Okulu’na katıldım.