

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

SENTETİK MADDELER İLE DNA KESİMİ

Bircan ÇEKEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(KİMYA ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR
TEMMUZ-2005

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Bircan ÇEKEN tarafından yapılan bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA
Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

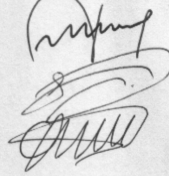
Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Göksel KIZIL

İmza



Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ /2005

Doç. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım her türlü sorunumla yakından ilgilenen Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN'e, Yrd. Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŐ'e, Yrd. Doç. Dr. Göksel KIZIL'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvar'ının kurulmasına yardımcı olan Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne (02-FF-10 nolu proje) ve Fen Edebiyat Fakültesi Dekanlığına teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

AMAÇ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
1. 1. DNA'nın Yapısı ve Özellikleri	1
1. 2. DNA'ya Zarar Veren Maddeler Neden Önemlidir?	7
1. 3. Kovalent DNA Modifikasyonunun Genel Mekanizması	7
1. 4. DNA İle Etkileşen İlaçlar	10
1. 4. 1. DNA İnterkalatörleri	10
1. 4. 2. Alkilleyici Ajanlar	11
1. 4. 2. 1. Azot Hardalları	12
1. 4. 2. 2. Diğer Alkilleyici Ajanlar	14
1. 4. 3. DNA Zincirini Kıranlar	14
1. 4. 3. 1. Antrasiklin Antitümör Antibiyotikleri	14
1. 4. 3. 2. Bleomycin	15
1. 4. 3. 3. Ene diyen Antibiyotikleri	16
1. 4. 3. 3. 1. Neocarzinostatin	16
1. 4. 3. 3. 2. Esperamicin ve Calicheamicin	18
1. 4. 3. 3. 3. Dynemicin A	20
1. 5. Karbon Merkezli Radikal Metabolitleri	20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	23
3. MATERYAL VE METOT	35
3. 1. Materyal	35
3. 1. 1. Kullanılan Bitki Türleri, Tanımları, Yayılışları ve Kullanım Alanları	35
3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36

3. 1. 3. Kullanılan Aletler	36
3. 2. Metot	36
3. 2. 1. Agaroz Jel Elektroforezi	36
3. 2. 1. 1. Agaroz Jel'in Hazırlanması	37
3. 2. 1. 2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması	37
3. 2. 2. Plazmid Saflaştırma	37
3. 2. 2. 1. TENS Yöntemi	38
3. 2. 2. 2. Mini Prep	39
3. 2. 3. Diazonyum Tuzlarının Sentezlenmesi	39
3. 2. 4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	47
3. 2. 5. Stok Diazonyum Tuzu Çözeltilerinin Hazırlanması	48
3.2.6. Stok Elektron Donör Çözeltilerinin Hazırlanması	48
3. 2. 7. Stok Bitki Ekstraktı Çözeltilerinin Hazırlanması	48
4. BULGULAR	50
4. 1. Diazonyum Tuzlarının DNA Kesim Etkisinin İncelenmesi	50
4. 2. Bazı <i>Hypericum</i> ve <i>Achillea</i> Türü Bitkilerin Aril Radikalleri Sonucu Oluşan DNA Kesimini Önleme Kapasitelerinin İncelenmesi	68
4. 3. Bazı <i>Hypericum</i> ve <i>Achillea</i> Türü Bitkiler ile DNA Kesimi	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	78
6. KAYNAKLAR	84
7. TABLOLARIN LİSTESİ	90
8. ŞEKİLLERİN LİSTESİ	92
9. FOTOĞRAFLARIN LİSTESİ	93
10. ÖZGEÇMİŞ	94

AMAÇ

Endiyen yapısına sahip dynemicin, calicheamicin, esperamicin ve neocarzinostatin gibi doğal antitümör antibiyotikleri diradikal oluşturarak DNA kesimine sebep olurlar. Yapısal olarak çok karmaşık olan bu doğal ürünleri sentezlemek zor olduğundan, bunların kimyasına benzer davranışlarda bulunan daha basit molekülleri sentezlemeye yönelik çalışmalara yönelmeler artmıştır.

Bu çalışmadaki temel amacımız endiyen doğal ürünlerde olduğu gibi DNA kesimini başlatabilecek, aril radikali oluşturabilecek yeni ve karmaşık olmayan moleküller sentezlemektir. Bu amaçla benzendiazonyum iyonunun DNA kesimi için iyi bir model olduğu daha önceden belirlenmiştir. Bizimde bu tezdeki amacımız farklı süstitüe aril radikallerin DNA kesimi üzerine etkilerini araştırmaktır. DNA ve komponentlerine karşı aril radikallerinin kontrolünü sağlayan faktörler ve diğer yapısal özellikleri anlamamız, yeni sentetik DNA kesim molekülleri bulmamıza sebep olacaktır. Bu da bizim daha etkili ve az toksik yeni ilaçlar geliştirmemize yardımcı olacaktır.

Diğer bir amacımız da aril radikalleri sonucu oluşan DNA hasarını antioksidant ve antimikrobiyal aktivitesi bilinen bazı *Hypericum* ve *Achillea* türü bitki ekstraktlarının koruyucu etkilerini araştırmaktır.

ÖZET

Bu çalışmada farklı süstitüe aril radikallerinin radikal reaktivitesi ve DNA kesimi üzerine etkileri araştırıldı. Sentezlenen farklı süstitüe diazonyum tuzlarının inorganik bir elektron donör (CuCl) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA'yı kestiği gözlemlendi. DNA kesiminin süstitüe gruba bağlı olarak kısmen değıştiği ve bazı diazonyum tuzlarında DNA kesiminin elektron donör olmadan da gerçekleştiği belirlendi. Kesim mekanizmasının aril radikalinin DNA'nın deoksiriboz şekerinden bir hidrojen atomu kopararak gerçekleştiği öngörülmektedir.

Ayrıca aril radikalleri ile oluşan DNA hasarı üzerine antioksidant ve antimikrobiyal aktiviteleri bilinen *Hypericum retusum* Aucher, *Hypericum scabrum* L., *Hypericum lysimachioides* Boiss&Nöe var *.lysimachioides*, *Achillea aleppica* D.C. subsp. *aleppica*, *Achillea aleppica* D.C. subsp. *zederbaueri* (Hayek) Hub. -Mor. ve *Achillea biebersteinii* Afan. bitki ekstraktlarının koruyucu etkileri agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Denenen bazı *Hypericum* ve *Achillea* türü bitkilerin etanol ekstraktlarının, aril radikalleri söndürme kapasitesinin olmadığı ve dolayısıyla DNA kesimini önlemediği, aksine kesimi arttırdığı belirlendi. Bundan yola çıkarak bitkilerin tek başına ve bir elektron donör varlığında DNA kesimi incelendi. Bitkilerin etanol ekstraktlarının Cu²⁺ varlığında DNA'yı kestiği tespit edilmiştir. Kesim mekanizmasının bitkilerin içinde bulunan flavonoidlerin bakır ile şelatlaşarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA Kesimi, Serbest Radikaller, Radikal Söndürücü, Bakır, *Hypericum*, *Achillea*

ABSTRACT

The ultimate aim of this thesis was to investigate the effect of different aryl substituted analogues of benzenediazonium tetrafluoroborate on radical reactivity and DNA cleavage ability. The results indicated that cleavage of a DNA duplex from pBluescript M13+ DNA was observed by the different substituted aryl diazonium salts, in the presence of inorganic one-electron donor. Moreover, DNA cleavage was partly affected by different substitute group and DNA strand-scission was also observed without one electron donor in the presence of some tested diazonium salts. Its mechanism involves the generation of the aryl radical that cleaving DNA by hydrogen atom abstraction from deoxyribose sugar.

The protective effect of *Hypericum retusum* Aucher, *Hypericum scabrum* L., *Hypericum lysimachioides* Boiss&Nöe var *.lysimachioides*, *Achillea aleppica* D.C. subsp. *aleppica*, *Achillea aleppica* D.C. subsp. *zederbaueri* (Hayek) Hub. -Mor. ve *Achillea biebersteinii* Afan. plants extracts on DNA cleavage mediated by aryl radical was also investigated using pBluescript M13+ plasmid DNA, as judged by agarose gel electrophoresis. It was found that aryl radical induced DNA strand scission was not prevented by ethanol extracts of *Hypericum* and *Achillea*. On the contrary, DNA cleavage was increased in the presence of plant extracts. Therefore, we decided to investigate the DNA cleavage ability of plant extracts alone and also in the presence of copper (II) chloride. It was found that the naturally occurring plant extracts caused strand scission of DNA in the presence of copper ion. The mechanism of the DNA strand scission by plant extracts (in the presence of Cu^{2+} ion) indicated an involvement of oxygenation of aromatic nucleus, affording catecholic moieties that were proposed to coordinate Cu^{2+} and subsequently effect the reduction of dioxygen to reactive species, followed by the oxidation of catecholic moiety via the coordinated Cu^{2+} ion.

Keywords: DNA Cleavage, Free Radical, Radical Scavenger, Copper, *Hypericum*, *Achillea*

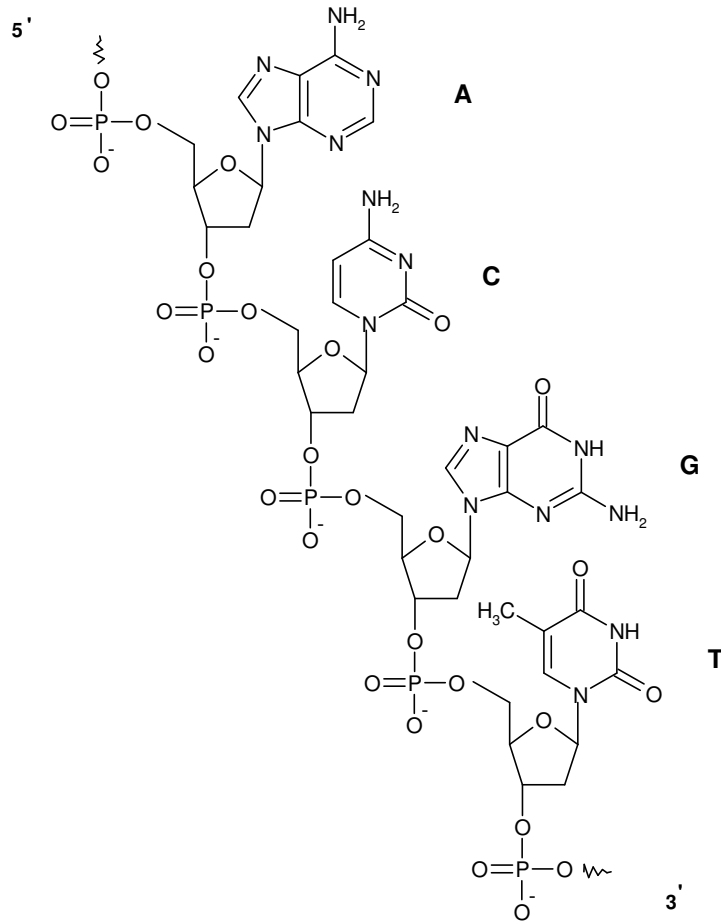
KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
A1	<i>Achillea aleppica</i> subsp. <i>aleppica</i>
A2	<i>Achillea aleppica</i> subsp. <i>zederbaueri</i>
A3	<i>Achillea biebersteinii</i>
H1	<i>Hypericum retusum</i>
H2	<i>Hypericum scabrum</i>
H3	<i>Hypericum lysimachioides</i>

1. GİRİŞ

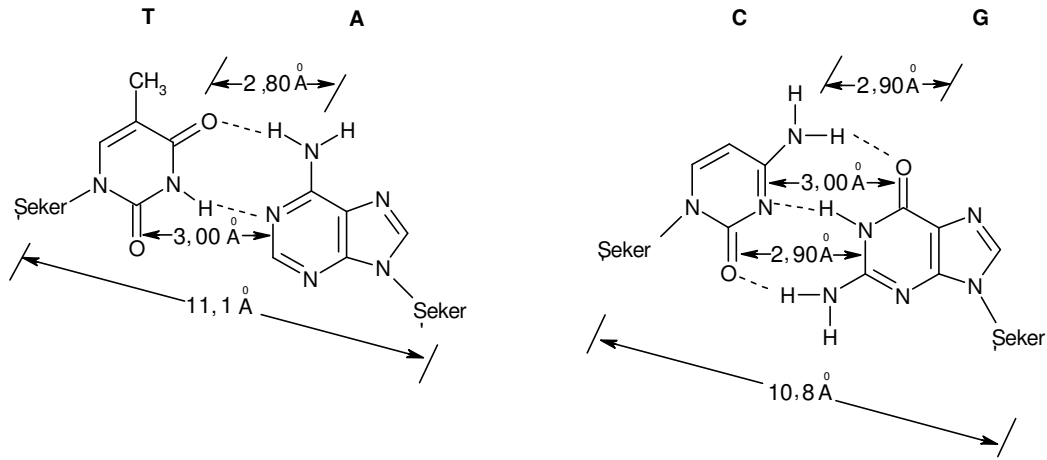
1.1. DNA'nın Yapısı ve Özellikleri

Watson ve Crick, başka araştırmacılar tarafından yapılan deneylerin ve sentezlerin sonuçlarını inceleyerek DNA yapısını aydınlatmışlardır.¹ Todd ve arkadaşları² deoksiribonükleotitlerin birbirlerine fosfodiester bağlarıyla bağlandıklarını, bu bağların bir nükleotitteki 5'-fosfat gruplarıyla diğerk nükleotidteki 3'-hidroksi grupları arasında olduğunu ve deoksiribonükleotitlerin iki pürin bazı ve iki pürimidin bazı içerdiğini belirlemişlerdir. Pürin bazları Adenin ve Guanin, pürimidin bazları ise Sitozin ve Timindir. Chargaff ve arkadaşları³ DNA zincirindeki A/T ve G/C oranlarının 1 olduğunu göstermişler. DNA'nın tek zincir yapısı şekil 1.1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 1.1. DNA tek zinciri, Deoksipoliribonükleotid zinciri

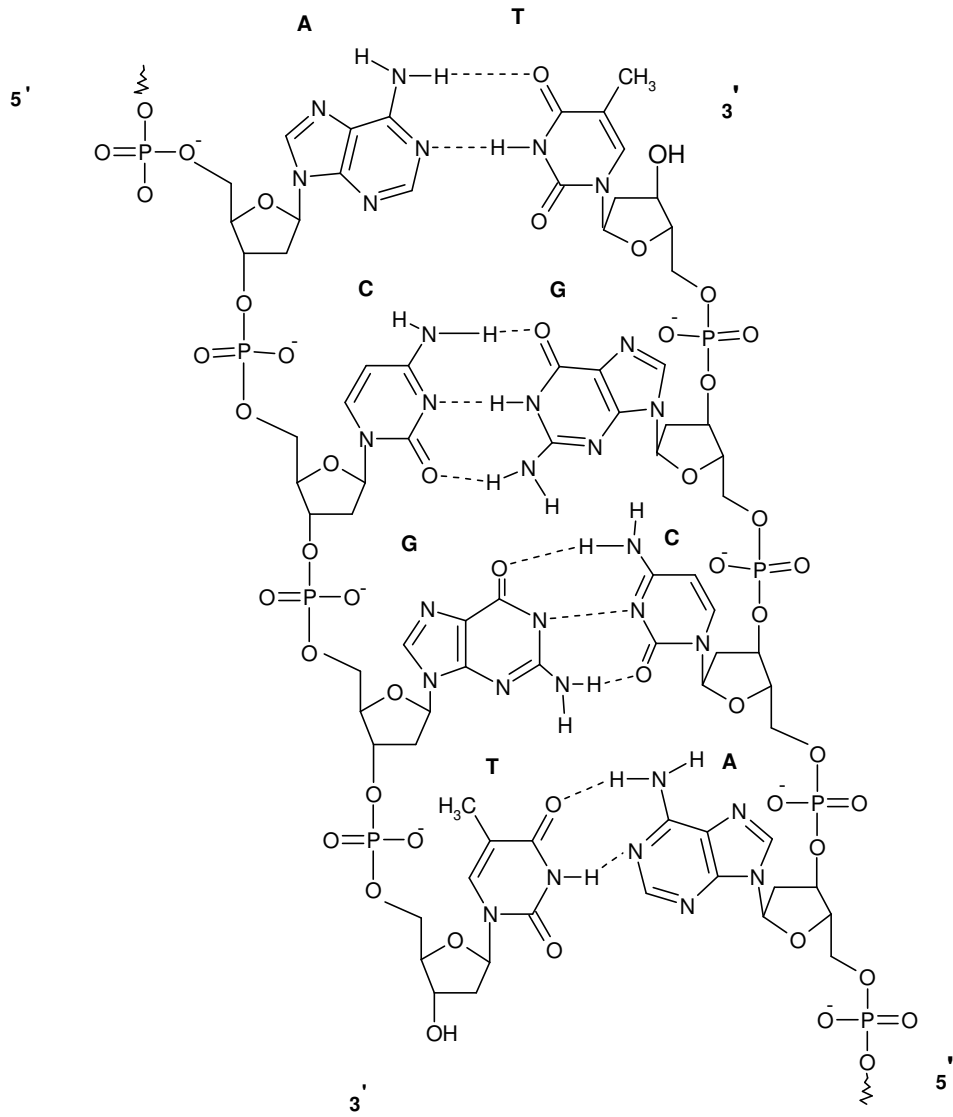
DNA' nın ilk X-ray fotoğrafından DNA bazlarının birbirleriyle sıkıca istiflendiği anlaşılmıştır.⁴ Gulland⁵ yaptığı çalışmaları sonunda bazların birbirleriyle hidrojen bağlarıyla bağlandığını rapor etmiştir. Watson ve Crick,⁶ Wilkins⁷ tarafından çekilen X-ray fotoğrafıyla beraber, bu konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarının sonuçlarını da değerlendirerek Adenin ile Timin, Sitozin ile Guanin arasında spesifik hidrojen bağları olduğunu ileri sürdüler (Şekil 1.2)



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

Watson, Crick çift sarmal modeli sağ el heliks yapısı göstermekte ve çift zincirin bir dönüşünde yapıya 10 baz çifti girmektedir. Baz çiftleri çift sarmal eksenine dik olacak şekilde yerleşmişlerdir. Bazların birbirleriyle istiflenmesi ve yapının kararlılığı London⁸ ve hidrofobik etileşmelerle⁹ sağlanır. İki zincir bazlar arasında meydana gelen hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanır.

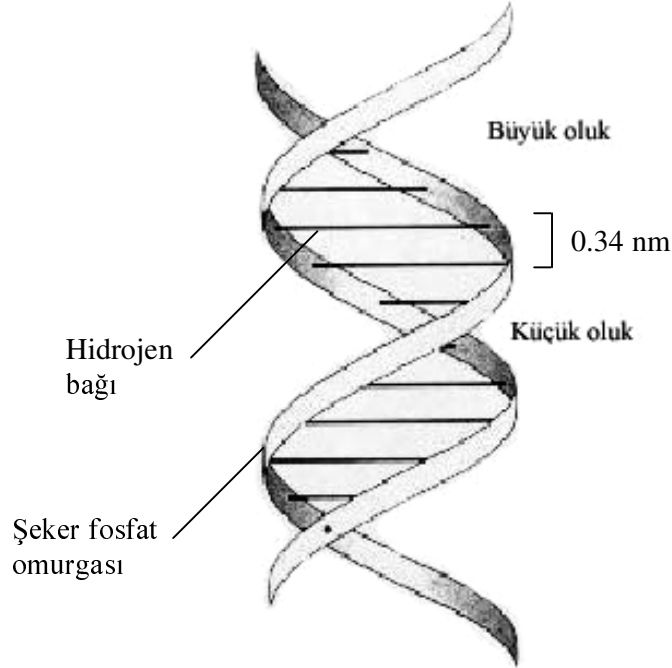
DNA' da bazlar heliksin eksenine boyunca, şeker fosfat omurgasıyla sarılmış bir şekilde yerleşmişlerdir. Şeker fosfat grupları birbirlerine 3', 5'-fosfodiester bağlarıyla bağlandıkları için DNA'nın bu kısmı çok düzgündür. Farklı iki DNA zincirlerinde zincir boyunca uzanan nükleotidlerin sırası farklıdır. Pürin ve pürimidin bazları yaklaşık düzlemsel moleküllerdir, heliks eksenine yaklaşık olarak diktirler ve üstüste istiflenmişlerdir. Heliksin iki zinciri bazlar arasındaki hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanırlar. (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. DNA ikili zincir yapısı

DNA'da bazlar heliks yapının iç kısmında şeker fosfat ise heliks yapının dış kısmında yer alır. Bundan dolayı bir zincirdeki bazlar diğer zincirdekine göre birbirlerine daha yakın olurlar. Bu yakınlıktan dolayı bir zincirdeki büyük pürin bazları arasında (A veya G) ile diğer zincirdeki küçük pürimidin bazları arasında spesifik baz çifti kaçınılmazdır. İki pürin baz çifti çok fazla, iki pürimidin baz çifti ise çok az yer kaplar ve bu da düzgün bir heliks yapıya olanak sağlamaz. Sonuçta Guanin ile Sitozin veya Adenin ile Timin arasındaki hidrojen bağları diğer kombinasyonlara göre daha güçlü olur. Guanin / Sitozin veya Adenin / Timin tamamlayıcı baz çiftlerini oluşturur, böylece heliks yapıdaki iki polinükleotid zincirindeki baz dizileri birbirlerinin tamamlayıcısı olurlar. Örneğin bir zincirdeki baz dizisi 5'-TGCATG-3' ise diğer zincirdeki 3'-ACGTAC-5' olur.¹⁰

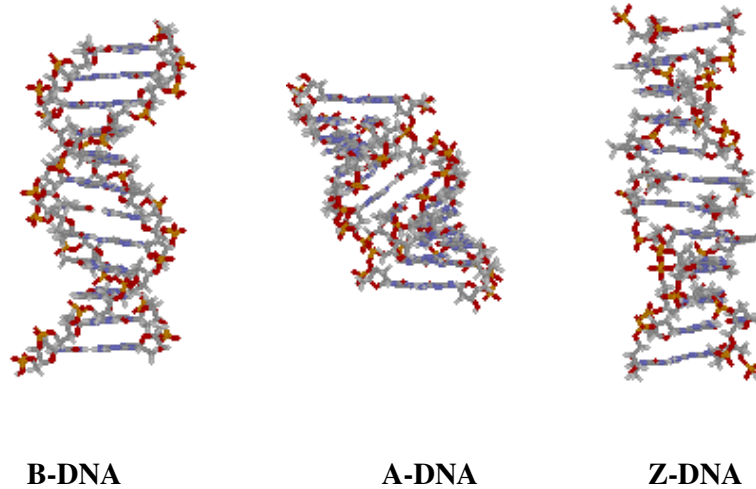
Baz çiftlerini şeker halkalarıyla birleştiren glikozidik bağlar birbirlerinin tam olarak karşısında olmadığı için heliksteki iki şeker fosfat omurgası heliks eksenine eşit uzaklıkta olmaz. Sonuç olarak büyük ve küçük oyuklar oluşur. (Şekil 1.4).



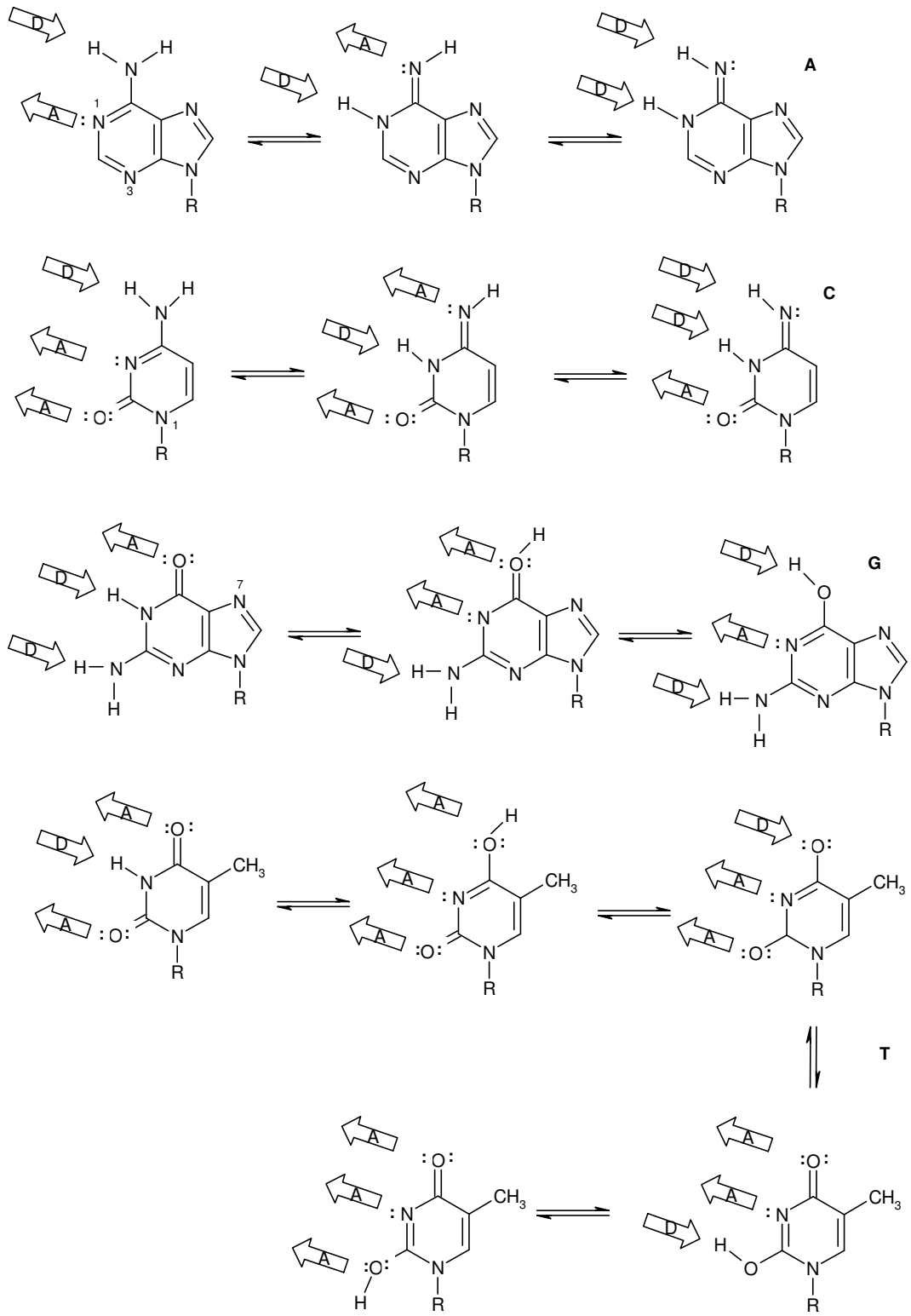
Şekil 1.4. DNA yapısı

DNA yapısındaki hidrojen bağları önemli olduğu için baz tautomerleşmesi de araştırılmıştır. Şekil 1.6'da görüldüğü gibi bir tautomerik formda hidrojen bağı yönünden donör olan bir grup diğer formda akseptör olabilir ve protonlar heterosiklik halkada farklı pozisyonlara geçebilirler. Bazlar için en kararlı tautomerik form olan amino grubuna sahip oldukları (A, G, C) amin formudur, imin formu kararlı değildir. Guanin ve timindeki oksijen atomları keto formda olmayı enol formda olmaya tercih ederler.¹¹

DNA'nın sarmal yapısı ile ilgili üç ana farklı konformasyonel yapı saptanmıştır; A-DNA ve B-DNA sağ sarmal, Z-DNA ise sol sarmal yapıdadır. (Şekil 1. 5). Her bir konformasyon iki tane antiparalel polinükleotid zincirinin Watson-Crick hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanması sonucu oluşur, fakat heliks şekilleri farklıdır. En baskın form B-DNA'da ikili sarmalın üst üste gelen baz çiftlerinin arası 0.34 nm'dir. Sarmalın tam bir dönüşüne karşılık gelen adımıysa 3.4 nm'dir. B-DNA'da her dönüşte 10 baz bulunur. Bu formdaki DNA'da sarmalın dış kısmında düzenli olarak sıralanmış bir büyük bir küçük oluk vardır. A-DNA, B-DNA'ya göre biraz daha sıkışık bir moleküldür. Sarmalın adımı 2.3 nm'dir ve 11 baz içerir. Z-DNA'da ise bir adımda 12 baz çifti bulunur. Sadece küçük oluk vardır, bazlar zikzak çizmiş gibi görünürler.¹⁰



Şekil 1. 5. DNA'nın üç farklı formu



Şekil 1. 6. DNA bazlarınıun hidrojen bağı yapan kısımları. D, Donör; A, Akseptör.

1. 2. DNA'ya Zarar Veren Maddeler Neden Önemlidir?

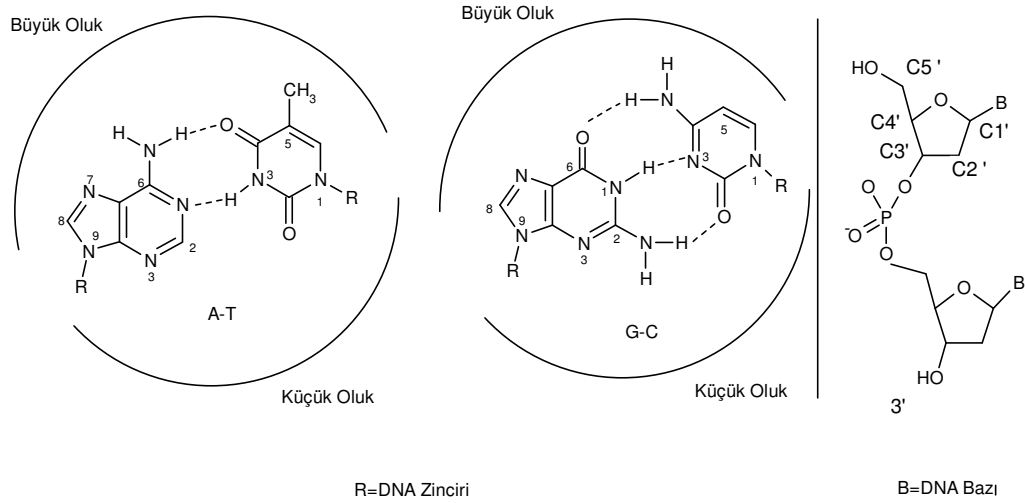
DNA'ya zarar veren maddeler Biyokimya ve Moleküler Biyolojide önemli rol oynarlar. Aynı zamanda gen terapisinde ve biyoteknolojinin gelişiminde büyük bir öneme sahiptirler. Bu tür maddeler, kanser terapisinde de önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı, DNA'ya bağlanabilen veya onunla reaksiyona girebilen küçük moleküllerin izolasyonu ve sentezine yönelik çalışmalara ciddi bir yönelme olmuştur.

Biyolojik aktivite gösterme potansiyeline sahip doğal ürünlerin, doğal seleksiyon sonucu oluştuğuna inanılır.¹² Doğal ürünlerin neden olduğu DNA hasarı genelde sitotoksik, ve mutajenik özellikler gösterir. Bundan dolayı hayatta kalma savaşında ya öldürücü ya da koruyucu silah olarak davranabilirler. Doğal ürünler yararlı organik bileşikler içinde geniş bir yer kaplarlar. DNA'ya zarar veren doğal ürünlere ilgi onların sitotoksik ve sitostatik etkilerinden kaynaklanır. Bu etkilerden dolayı DNA'ya zarar veren birçok doğal ürün çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılır. Bazıları ise terapötik ilaçlar için öncü olmuşlardır.¹³⁻¹⁶ Sonuç olarak yüksek biyolojik aktiviteleri olan doğal ürünler bazen beklenmedik yollarla biyolojik etki gösterebildikleri için, kompleks yaşam sürecini açıklamak için yararlı olabilirler.

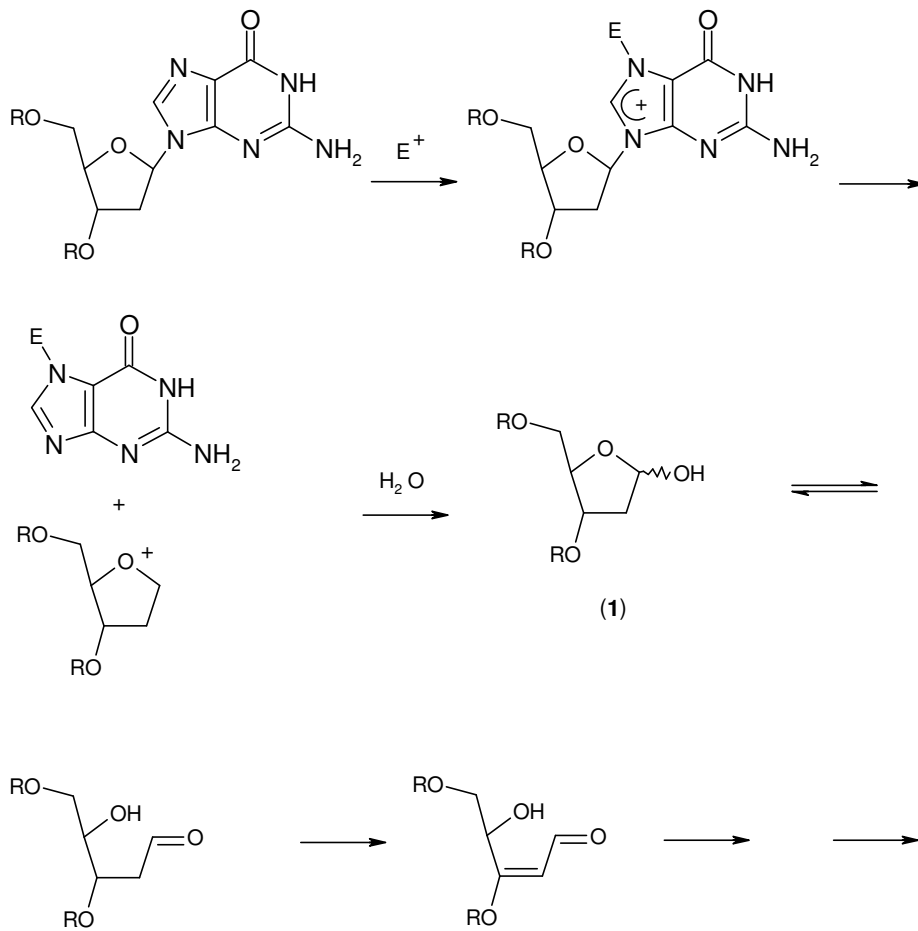
1. 3. Kovalent DNA Modifikasyonunun Genel Mekanizması

DNA'nın kovalent modifikasyon mekanizmaları iki kategoride sınıflandırılır: (i) Elektrofillerin DNA'nın nükleofilik kısımlarla reaksiyonu, ya da (ii) radikallerin DNA ile reaksiyonu.

Elektrofiller DNA yapısındaki farklı nükleofilik kısımlarla etkileşebilir. Kimyasal yapılarına bağlı olarak DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına selektivite gösterirler. DNA'da guaninin N-7, N-3 ve eksosiklik N² amino grubu ile adeninin N-7 ve N-3 kısımları doğal ürünlerle en çok modifikasyona uğrayan kısımlardır.¹⁷⁻²⁰ (Şekil 1.7).



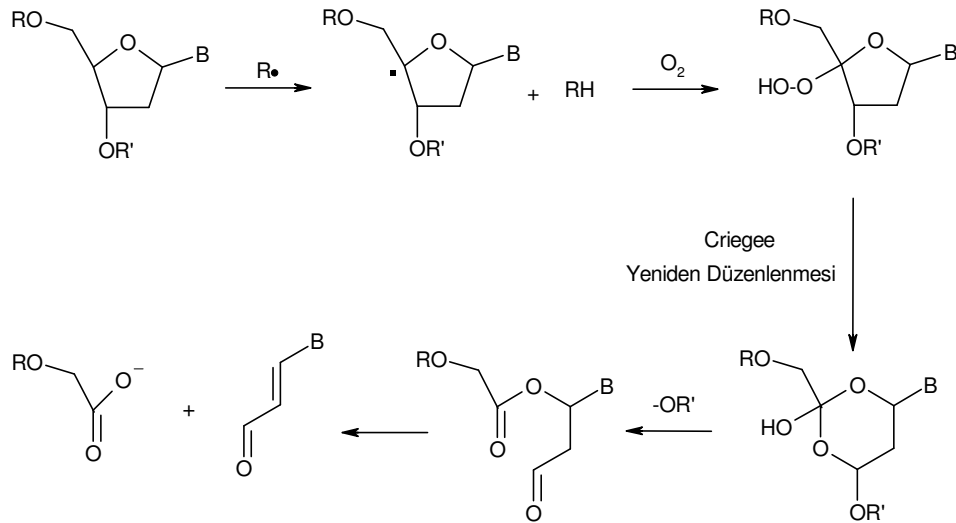
Şekil 1. 7. Watson–Crick baz çifti ve şeker fosfat omurgası



Şekil 1.8. Abazik bölge oluşumu ve DNA kesimi

Pürin kalıntılarının N-7 ya da N-3 pozisyonundan elektrofilik modifikasyonu glikozidik bağın zayıflamasıyla sonuçlanır. Bunun sonunda abazik bölge (1) oluşur ve nötral şartlarda bu bölgeler hidrolizlenerek DNA kesimi gerçekleşir²¹⁻²⁵(Şekil 1.8). DNA bazlarındaki exosiklik azot ve karbonil oksijenleri ya da DNA omurgasındaki fosfat oksijenleri ile elektrofik türleri reaksiyonu genellikle kararlı ürünler oluşturur.²⁶⁻²⁸

Bazı radikal türleri DNA ile değişik pozisyonlarda etkileşirler. DNA'nın radikaller tarafından hasara uğratılmasında en önemli yol deoksiribozdan hidrojen atomu koparılmasıdır.²⁹⁻³¹ Deoksiriboz şekerinden hidrojen atomu koparılması şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olur.³⁰⁻³¹(Şekil 1.9). Şeker fosfat omurgasına etkimeye ek olarak bazı radikaller de DNA bazlarıyla etkileşirler.³²⁻³⁵ Bu reaksiyonlar şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olmazlar fakat DNA yapısındaki modifikasyonlar biyolojik olarak önemlidirler. Spesifik bir bağlanma olmadığı zaman DNA kesimi genelde küçük dizilerle ya da baz özgünlüğüyle meydana gelir.³⁶ Bunun aksine alkilleyici ajanlarla DNA kesimi bir veya daha fazla DNA bazı için selektivite gösterir.



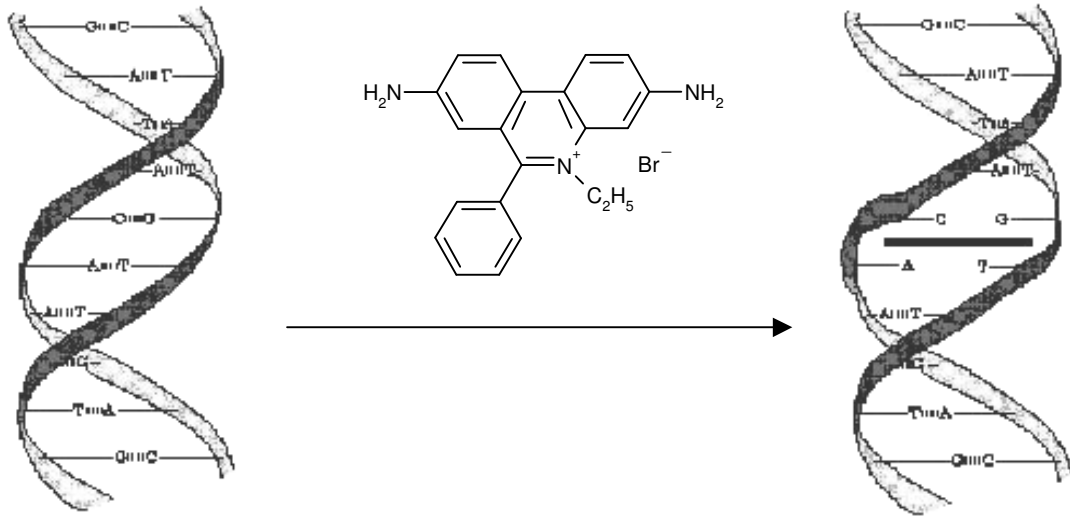
Şekil 1. 9. DNA şekerinden hidrojen atomu koparılması (R, R' = DNA omurgası)

1. 4. DNA İle Etkileşen İlaçlar

DNA ile etkileşen ilaçları üç ana başlık altında toplayabiliriz: DNA'daki baz çiftleri arasına girerek α -heliks yapısını bozan interkalatörler; DNA bazlarıyla kovalent olarak bağlanan alkilleyici ajanlar ve radikal oluşturarak DNA polinükleotid zincirinde kesime neden olan DNA zincirini kıranlar.¹⁰

1. 4. 1. DNA İnterkalatörleri

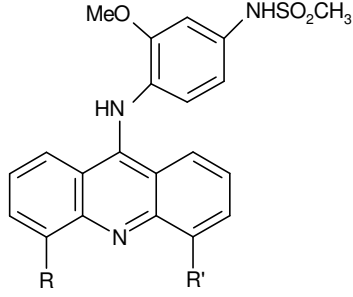
Düz, genellikle aromatik ya da heteroaromatik moleküller α -heliks yapıdaki baz çiftleri arasına girerek DNA'ya bağlanırlar ve baz çiftleriyle kümelenirler. İnterkalasyonda etkin olan kuvvetler yük transfer kuvvetleridir, fakat hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetler de kararlılıkta rol oynarlar.³⁷ İlk olarak 1961 yılında Lerman tarafından açıklanan interkalasyon, ilacın heliksin eksenine rijit bir şekilde, dik olarak kovalent olmayan bağlanmasıdır.³⁸ Bu da baz çiftlerinin düşey olarak ayrılmasına sebep olur, dolayısıyla şeker fosfat omurgası bükülür ve heliksin yapısı bozulur. Görünüşe göre interkalasyon güçle ilgilidir. Baz çiftleri ile interkalatör molekülü arasındaki van der Waals kuvvetleri, birbirleriyle kümelenmiş baz çiftleri arasındaki van der Waals kuvvetleri'nden daha güçlüdür.³⁹



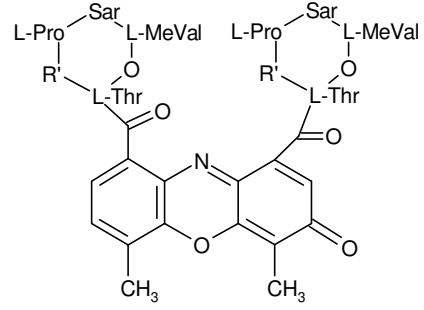
Şekil 1.10. Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu.

İnterkalasyon Watson-Crick hidrojen bağlarını kırmaz, heliks yapıyı deforme eder. Direk DNA hasarına sebep olmaz, heliks yapıda konformasyon değişikliğine yol açar.

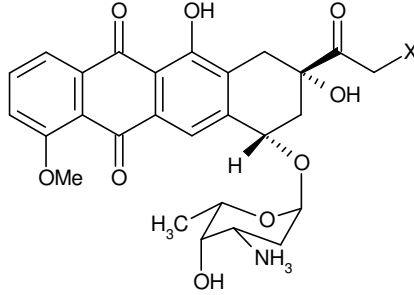
DNA interkalatörlerini üç gruba ayırabiliriz. Akridinler (2), aktinomisinler (3) ve anthrasiklinler (4).¹⁰



(2) Amsacrine, R=R'=H



(3) Actinomycin D, R=R'= D-Val



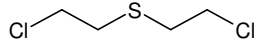
(4) Adriamycin, X=OH

1. 4. 2. Alkilleyici Ajanlar

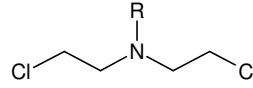
DNA alkilleyicileri ile interkalatörleri arasındaki fark bağlanma şekilleridir. DNA interkalatörleri DNA ile kovalent olmayan bağlarla bağlanırken, alkilleyici ajanlar kovalent bağlarla bağlanırlar. Kanser kemoterapisinde kullanılan en önemli alkilleyici ajanlar azot hardalları, etileniminler, metanosülfonik asit esterleri, ve platin kompleksleridir.¹⁰

1. 4. 2. 1. Azot Hardalları

Sülfür hardalı I. ve II. Dünya savaşlarında kullanılmış çok toksik sinir gazıdır. I. Dünya Savaşında sülfür hardalıyla ölen askerlerin otopsileri sonucu lökopeni (düşük beyaz kan hücresi), kemik iliği aplazi, lenf dokularında bozunma, ve gastrointestinal sistemde ülser saptanmıştır. Bu lezyonlar sülfür hardallarının hızlı bölünen hücrelere etkili olduğu sonucuna götürmüştü ve antitümör etkileri olabileceği düşünülmüştü. 1931 yılında sülfür hardalı insanlarda tümör hücresine enjekte edilmiş,⁴⁰ fakat bu işlemin sistematik kullanım için çok toksik olduğu ortaya çıkmıştır. Gillman ve diğer kimyacılar daha az toksik olan azot hardallarının antitümör etkisini incelemişler. 1942 yılında azot hardalının klinik denemeleri başlamıştır. Çalışma II. Dünya savaşı süresince devam etmiştir. Azot hardallarının 1946 yılından beri kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir.⁴¹ Bu çalışma modern kanser kemoterapisinin başlangıcı olmuştur.



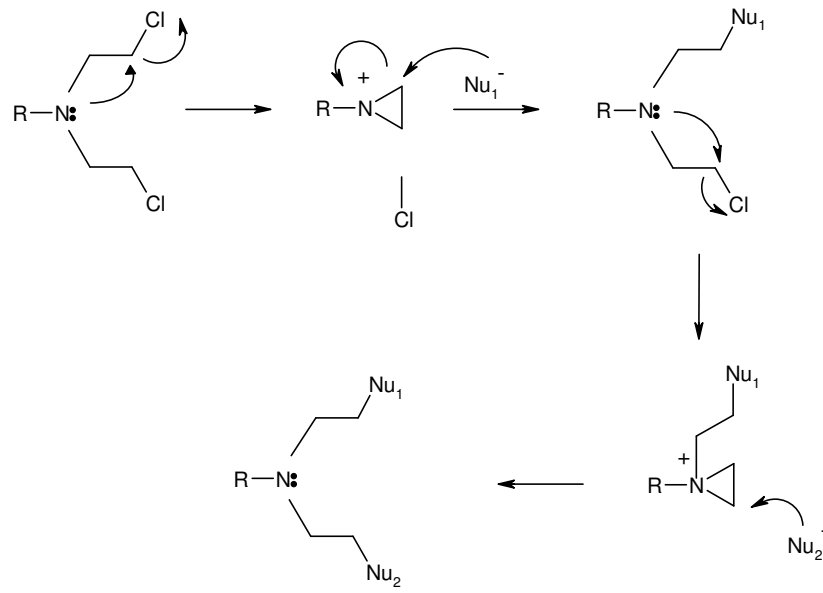
Sülfür hardalı



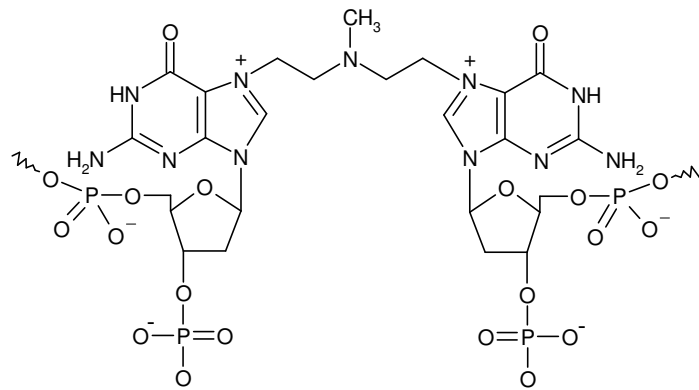
Azot hardalı

Ross'a göre biyolojik alkilleyici ajanlar fizyolojik koşullarda (pH 7.4, 37⁰ C, sulu çözelti) hidrojen atomuyla alkil grubunun yerini değiştirebilen moleküllerdir. DNA için en iyi reaktif olan nükleofilik kısımlar N-7 guanin > N-3 adenin > N-1 adenin > N-1 sitozin sıralamasıdır.⁴²

Azot hardalları bifonksiyonel alkilleyici ajanlardır, yani iki tane elektrofilik kısımları vardır. DNA bazlarını zincir içi veya zincirler arası bağlayabilirler. Azot hardallarının alkilasyonu şekil 1.11'da gösterilmiştir. Azot hardalları komşu iki DNA zinciri arasına girerek iki guanin bazını N-7 pozisyonundan alkilleyerek iki zinciri birbirine bağlayabilirler¹⁰(Şekil 1.12).



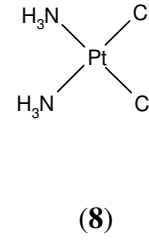
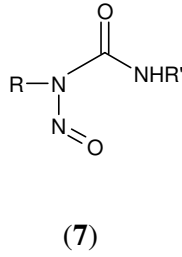
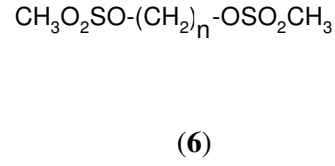
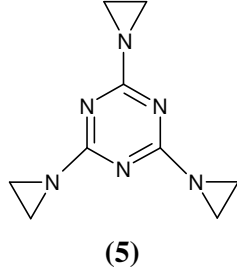
Şekil 1. 11. Azot hardallarıyla alkilasyon



Şekil 1.12. Azot hardallarının neden olduğu çapraz bağlanma

1. 4. 2. 2. Diğer Alkilleyici Ajanlar

Diğer alkilleyici ajanlar etileniminler (5), metanosülfonik asit esterleri (6), azot kaynaklılar (7) ve platin kompleksleridir (8).¹⁰

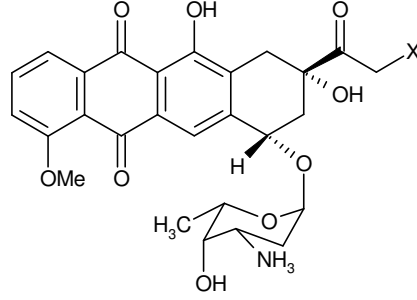


1. 4. 3. DNA Zincirini Kırınlar

DNA ile etkileşen ilaçların bazıları başta DNA interkalatörleri gibi bazların arasına girerler daha sonra uygun koşullarda radikalleri oluştururlar. Bu radikallerin DNA ile etkileşimi DNA zincirinin kırılmasına sebep olur.

1. 4. 3. 1. Antrasiklin Antitümör Antibiyotikleri

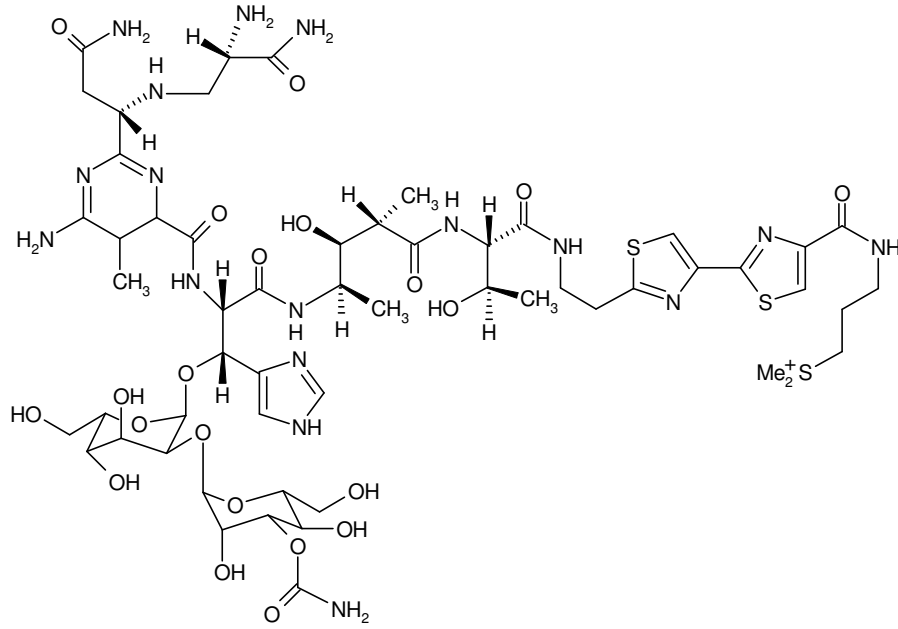
DNA interkalatörleri olan antrasiklinler aynı zamanda oksijene bağlı DNA hasarına da neden olurlar.⁴³



Doxorubicin, X = OH

1. 4. 3. 2. Bleomycin

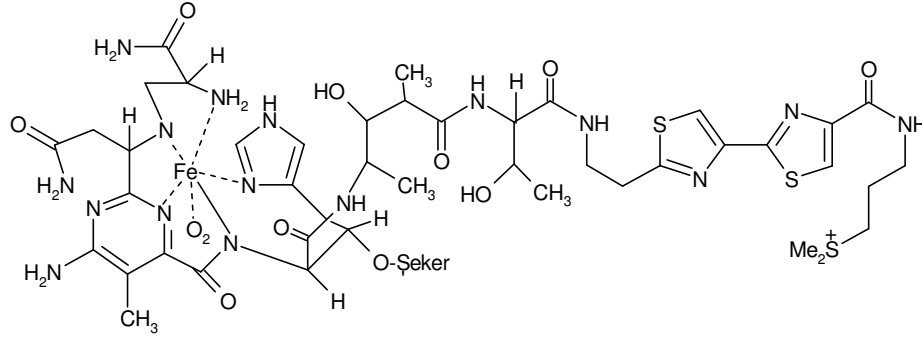
Bleomycin 1966 yılında *Streptomyces verticillus*'tan izole edilmiş bir antitümör antibiyotiktir.^{44,45}



Bleomycin

Bleomycinde pirimidin, β -aminoalanin ve β -hidroksiimidazol Fe(II) ile DNA kesim etkisi olan kararlı bir kompleks oluşturur. NMR ve hidrodinamik çalışmalar yapıdaki bithiazolun interkalasyon etkisi olduğunu, fakat bu interkalasyonun klasik interkalatörler (etidyum bromür vb.) kadar etkisi olmadığını göstermiştir.^{46,47} Bazı çalışmalar bithiazolun tam interkalate olmadığını fakat DNA yapısındaki oluklara bağlandığını göstermiştir.^{48,49} Yapıdaki sülfonyum iyonunun fosfat grubu ile

elektrostatik olarak etkileşme olasılığı vardır.⁵⁰ Glikoz, mannoz ise bleomicinin bazı kanser hücrelerinde selektif olarak birikiminden sorumlu olabilirler, fakat DNA kesiminde rol almazlar.



Bleomycin-Fe II Kompleksi

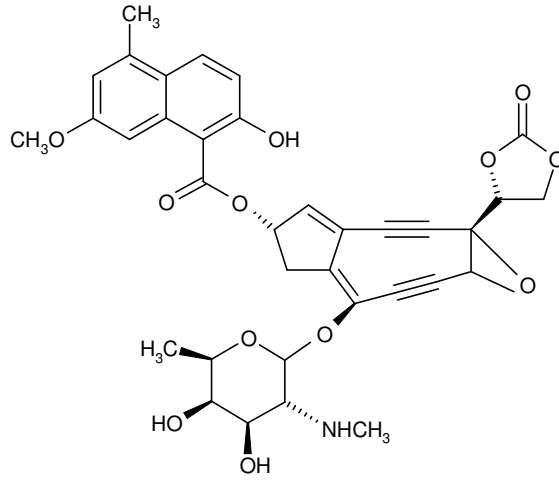
DNA kesim ürünlerinin incelenmesiyle, kesimin genellikle DNA zincirinin 3' ucundaki pürin nükleotidine bağlı olan pürimidin nükleotinin 4' karbon atomundan hidrojen koparılmasıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır.⁵¹

1. 4. 3. 3. Eneleyen Antibiyotikleri

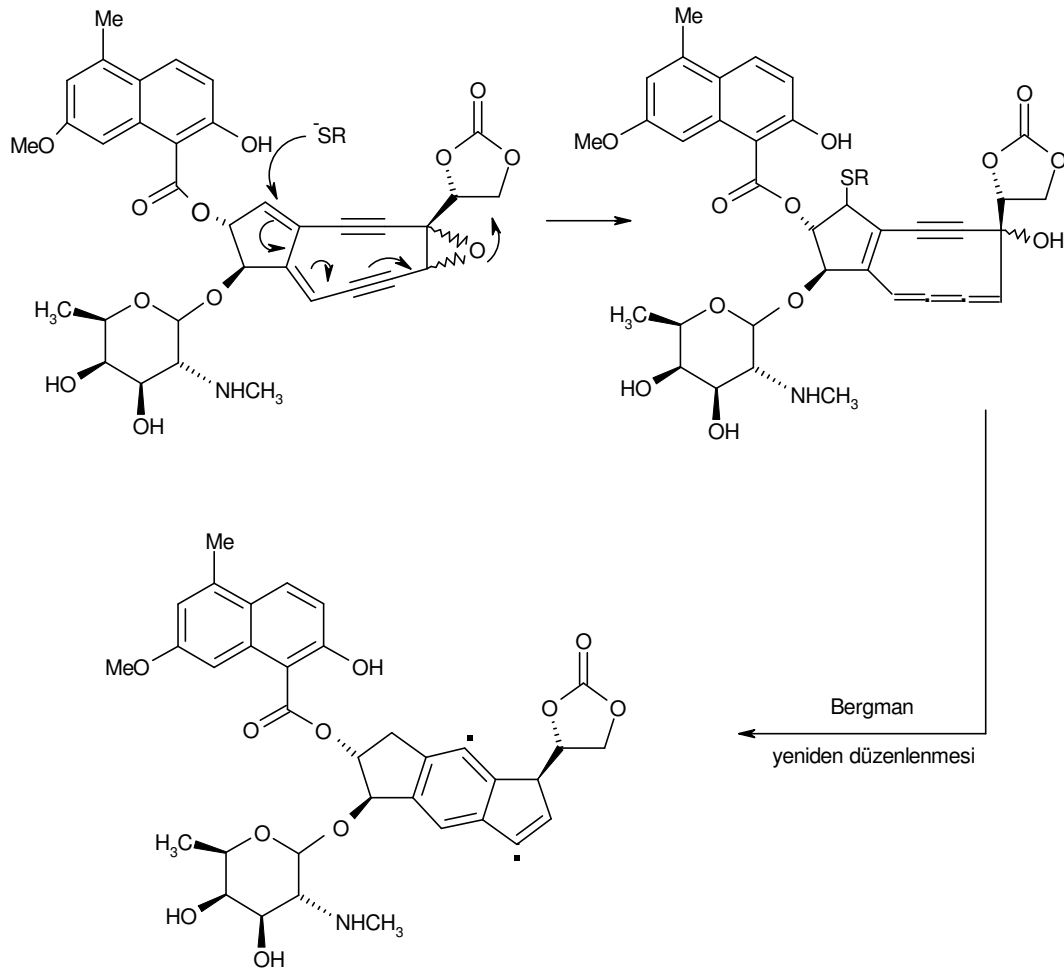
1965 yılında izole edilen neocarzinostatin⁵² dışındaki eneleyen antibiyotikleri esperamicin,⁵³ calicheamicin,⁵⁴ ve dynemicin A⁵⁵ 1980'lerin sonlarına doğru çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmişlerdir. Yapılarında en az bir çift bağ ve iki üçlü bağ bulduklarları için eneleyen antitümör antibiyotikleri olarak anılırlar. Bu tür moleküller DNA zincirinde küçük olukta interkalasyon yaparlar daha sonra SR veya NADPH gruplarıyla aktive edilerek DNA zincirini kesen radikallerini oluştururlar.

1. 4. 3. 3. 1. Neocarzinostatin

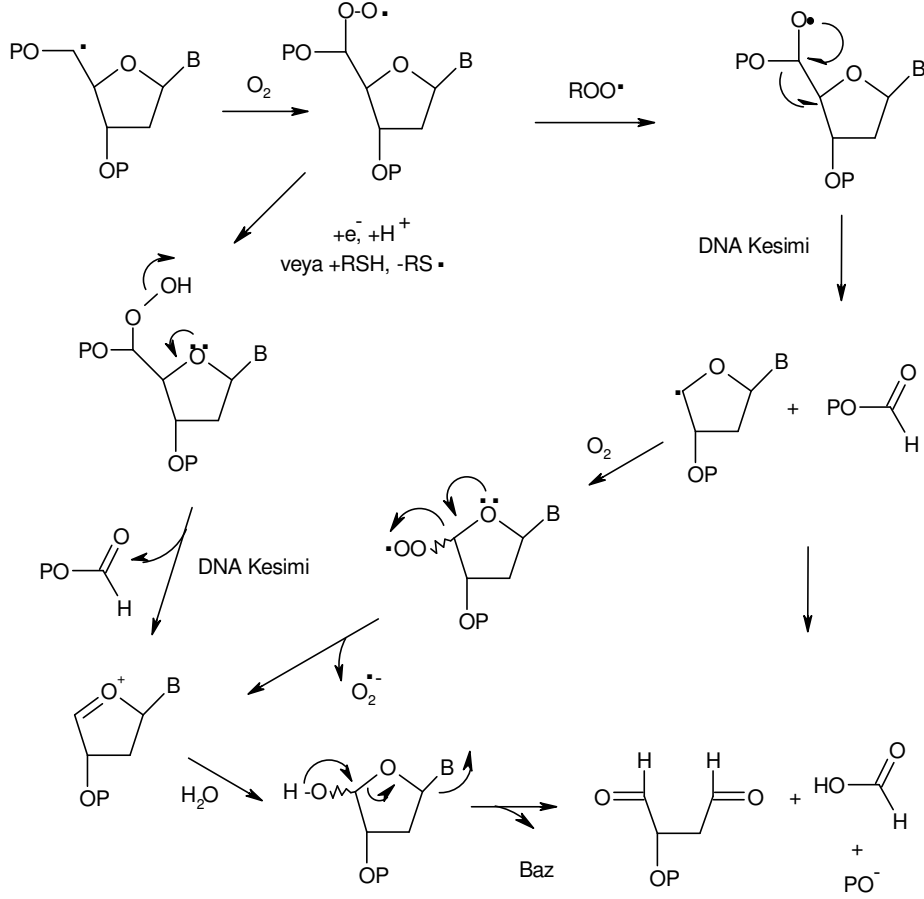
1965 yılında *Sterptomyces carzinostaticus*'tan izole edilmiştir.⁵² Bilinen en eski eneleyen antibiyotığıdır. Zinostatin olarak da bilinir.⁵⁶ Tiyol tarafından aktive edilerek Bergman, yeniden düzenlenmesiyle diradikal oluşturur. Oksijen varlığında iki farklı mekanizma ile DNA kesimi gerçekleşir.⁵⁷⁻⁵⁸



Neocarzinostatin



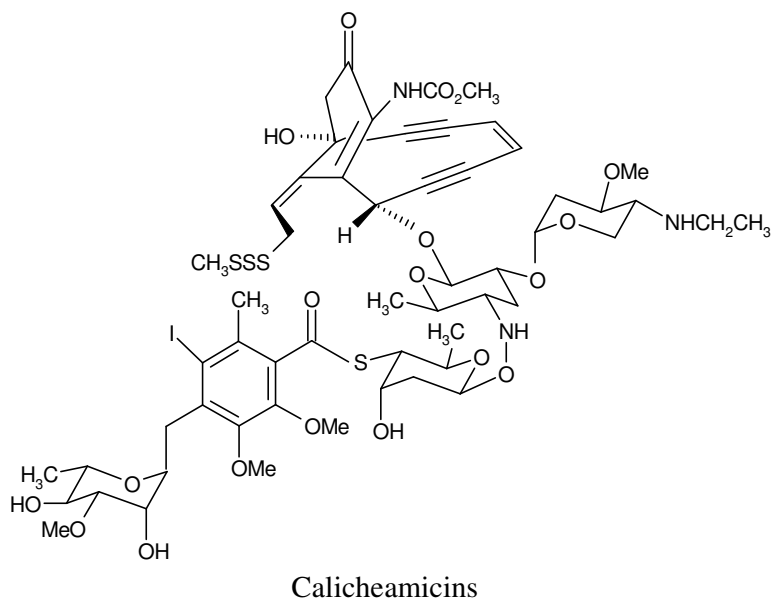
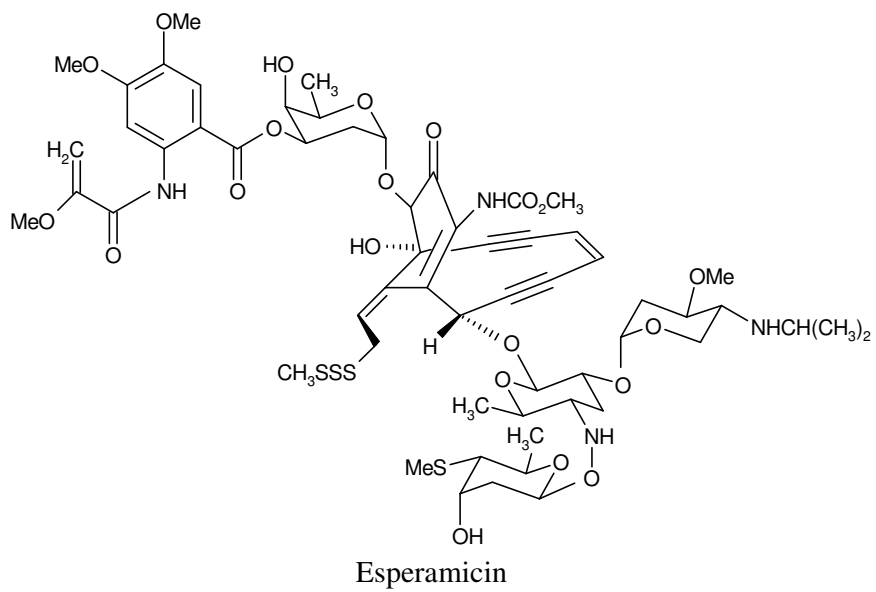
Şekil 1.13. Neocarzinostatinin tiyol ile aktivasyonu



Şekil 1.14. Aktive edilmiş neocarzinostatin ve diğer enediyen antibiyotikleri tarafından DNA kesim mekanizması.

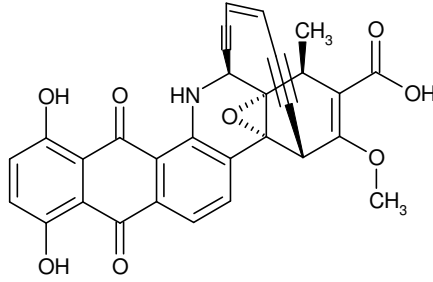
1. 4. 3. 3. 2. Esperamicin ve Calicheamicin

Esperamicin ve calicheamicin antitümör antibiyotiklerdir. Esperamicin *Actinomadura verrucosospora*, calicheamicin ise *Micromonospora echinospora* ssp. calichensis toprak örneklerinden izole edilmişlerdir.^{54,60,61} Neocarzinostatin gibi diradikal oluşturarak DNA kesimine sebep olurlar.⁵⁹



1. 4. 3. 3. 3. Dynemicin A

1989 yılında *Micromonospora chersina*'dan izole edilen dynemicin hem enediyen hem de antracycline antibiyotiklerinin yapısal olarak kombinasyonudur.⁵⁵ Yapısındaki antraquinonun DNA dubleksi arasına girerek interkalasyona sebep olduğu tahmin edilmektedir. Daha sonra neocarzinostatin gibi diradikal oluşturarak DNA şekerinden hidrojen atomu kopararak DNA kesimine sebep olurlar.

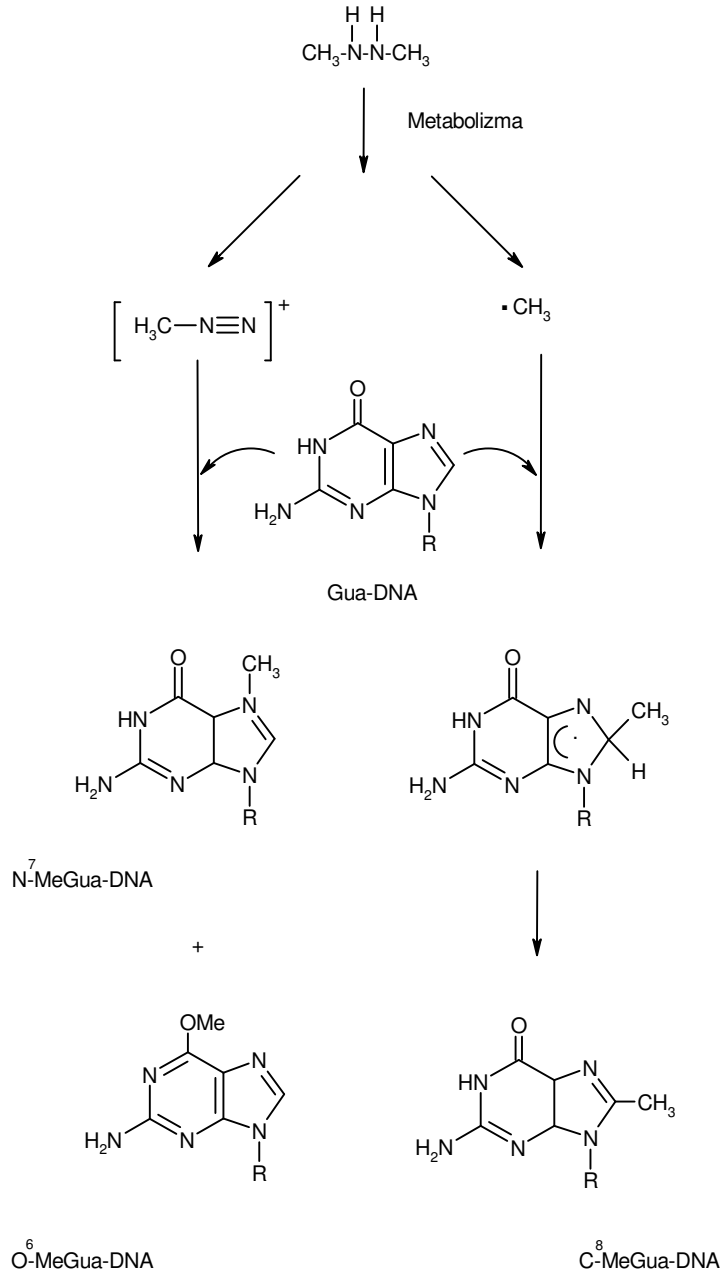


Dynemicin A

1. 5. Karbon Merkezli Radikal Metabolitleri

Karbon merkezli radikaller normal metabolizmada yüksek konsantrasyonlarda oluşmazlar.⁶¹ Oksidatif stress⁶² ve karbonhidrat⁶³ ya da amino asit^{64,65}, metabolizmasını etkileyen genetik düzensizlikler gibi patolojik durumlarda oluşurlar. Sonuçta karbon merkezli radikaller karbontetraklorür,^{66,67} hidrazin türevleri,⁶⁸ nitroalkanlar,^{69,70} etanol^{71,72}, diazoquinonlar^{73,74} ve organik hidroperoksitler^{75,76} gibi çeşitli kimyasalların metabolizması sonucu bazı genotoksik özelliklere bağlı olarak oluşurlar. (Tablo 1. 1). Polisiklik aromatik hidrokarbonların aromatik katyon radikallerine dönüşmesi serbest radikal ara ürünlerine güzel bir örnek olarak verilebilir.

Karbon merkezli radikaller moleküler oksijen ile çok hızlı etkileşerek, alkil radikalinden daha reaktif biomoleküller olan peroksit radikali gibi ürünler oluştururlar.⁷⁷ Kimyasal kanserojenlerle ilgili birçok çalışma DNA'ya kovalent bağlanmanın, kanserojenlerin alkildiazonyum iyonları ya da epoksitler gibi elektrofilik ara ürünleri aktive ederek iyonik mekanizma ile olduğu yönündedir.^{78,79} (Şekil 1.15) Karbon merkezli radikallerin DNA ile etkileşen reaktif türler olduğu bilinir.⁸⁰



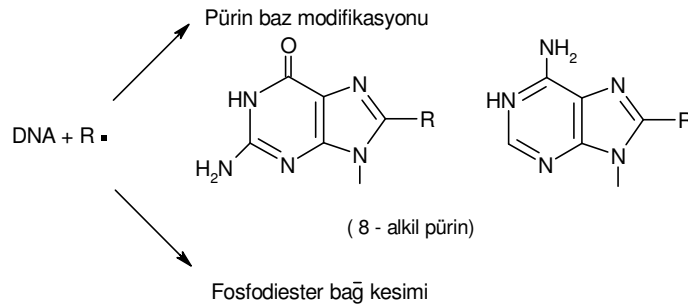
Şekil 1. 15. Alkil radikali ile DNA hasarı; 1,2-dimetil hidrazin ile DNA baz ürünlerinin oluşumu.

Xenobiotik	Serbest Radikal	Metabolit	Genotoksik Özellik
CCl ₄	Triklorometil	•CCl ₃	Hepatokanserojen ⁸¹
Hidrazinler	Alkil, Aril	R•, Ar•	Mutajen, kanserojen
Etanol	α-hidroksietil	H ₃ C- •CHOH	Teratojen
2-Nitropropan	α-hidroksiizopropil	(H ₃ C) ₂ •COH	Mutajen Hepatokanserojen ⁸¹
Diazoquinonlar	α-hidroksifenil	•ArOH	Mutajen ^{74,75}
Peroksitler	alkil, peroksil, alkoksil	R•, ROO•, RO•	Kanserojen ^{82,83} Promoter ^{75,76}
PAH ^a	Aril katyonu	Ar ⁺ -•CH	Kanserojen ⁸⁴

Tablo 1. 1. Genetoksik Xenobiotiklerden oluşan karbon merkezli serbest radikal metabolitleri.

^aPolisiklik aromatik hidrokarbonlar

Alkil radikalleri hidroksil radikalinden daha az reaktiftirler. Hem alkil radikali hem de hidroksil radikali DNA şekerinden hidrojen atomu kopararak ya da DNA bazlarıyla etkileşerek zincir kesimine ya da alkilasyona sebep olurlar.⁸⁵ (Şekil 1.15)



Şekil 1.16. Karbon merkezli radikal metabolitleri ile oluşan DNA modifikasyon şeması

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

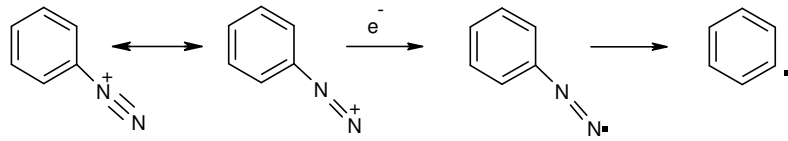
Literatür taraması üç yönde gerçekleştirildi. Aril radikalleri ve DNA kesimi, DNA kesiminin önlenmesi ve bitki ekstraktları ile DNA kesimi.

Önceki çalışmalarda aril radikallerinin DNA kesimine yol açtığı ve diazonyum tuzlarının bir elektron donör varlığında DNA'yı kestiği rapor edilmiştir.⁸⁶ Aynı zamanda bazı bitki ekstraktlarının veya bitkilerden izole edilen bileşiklerin DNA kesimini önlediği, yine bazı bitki ekstraktlarının veya bitkilerden izole edilen bileşiklerin Cu^{+2} varlığında DNA kesimine yol açtığı da yapılan literatür çalışması sonucu tespit edilmiştir.⁸⁷ Özellikle yenilebilen bir kültür mantarı olan *Agaricus bisporus*'un parçalanma ürünlerinin farelerde kanserojen etkiye sahip olması ve bu parçalanma ürünlerinden birinin benzendiazonyum iyonu olması⁸⁸ bizi değişik diazonyum tuzları sentezleyip bunların DNA kesim etkisini incelemeye yöneltmiştir.

Ayrıca antioksidant özelliği bilinen bitki ekstraktlarının bir kısmının DNA kesimini önlemesi antioksidant ve antimikrobiyal özellikleri belirlenen⁸⁹ bazı *Hypericum* ve *Achillea* türü bitkilerin DNA kesimini önleme kapasitesine bakmaya yöneltmiştir.

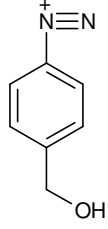
Aril Radikali ve DNA Kesimi

Griffiths ve Ark. yapmış oldukları çalışmada, bir elektron donör varlığında, benzendiazonyum tetrafloroboratin DNA'yı kestiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada benzendiazonyum suda iyi çözünmesi ve pozitif yüklü olmasından dolayı DNA kesimi için güzel bir model olabileceği düşünülmüş. Diazonyum tuzları pozitif yüklü oldukları için DNA yapısındaki negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşirler. Elektron donör varlığında azotun ayrılmasıyla aril radikali oluşur. Aril radikali de deoksiriboz şekerden hidrojen atomu kopararak DNA kesimini gerçekleştirir.⁸⁶

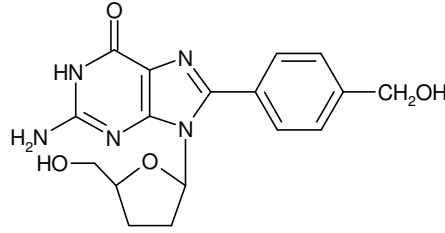


Şekil 2.1. Aril radikali oluşum mekanizması.

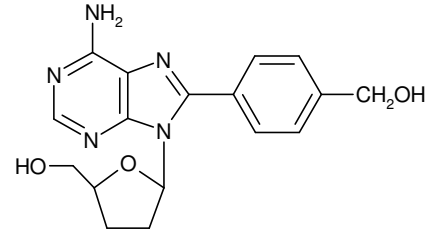
Başka bir çalışmada yenilebilir mantarda bulunan 4-(hidroksimetil)benzodiazonyum tuzunun **(9)** oluşturduğu karbon merkezli radikalın DNA bazları ve deoksiriboz şekeriyle modifikasyonu çalışılmıştır. 4-(hidroksimetil)benzodiazonyum tuzunun DNA yapısında bulunan bazlar ile N-8 pozisyonundan bağlanarak 8-HMP-dGuo **(10)** ve 8-HMP-dAdo **(11)** oluşturduğunu, deoksiriboz şekeri ile de malondialdehit oluşturduğunu rapor edilmiştir.⁸⁸



(9)

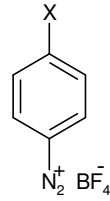


(10)



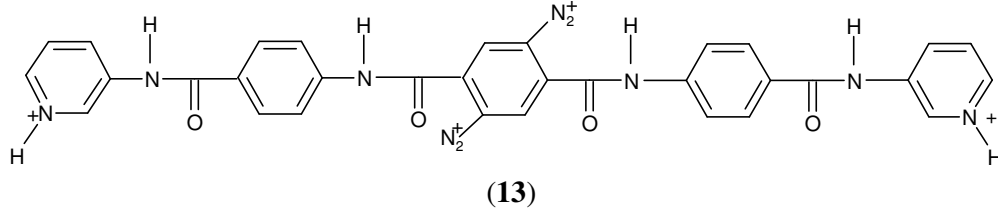
(11)

Reszka ve ark., diazonyum tuzları **(12a-d)**'yi kullanarak, diazonyum bileşiklerinin elektron donör varlığında aril radikale dönüştüğünü EPR spektrumlarını inceleyerek bulmuşlardır. Bu çalışma sulu çözeltide aril radikali elde etmek için arendiazonyum iyonların indirgenmesinin uygun metod olduğunu göstermiştir. Sonuçta, bu araştırma biyolojik indirgeyici maddelerin ArN_2^+ 'nu parçalayarak aril radikale dönüştürme yeteneğine sahip olduğunu doğrular.⁹⁰

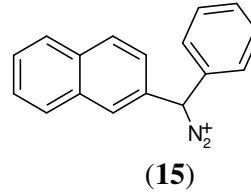
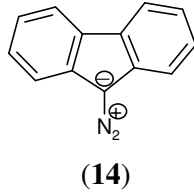


- (12)**
- a) X = MeO
 - b) X = Cl
 - c) X = Br
 - d) X = NO₂
 - e) X = N(Et)₂

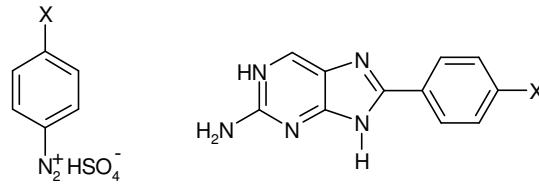
Başka bir çalışmada Dev P. Arya ve ark., farklı iki aril halkasında diazonyum grubu içeren 1,4-bisdiazonyum bileşiklerinin (13), bakır klorür varlığında 1,4-diradikalleri oluşturarak enediyen antibiyotikleri gibi DNA'yı kestiğini göstermişlerdir.⁹¹



Yine Dev P. Arya ve ark., 9-Diazofluoren (14) ve β -naftal fenil diazometan (15) bileşiklerinin bakır asetat varlığında, oksijenli ortamda pBR322 plazmid DNA'yı kestiğini göstermişlerdir. Reaksiyonları karanlıkta yaptıkları için kesim mekanizmasının ya karbon merkezli radikalın DNA deoksiriboz şekerinden hidrojen atomu koparmasıyla, ya da bakır asetatın DNA kesim etkisi olan Cu(I)-Oksijen kompleksi veya hidroksil radikali gibi aktif oksijen türleri oluşturarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.⁹²

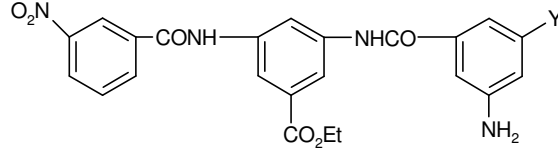


Başka bir çalışmada genel yapıları $p\text{-X-Ar}^+$ olan diazonyum tuzlarından $p\text{-X-Ar}^\cdot$ oluşabilecek koşullarda ctDNA ya da hürelerle etkileşimi sonucu guanin DNA ürünleri oluştuğu rapor edilmiştir. $p\text{-X-Ar}^\cdot$ oluşumu ESR ile açıklanmıştır.⁹³



Şekil 2.2. Arendiazonyum iyonları ve DNA'dan elde edilen C8-arilguanin ürünleri (X = CH₃, CH₂OCH₃, CH₂OH)

Warner ve ark., sübstitüe triarilamidler sentezleyerek bunların DNA kesim etkisinin incelemişler. Kesim etkisinin $a > c > b$ olduğunu gözlemlemişler.⁹⁴



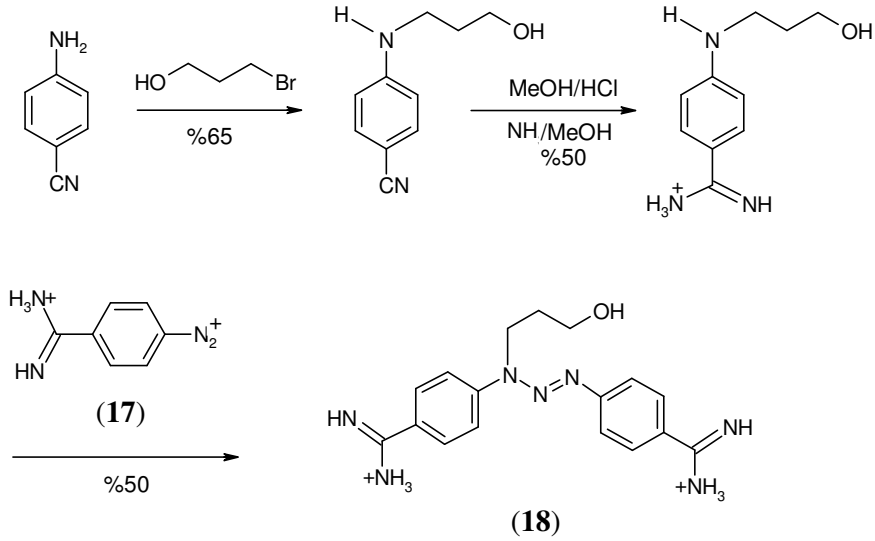
(16) a) Y = H

b) Y = NO

c) Y = OMe

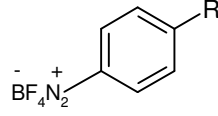
Şekil 2. 3. Sübstitüe triarilamidlerin DNA'yı kesimi

Başka bir çalışmada Burr ve ark., bir Berenil analogu olan *N*-(3-Hydroxypropyl)-Berenil (18) bileşiği ve 4-amidinobenzendiazonyum tuzunun (17) DNA kesimini incelemişler ve bu bileşiklerin DNA'yı kestiğini gözlemlemişler. (18) bileşiğinin parçalanarak (17) bileşiğini oluşturduğunu ve böylece kesimin başladığını rapor etmişlerdir.⁹⁵



Şekil 2. 4. *N*-(3-Hydroxypropyl)-Berenil sentezi

Kızıl ve ark., benzendiazonyum tetrafloroborat (**19a-c**) tuzlarını sentezleyip DNA kesimini incelemişler. Sonuç olarak farklı diazonyum tuzlarının bir elektron donör varlığında DNA'yı kestiğini gözlemlemişler. Kesim etkisi incelenen diazonyum tuzlarının radikal aktiviteleri ve DNA kesim etkileri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmediğini rapor etmişlerdir.⁹⁶



19 a) R = H

b) R = OH

c) R = CO₂H

DNA Kesiminin Önlenmesi

Attaguile ve ark., halk arasında çeşitli deri hastalıklarının tedavisinde, ayrıca ağrı kesici olarak ve antidiyaretik ilaç olarak kullanılan *Cistus incanus* L. ve *Cistus monspeliensis* L.'nin bitki ekstraktlarının antioksidant ve DNA kesim etkilerini araştırmışlardır. Bu tür bitkiler flavonoid içerirler ve DNA zincirini kırabileceği düşünülen antioksidant maddelerdir. Bu bitki ekstraktlarının DNA kesimini önlediği ve doza bağlı olarak radikal söndürme kapasitesi olduğunu gözlemlemişlerdir.⁹⁷

Yine başka bir çalışmada bioflavonoidlerin antiradikal, antioksidant ve DNA kesimini önleme kapasitesi incelenmiştir. Doğal polifenolik bileşikler olan flavonoidler insanlar tarafından tüketilen meyvelerde ve sebzelerde bulunurlar. En büyük kaynak elma, soğan, dut gibi yiyecekler ve çay gibi içeceklerdir. Sonuç olarak bioflavonoidlerin (rutin, catechin ve naringin) doza bağlı olarak serbest radikalleri söndürdükleri ve DNA kesimini önledikleri rapor edilmiştir.⁹⁸

Yine Russo ve ark., Hint şifalı bitkilerinin antiradikal ve DNA kesimini önleme kapasitelerini araştırmışlardır. *Celastrus paniculatus* L., *Picrorhiza kurroa* L. ve *Withania somnifera* L., epilepsi, uykusuzluk, raşitizm, gut ve hasımsızlık tedavisinde kullanılan şifalı bitkilerdir. Bu çalışmada bitkilerin metanol ekstraktlarının, H₂O₂'tin

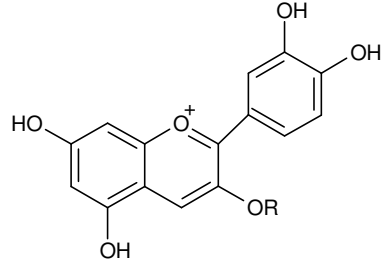
UV-fotolizi sonucu oluşan DNA hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bütün ekstraktlar doza bağlı olarak serbest radikal söndürme ve DNA kesimini önleme etkisi göstermişlerdir. *Picrorhiza kurroa* L.'nin metanol ekstraktının diğer bitki ekstraktlarına göre daha etkili olduğu gözlenmiştir.⁹⁹

Başka bir çalışmada kırmızı portakal ekstraktının DNA kesimi üzerine etkisi incelenmiş. Kırmızı portakallar flavonlar, hidroxcinnamic asitler ve askorbik asit gibi antioksidant bileşiklerin yanında; yüksek oranda antrocyaninler de içerirler. Ekstrakt DNA kesimi üzerinde koruyucu etki ve doza bağlı olarak da radikal söndürme kapasitesi göstermiştir.¹⁰⁰

Acquaviva ve ark., Resveratrol'ün DNA kesimi üzerindeki etkisini incelemişler. Resveratrol şarapta bulunan doğal phytoalexin maddesidir ve damar hastalıklarında koruyucu etkisi olduğu bilinir. Bu çalışmada Resveratrol'ün doza bağlı olarak serbest radikal söndürme kapasitesi ve DNA kesimini koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁰¹

Wang ve arkadaşları Lotus Plumule ve Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.)'um antioksidant etkisi incelenmiş. Lotus plumule çeşitli alkaloidler içerir ve halk arasında antihipertansif ilaç olarak kullanılır. Lotus blossom ise alkaloidler, organik asitler, amino asitler ve β -carotenoidler içerir. Hidroksil radikali söndürme etkisi incelendiğinde Lotus Plumule ve Blossom'un doza bağlı olarak hidroksil radikalini söndürdüğü rapor edilmiştir.¹⁰²

Yine Acquaviva ve ark., cyanidin ve cyanidin 3-O- β -D-glikozid'in DNA kesimini önleme kapasitesi ve antioksidant özelliğini incelemişlerdir. Çalışmada cyanidin ve cyanidin 3-O- β -D-glikozid'in DNA kesimi üzerine koruyucu etkisi olduğu ve doza bağlı serbest radikalleri söndürdüğü gözlenmiştir.¹⁰³

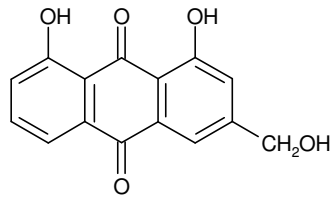


(20) R = H, Cyanidin

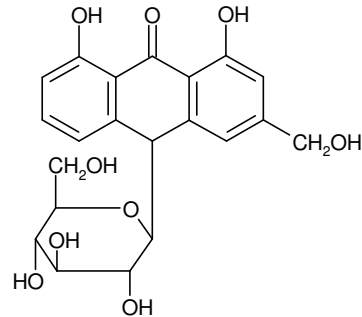
R = Glikoz, 3-O-β-D-glikozid

Russo ve ark., *Bacopa monniera* L.'nin serbest radikal söndürme kapasitesini ve DNA hasarını önleme etkisini araştırmışlardır. *Bacopa monniera* L. klinik olarak hafıza kaybında, epilepside, uykusuzluk probleminde ve ağrı kesici olarak kullanılır. Çalışmada *Bacopa monniera* L.'nin metanol ekstraktı kullanılmıştır. Doza bağlı olarak hidroksil radikalini söndürdüğü ve DNA kesimini önlediği rapor edilmiştir.¹⁰⁴

Tian ve ark., aloin (21) ve aloe-emodin'in (22) konsantrasyona bağlı olarak prooksidant ve antioksidant etkilerini incelemiştir. Yüksek konsantrasyonlarda aloin'in hidroksil radikaline bağlı olan DNA kesimini %5-30 oranında önlediği, tam tersine düşük konsantrasyonlarda ise kesimi arttırdığı gözlenmiştir. Aloe-emodin'in düşük konsantrasyonlarda çok az antioksidant etki gösterdiği, yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidant etki göstererek DNA kesimini %29-35 oranında azalttığı tespit edilmiştir.¹⁰⁵



(21)

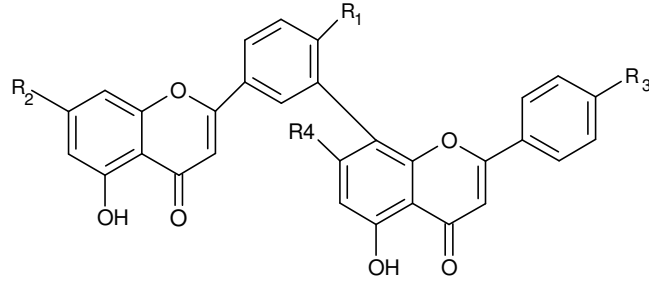


(22)

Başka bir çalışmada Rooibos çayının (*Aspalathus linearis*) antioksidant aktivitesi ve DNA kesimini önleme kapasitesi araştırılmıştır. Çalışmada etanol ve su ekstraktları kullanılmıştır. Hem etanol ekstraktının hem de su ekstraktının pozitif kontrol olan Trolox ile hemen hemen aynı oranda hidroksil radikalinden kaynaklanan DNA kesimini önlediği gözlenmiştir.¹⁰⁶

Yen ve ark., lotus seed ekstraktının antioksidant özelliklerini ve insan lenfositleri üzerindeki DNA kesim etkisini araştırmışlardır. Lotus seed'in kaynatılmış su ekstraktının güçlü antioksidant etki gösterdiği bulunmuştur. Su ekstraktının lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerinde hem hidrojen peroksitli ortamda hem de hidrojen peroksitsiz ortamda hiçbir etkisi olmadığı gözlenmiştir.¹⁰⁷

Yamaguchi ve ark., Brezilya çamı *Araucaria angustifolia*'nın içerdiği bioflavonoidlerin DNA hasarı üzerindeki koruma etkisinin incelemişler. *Araucaria angustifolia*'da bulunan 6 tane biflavonoidi HPLC/MS ile analiz etmişler. Doza bağlı olarak *Araucaria angustifolia*'nın DNA kesimini önlediğini bulmuşlardır.¹⁰⁸



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ amentoflavone

Mono-*O*-methylamentoflavone

Di-*O*-methylamentoflavone

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$ ginkgetin

Tri-*O*-methylamentoflavone

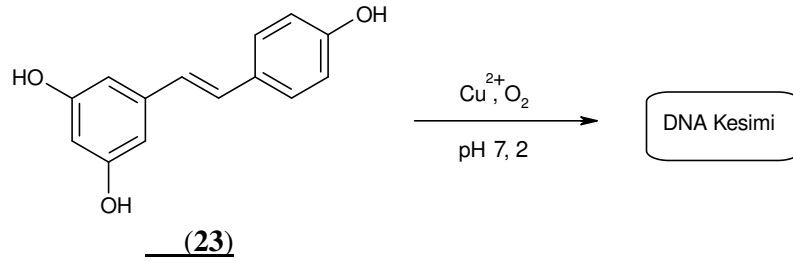
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$ tetra-*O*-methylamentoflavone

Şekil 2. 5. Brezilya çamı *Araucaria angustifolia*'nın içerdiği biflavonoidler.

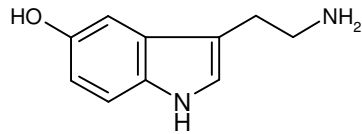
Ahmad ve ark., bitki kaynaklı bir polifenolik bileşik olan resveratrolün prooksidant aktivitesini bakır iyonu varlığında incelemişler. Resveratrolün antikanser ve kardiyovasküler özelliklerinin olması bir çok araştırmacıların bu moleküle olan ilgisini arttırmıştır. Bu çalışmada resveratrolün bakır iyonu varlığında prooksidant özelliği olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün bakır iyonu varlığında plazmid DNA'da mutasyona sebep olduğu, tek başına ise birçok Guanin bazını sildiği belirlenmiştir.⁸⁷

Bitkiler İle DNA Kesimi

Bir doğal ürün olan Resveratrol'ün (3,5,4-trihidroksi-*trans*-stilben, **23**) bakır (II) klorür ve oksijen varlığında pBR322 plazmid DNA'yı kestiği gösterilmiştir. Diğer metaller varlığında Resveratrol'ün DNA kesimini başlatmadığı için Cu^{+2} 'nin DNA kesiminde Resveratrol spesifik metal iyonu olduğu rapor edilmiştir.⁸⁶

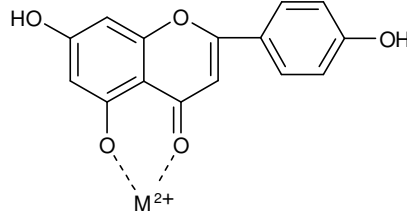


Hadi ve ark., serotoninin (**24**) Cu^{+2} varlığında DNA kesim etkisini incelemişler. Serotonin (5-hydroxytryptamine) beyinde ve omurilikte önemli bir nörotransmitterdir; uyku, bilinç, huysuzluk ve saldırı kontrolünde görev alır. Bu çalışmada Serotonin'in Cu^{+2} varlığında oksidatif mekanizma ile DNA kesimine sebep olduğu belirlenmiştir. Serotonin Cu(II) 'yi Cu(I) ' indirger ve bakır iyonu varlığında hidroksil radikali oluşur.¹¹⁰



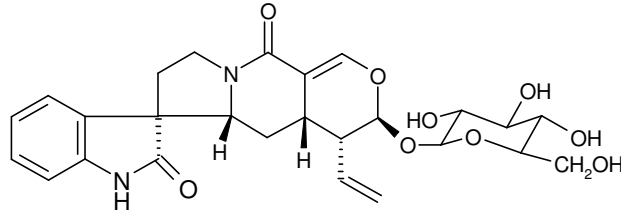
(24)

Uddin ve ark., biflavonoid olan amentoflavonenun bakır iyonu varlığında DNA kesimine sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Amentoflavone Cu(II)'yi Cu(I)'e indirger ve bakır iyonu varlığında hidroksil radikali oluşur. Ayrıca spektroskopik veriler Cu(II) varlığında amentoflavonenun (25) bakır iyonuna bağlanma kapasitesi olduğunu göstermiştir.¹¹¹



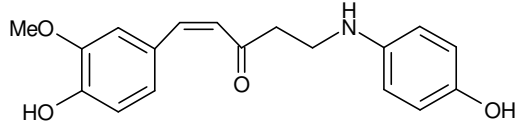
(25)

Ma ve ark. *Alangium javanicum*'dan izole ettikleri Javaniside'in (26) Cu²⁺ varlığında DNA kesimini başlattığını tespit etmişlerdir.¹¹²

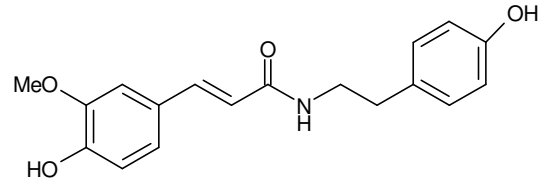


(26)

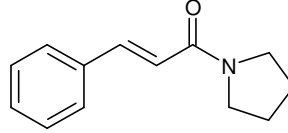
Ma ve ark., *Piper caninum*'un ham ekstraktının pBR 322 plazmid DNA'yı Cu²⁺ varlığında kestiği belirlenmiştir. Daha sonra ekstrakt fraksiyonlandırılarak in vitro olarak DNA kesim etkileri incelenmiş ve üç tane aktif bileşik izole edilmiş. Bunlar; *N-cis*-feruloyl tyramine (27), *N-trans*-feruloyl tyramine (28) ve 1-cinnamoylpyrrolidine'dir (29). 27-29 bileşikleri DNA kesimi gerçekleştiren maddeler içerisinde yapısal olarak yeni bir sınıfı temsil ederler.¹¹³



(27)

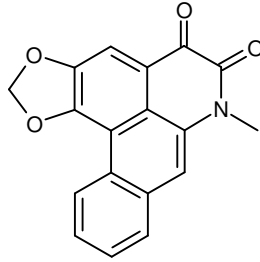


(28)



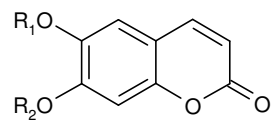
(29)

Ma ve ark., başka bir çalışmalarında yine *Piper caninum*'un DNA kesim etkisi gösteren bir fraksiyonundan 4,5-dioxoaporphine alkaloid cepharadione A (**30**) bileşiğini izole etmişlerdir.¹¹⁴



(30)

Yine Ma ve ark., *Malotus resinusus*'un köklerinden hazırladıkları ham ekstraktın Cu^{+2} varlığında DNA kesim etkisi olduğunu belirlemişler. Daha sonra DNA kesiminin basit bir coumarin olan scopoletin (**31a**) bileşiğinden kaynaklandığını rapor etmişler. pBR322 plazmid DNA kullanarak kesim etkisini in vitro olarak gözlemlemişler. (**31a**) bileşiğinin daha aktif olacağını düşündükleri üç analogunun da DNA kesim etkisini incelemişler. DNA kesim etkilerinin **31c**>**31a**=**31b**>**31d** olduğunu rapor etmişlerdir.¹¹⁵



- (31)** a) R₁ = CH₃ R₂ = H
b) R₁ = H R₂ = CH₃
c) R₁ = H R₂ = H
d) R₁ = CH₃ R₂ = CH₃

3. MATERYAL VE METOT

3. 1. Materyal

Bu çalışmanın materyalini oluşturan bitki örnekleri Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından toplandı ve teşhis edildi. Teşhis edilen bitki örnekleri Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Herbaryumunda (DUF) saklanmaktadır.

3. 1. 1. Kullanılan Bitki Türleri, Tanımları, Yayılışları ve Kullanım Alanları

Hypericum retusum, Diyarbakır: Çüngüş, Çermik-Çüngüş 17 km, tarla kenarından 27.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9503

Hypericum scabrum, Diyarbakır: Ergani, Ergani Maden 3 km yamaçlardan 25.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9501

Hypericum lysimachioides, Diyarbakır: Ergani, Ergani-Çermik 11 km, yamaçlardan 27.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9502

Achillea aleppica subsp. *aleppica*, Diyarbakır: Diyarbakır-Silvan 38 km, yol kenarından 28.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9504

Achillea aleppica subsp. *zederbaueri*, Mardin: Mazıdağı, Yukarı Konak köyü 2-3 km, yamaçlardan 18.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9500

Achillea biebersteinii, Diyarbakır: Diyarbakır-Siverek 45 km, yol kenarından 30.05.2003 tarihinde toplandı. No: DUF 9505

Hypericum türleri çok yıllık otsu bitkilerdir. Ülkemizde 78 türü bulunan *Hypericum*'un 13 türü Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yayılış göstermektedirler. Kantaron, kantarum, koyunkıran ve binbirdelik otu olarak bilinirler. Geleneksel tedavide yapraklı, çiçekli ve meyveli dalları ile kökleri kullanılır. Mide rahatsızlıklarında, inflamasyonda ve depresyon tedavisinde kullanılırlar.¹¹⁶ *Hypericum* türleri flavonoidler ve temel yağ asitleri içerirler.

Achillea türleri çok yıllık tüysü ve otsu bitkilerdir. Ülkemizde 40 türü bulunur ve bunlardan 8 türü Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yayılış göstermektedirler. Civanperçemi, akbaşı, barsam otu, binbir yaprak otu, marsam otu, kandil çiçeği olarak bilinirler. Geleneksel tedavide rahim hastalıklarında, idrar söktürücü ve iştah açıcı

olarak kullanılırlar.¹¹⁶ *Achillea* türleri eucalyptol, camphor ve α -terpineoller içerirler.

3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2,3-dimetil anilin, 2,6-dimetil anilin, 2,6-dietil anilin, 2-etil anilin, 3-etil anilin, 4-etil anilin, 2-kloro, 4-nitro anilin, 4-kloro, 2-nitro anilin, 2-anilin etanol, 4-hidroksi metil anilin, izoamil nitrit Fluka'dan, aseton Riedell'den, etanol Merck'ten, dietil eter, floroborik asit Aldrich'den, agaroz, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), bakır (I) klorür, bakır (II) klorür, sodyum iyodür, askorbik asit Sigma'dan ticari olarak temin edildi.

3. 1. 3. Kullanılan Aletler

Jel görüntüleme sistemi (Bio Rad Gel Doc XR), elektroforez (Bio Rad), güç kaynağı (Wealtec), NMR (Bruker 400 MHz), FT-IR (Mattson 1000 FTIR UNICAM Spectrometer), UV Spektrofotometre (Shimadzu, UV/Visible Recording spektrofotometre), santrifüj (Centruin 8000 Series), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), otoklav, çalkalayıcı (Memmert), terazi, pH metre (Mettler Toledo), vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell), blender, derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) kullanıldı.

3. 2. Metot

3. 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 yürütölmektedir. DNA şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı anottan katoda doğru hareket eder.

3. 2. 1. 1. Agaroz Jel'in 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. 1. 2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması

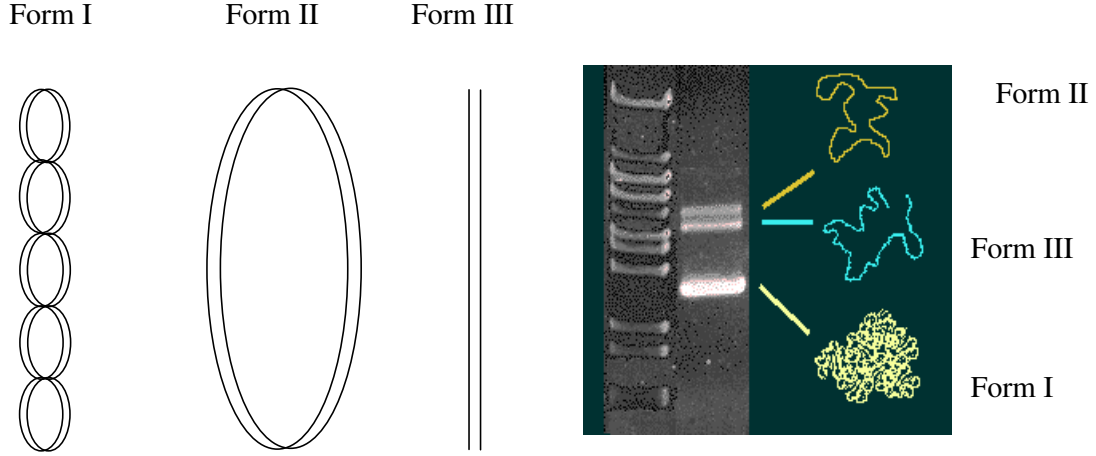
Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 mL Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 120 V'ta 500 mA akım uygulanarak 80 dakika süreyle yürütöldü. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı çekildi.

3. 2. 2. Plazmid Saflaştırma

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 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 için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir. (Şekil 3. 1)

Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) TENS yöntemi ve Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı.



Şekil 3. 1. Plazmid DNA

3. 2. 2. 1. TENS Yöntemi

37 °C' de Ampisilinli Luria Bertani (2.5g Tripton,1.25 g yeast extract, 2.5 g sodyum klorür, 0.025 g ampisilin, 250 mL saf su) sıvı besiyerinde üretilen bakteri kültüründen 20 tane Eppendorf tüpe 1'er mL alındı. 12500 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi, üst sıvılar uzaklaştırıldı. Her bir tüpe 300 µL TENS çözeltisi (100 mL'de: 10 mL 0.1 M TrisCl pH 7.5; 0.5 M 200 µL EDTA pH 8.0; 0.4 g NaCl; 1,5 g NaOH) eklendi ve ters düz edildi. 150 µL sodyum asetat çözeltisi (3 M pH 5.2) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 2 dakika 12500 rpm' de santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı, üzerine 1 mL soğuk mutlak etil alkol ilave edildi. -20°C' de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Etil alkol uzaklaştırıldı, pellet % 70' lik etil alkol ile yıkandı. 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra alkol uzaklaştırıldı. Etüvde 37 °C' de alkolün kalan kısmı uzaklaştırıldı ve 20 µL TE tamponu ilave edildi. Her bir tüpe konsantrasyon 20 µg/mL olacak şekilde ribonükleaz çözeltisi ilave edildi.

3. 2. 2. 2. Mini Prep

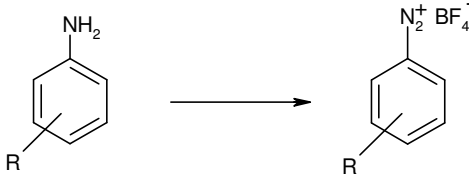
pBluescript M13+ plazmid DNA' sı Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı.⁹⁶ pBluescript M13+ plazmid DNA' nın saflığına, hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı.(50 µg/mL için A₂₆₀=1.0)

3. 2. 3. Diazonyum Tuzlarının Sentezlenmesi

Yenilebilir bir kültür mantarı olan *Agaricus bisporus*, hidrazin yapısına sahip agaritine (β -N-[γ -L(+)-glutamil]-4-hidroksimetilfenilhidrazin ve bunun parçalanma ürünlerini içermektedir. *Agaricus bisporus*'un parçalanma ürünlerinin farelerde kanserojen etkiye sahip olması ve bu parçalanma ürünlerinden birinin benzendiazonyum iyonu olması;⁸⁷ ayrıca yenilemeyen bir mantar olan *Agaricus xanthodermus* yapısında *p*-hidroksi benzendiazonyum iyonu bulunması¹¹⁷ bizi farklı süstitüe diazonyum tuzları sentezleyip bunların DNA kesim etkisini incelemeye yöneltti.

Genelde diazonyum tuzları klor tuzları olarak hazırlanırlar, fakat tetrafloroborat tuzları, klor tuzlarına oranla daha kararlı olduğu için bu çalışmada diazonyum tuzları tetrafloroborat tuzu olarak sentezlendi.

2,3-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (32), 2,6-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (33), 2,6-Dietil benzendiazonyum tetrafloroborat (34), 2-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (35), 3-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (36), 4-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (37), 2-Kloro, 4-nitrobenzen diazonyum tetrafloroborat (38), 4-Kloro, 2-nitrobenzen diazonyum tetrafloroborat (39), 2-Hidroksietil benzendiazonyum tetrafloro borat (40), 4-Hidroksimetil benzen diazonyum tetrafloroborat tuzu (41) bilinen yöntemlerle sentezlendi.^{89,96}

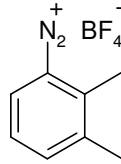


Kullanılan kimyasallar ve koşullar

İsoamyl nitrit, HBF₄ (aq.), EtOH, 0° C, 30 dakika

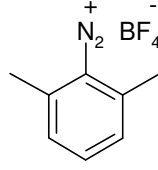
Şekil 3. 2. Diazonyum tuzlarının sentezi

2,3-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (32)



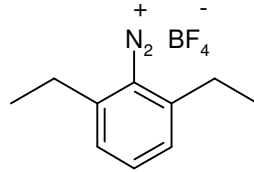
2,3-Dimetil anilin (0.25 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floroborik asit (%48'lik çözelti; 0.46 mL, 0.54g, 6.19 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.33 mL, 0.29 g, 2.47 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2,3-dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonunda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı (0.34 g, 1.5 mmol , % 74). e.n. 69-71 °C v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3043, 2932, 2264, 1609, 1562, 1094, 812; ¹H NMR (400Mz, CD₃COCD₃) δ 7.12 (1H, dd, *J* 8.2, 1.1 Hz, ArH), 7.05 (1H, ddd, *J* 8.0, 8.0, 1.1 Hz, ArH), 6.9 (1H, dd, *J* 8.2, 1.1 Hz, ArH), 2.28 (3H, s, CH₃), 2.16 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (100Mz, CD₃COCD₃) δ 9.7 (q), 18.6 (q), 112.2 (d), 122.9 (d), 125.2 (d), 139.1 (s), 159.9 (s), 162.3 (s)

2,6-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (33)



2,6-Dimetil anilin (0.26 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.46 mL, 0.54 g, 6.19 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.33 mL, 0.29 g, 2.47 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2,6-dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözümlenip, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı (0.1 g, 0.45 mmol , % 22). e.n. 86-87 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3063, 2932, 2257, 1610, 1584, 1080, 822; $^1\text{H NMR}$ (400Mz, CD_3COCD_3) δ 7.06 (1H, ddd, $J = 8.0, 8.0, 1.2$ Hz, ArH), 6.6 (2H, dd, $J = 8.3, 1.5$, ArH), 2.9 (6H, s, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100Mz, CD_3COCD_3) δ 15.6 (q), 119.4 (d), 123.6 (d), 128.2 (s), 129.5 (s).

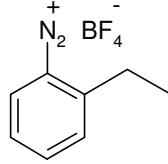
2,6-Dietil benzendiazonyum tetrafloroborat (34)



2,6-Dietil anilin (0.26 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.37 mL, 0.441g, 5.03 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.26 mL, 0.235

g, 2.01 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2,6-dietil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı (0.26 g, 1,04 mmol , % 51). e.n. 99-101 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3063, 2932, 2251, 1630, 1576, 1086, 816; ; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 7.06 (1H, ddd, $J = 8.0, 8.0, 1.2$ Hz, ArH), 6.9 (2H, dd, $J = 8.3, 1.5$, ArH), 2.9 (4H, m, CH_2), 2.6 (4H, m, CH_3); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 13.5 (q), 15.6 (q), 119.4 (d), 123.6 (d), 128.2 (s) 128.9 (s).

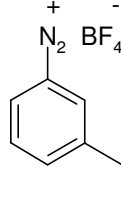
2-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (35)



2-Etil anilin (0.26 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.46 mL, 0.54 g, 6.19 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.33 mL, 0.29 g, 2.47 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2-etil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek açık mavi kristaller halinde saflaştırıldı (0,3 g, 1,36 mmol, % 65). e.n. 73-74 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 2978, 2937, 2264, 1641, 1562, 1094, 776; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 9.5 (1H, dd, $J 8.3, 1.5$ Hz, ArH), 9.3 (1H, ddd, $J 8.1, 8.1, 1.6$ Hz, ArH), 9.2 (1H, dd, $J 8.2, 1.1$ Hz, ArH), 9.0 (1H, ddd, $J 8.0, 8.0, 1.2$ Hz, ArH), 3.4 (2H, m,

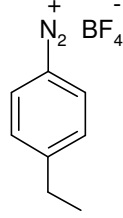
CH_2CH_3) 1.6 (3H, t, J 4.8 CH_2CH_3); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 13.7 (q), 22.9 (t), 114.7 (d), 119.5 (d), 126.6 (d), 129.1 (d), 130.2 (s), 209.0 (s).

3-Etilbenzen diazonyum tetrafloroborat (36)



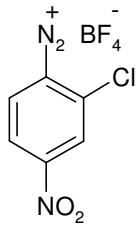
3-Etil anilin (0.26 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.46 mL, 0.54 g, 6.19 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.33 mL, 0.29 g, 2.47 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 3-etil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk aseton (~ 1 mL) çözümlenip, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek pembe kristaller halinde saflaştırıldı (0.25 g, 1.14 mmol, % 55). e.n. $68\text{-}70\text{ }^\circ\text{C}$ ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2970, 2932, 2270, 1642, 1470, 1080, 803; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 8.8 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 8.7 (1H, ddd, J 8.1, 8.1, 1.6 Hz, ArH), 7.2 (1H, dd, J 8.2, 1.1 Hz, ArH), 6.9 (1H, ddd, J 8.0, 8.0, 1.2 Hz, ArH), 2.9 (1H, s, J 7.5, ArH) 2.6 (2H, m, CH_2CH_3) 1.2 (3H, t, J 4.8 CH_2CH_3); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 14.0 (q) 15.1 (t), 112.4 (d), 114.6 (d), 186.9 (d), 129.2 (d), 145.7 (s), 157.3 (s).

4-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (37)



4-Etil anilin (0.26 mL, 0.25 g, 2.06 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.46 mL, 0.54 g, 6.19 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.33 mL, 0.29 g, 2.47 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 4-etil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonunda (~1 mL) çözümlenip, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek sarı kristaller halinde saflaştırıldı (0.20 g, 0.91 mmol , % 44). e.n. 87-88 °C v_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2978, 2932, 2264, 1641, 1584, 1086, 849; 1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 7.8 (2H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 7.5 (2H, dd, J 8.1, 1.5 Hz, ArH), 3.0 (2H, m, CH_2CH_3) 1.3 (3H, t, J 4.8, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 13.9 (q), 105.0 (t), 111.7 (s) 131. (d), 133.0 (d), 160.7 (s).

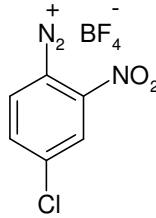
2-Kloro, 4-nitrobenzen diazonyum tetrafloroborat (38)



2-Kloro, 4-nitro anilin (0.25 g, 1.45 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.32 mL, 0.382 g, 4.35 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.23 mL, 0.204 g,

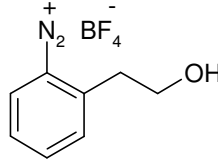
1.74 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2-kloro, 4-nitro benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonunda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı (0.15 g, 0,55 mmol , % 60). e.n. 162-163 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3063, 2991, 2276, 1641, 1562, 1080, 843; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 9.27 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 9.01 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 8.82 (1H, s, ArH); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 121.78 (s), 124.88 (s), 127.33 (d), 136.88 (d), 138.52 (d), 154.48 (s).

4-Kloro, 2-nitro benzendiazonyum tetrafloroborat (39)



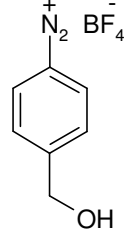
4-Kloro, 2-nitro anilin (0.25 g, 1.45 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floroborik asit (%48'lik çözelti; 0.32 mL, 0.382 g, 4.35 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrat (0.23 mL, 0.204 g, 1.74 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 4-kloro, 2-nitro benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonunda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı (0.17 g, 0.63 mmol , % 68). e.n. 125-127 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3063, 2967, 2284, 1649, 1562, 1344, 1173, 849; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 9.2 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 8.7 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 7.4 (1H, s, ArH); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 118.6 (s), 124.9 (s), 129.01 (d), 136.88 (d), 137.96 (d), 149.64 (s).

2-Hidroksietil benzendiazonyum tetrafloro borat (40)



4-Anilin etanol (0.25 g, 1.82 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.41 mL, 0.480 g, 5.47 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.29 mL, 0.256 g, 2.18 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 2-hidroksietil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter(30 mL) ilave edilerek yeşil kristaller halinde saflaştırıldı (0.30 g, 1.27 mmol , % 62). e.n. 118-120 °C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 2924, 2507, 2264, 1603, 1497, 1067, 756; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 7.9 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 7.7 (1H, ddd, J 8.1, 8.1, 1.6 Hz, ArH), 7.6 (1H, dd, J 8.2, 1.1 Hz, ArH), 7.5 (1H, ddd, J 8.0, 8.0, 1.2 Hz, ArH), 3.9 (2H, t, J 4.8 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) 3.48 (2H, m, J 4.8 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.13 (1H, t, CH_2OH); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 54.86 (t), 55.9 (t), 57.1 (s), 60.9 (d), 123.25 (d), 130.5 (d), 134.95 (d), 141.02 (s).

4-Hidroksimetil benzen diazonyum tetrafloroborat (41)



4-Amino benzil alkol (0.25 g, 2.03 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.45 mL, 0.535 g, 6.1 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C 'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.35 mL, 0.285 g, 2.44 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 4-hidroksimetil benzendiazonyum tetrafloroborat katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter(30 mL) ilave edilerek hardal renkli kristaller halinde saflaştırıldı (0.40 g, 1.8 mmol , %0.89). e.n.119-121°C v_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 2932, 2594, 2270, 1589, 1516, 1067, 830; ^1H NMR (400Mz, CD_3COCD_3) δ 8.7 (1H, dd, J 8.3, 1.5 Hz, ArH), 7.9 (1H, dd, J 8.1, 8.1, 1.6 Hz, ArH), 7.6 (1H, dd, J 8.2, 1.1 Hz, ArH), 7.5 (1H, dd, J 8.0, 8.0, 1.2 Hz, ArH), 4.9 (2H, d, J 7.5 CH_2OH), 1.13 (1H, t, CH_2OH); ^{13}C NMR (100Mz, CD_3COCD_3) δ 62.7 (t), 112.3 (s), 128.5 (d), 132.9 (d), 158.67 (s).

3. 2. 4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplanan bitkiler havadar ve gölge bir yerde 15-20 gün süreyle kurumaya bırakıldı. Çalışmada bitkilerin çiçekli ve yapraklı dalları kullanıldı. Tüm bitki türlerinden 20 g alınıp blender yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline gelen bitki örnekleri oda sıcaklığında 200 mL % 70' lik etanolde 3 gün süreyle karıştırıldı.

Çözünmeyen kısımlar filtre edilip atıldı. Süzüntülerin çözücüsü vakum altında uçuruldu.

H. retusum' dan 5 g (%25) mor renkli, *H. scabrum*' dan 5 g (%25) hardal renkli, *H. lysimachioides*' ten 5 g (%25) bordo renkli, *A. aleppica* subsp. *aleppica*' dan 3 g (%15) hardal renkli, *A. aleppica* subsp. *zederbaueri*' den 2 g (%10) hardal renkli ve *A. biebersteinii*' den 2 g (%10) hardal renkli etanol ekstraktları elde edildi.

Hypericum ve *Achillea* türü bitki ekstraktlarının 200-800 nm aralığında yapılan dalga boyu taranmasında *Hypericum* türü bitki ekstraktları (2 mg/mL) 379 nm'de, *Achillea* türü bitki ekstraktları (2 mg/mL) ise 382 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir.

3. 2. 5. Stok Diazonyum Tuzu Çözeltilerinin Hazırlanması

2,3-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (**32**), 2,6-Dimetil benzendiazonyum tetrafloroborat (**33**), 2,6-Dietil benzendiazonyum tetrafloroborat (**34**), 2-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (**35**), 3-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (**36**), 4-Etil benzendiazonyum tetrafloroborat (**37**), 2-Kloro, 4-nitrobenzen diazonyum tetrafloroborat (**38**), 4-Kloro, 2-nitrobenzen diazonyum tetrafloroborat (**39**), 2-Hidroksietil benzendiazonyum tetrafloroborat (**40**), 4-Hidroksimetil benzen diazonyum tetrafloroborat (**41**) tuzlarının çözeltileri su içerisinde 1.5 mM olacak şekilde 10 mL hazırlandı.

3.2.6. Stok Elektron Donör Çözeltilerinin Hazırlanması

Bakır (I) klorür, bakır (II) klorür, askorbik asit ve sodyum iyodür çözeltileri su içerisinde 3.1 mM olacak şekilde 50 mL hazırlandı.

3. 2. 7. Stok Bitki Ekstraktı Çözeltilerinin Hazırlanması

Hypericum retusum, *Hypericum Scabrum*, *Hypericum lysimachioides*, *Achillea aleppica* subsp. *aleppica*, *Achillea aleppica* subsp. *zederbaueri*, *Achillea biebersteinii*

bitkilerinin stok çözeltileri %70'lik etanol içinde 10 mg/mL olacak şekilde 10 mL hazırlandı.

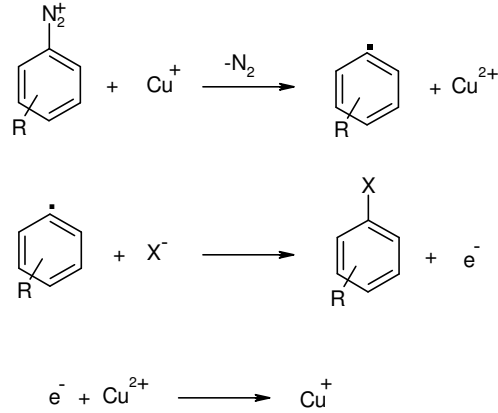
4. BULGULAR

4. 1. Diazonyum Tuzlarının DNA Kesim Etkisinin İncelenmesi

Sentezlenen diazonyum tuzlarının pBluescript M13+ plazmid DNA'yı kesim etkileri Agaroz Jel Elektforezi ile incelendi.

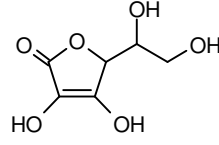
Elektron Donör Seçimi

Sandmeyer reaksiyonuna göre bir elektron donör varlığında diazonyum tuzlarından azot ayrılarak aril radikali oluşur.¹¹⁸

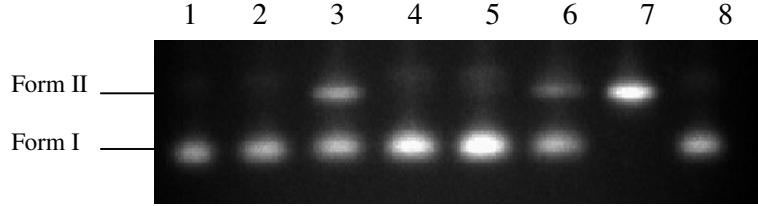


Şekil 4.1. Sandmeyer Reaksiyonu.

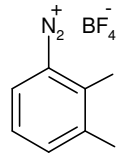
Bu deney benzenediazonyum tuzundan karbon merkezli radikal elde etmek için gerekli olan elektron donör seçimi için yapıldı. İnorganik elektron donör olarak bakır (I) klorür ve sodyum iyodür, organik elektron donör olarak ise askorbik asit kullanıldı. Diazonyum tuzu olarak 2,3-dimetil benzenediazonyum tetrafloroborat (**3**) tuzu kullanıldı. Tüm kuyucuklara 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA yüklendi.



Askorbik asit



Fotoğraf 4. 1. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür, askorbik asit ve sodyum iyodür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + askorbik asit (1.03 mM); **4. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + sodyum iyodür (1.03 mM); **5. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**32**) (0.5 mM); **6. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**32**) (0.375 mM); **7. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + askorbik asit (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**32**) (0.375 mM); **8. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + sodyum iyodür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**32**) (0.375 mM).



(32)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	62.26	100	92.75	66.73	-	100
Form II (%)	-	-	37.74	-	7.25	33.27	100	-
Form III (%)	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. 1. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür, askorbik asit ve sodyum iyodür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

Birinci kuyucuk sadece pBluescript M13+ plazmid DNA içeren kontroldür.

İkinci kuyucuk inorganik bir elektron donör olan bakır (I) klorür varlığında DNA kesimini incelemek üzere yüklendi. pBluescript M13+ plazmid DNA ve bakır (I) klorür içerir.

Üçüncü kuyucuk da organik elektron donör olan askorbik asitin DNA kesim etkisini incelemek için yüklendi. pBluescript M13+ plazmid DNA ve askorbik asit içerir.

Dördüncü kuyucuk ise birinci kuyucuk gibi dizayn edildi. Burada inorganik elektron donör olarak sodyum iyodür kullanıldı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve sodyum iyodür içerir.

Beşinci kuyucuk diazonyum tuzu (**32**)'un tek başına DNA kesim etkisinin incelenmesi için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA ve diazonyum tuzu (**32**) içerir.

Altıncı kuyucuk bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu varlığında DNA kesimini incelemek için dizayn edildi. pBluescript M13+ plazmid DNA, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (**32**) içerir.

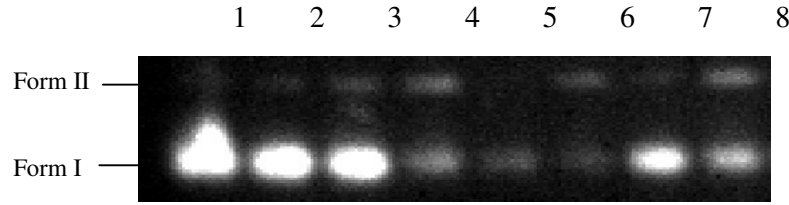
Yedinci kuyucuk ise askorbik asit ve diazonyum tuzu varlığında DNA kesiminin incelenmesi için tasarlandı. pBluescript M13+ plazmid DNA, askorbik asit ve diazonyum tuzu (**32**) içerir.

Sekizinci ve son kuyucuk ise sodyum iyodür ve diazonyum tuzu varlığında DNA kesimini incelemek içindi. pBluescript M13+ plazmid DNA, sodyum iyodür ve diazonyum tuzu (**32**) içerir.

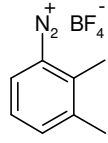
İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu ⁹⁵(% 0.1 brom fenol mavisi, 150 mM EDTA, 2 mM Tris içerisinde %1 SDS, 1 mM asetat, pH 8) ilave edildi ve sulu etidyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) içeren %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.1.'de verilmiştir.

Fotoğraf 4.1. ve tablo 4.1.'den de anlaşıldığı gibi diazonyum tuzu ve elektron donör ayrı ayrı kullanıldığında DNA üzerinde etkisi yok denebilecek kadar azdır. Fakat beraber kullanıldıklarında Form I'in, Form II'ye dönüştüğü gözlemlendi. Deneyden en iyi elektron donörün askorbik asit olduğu bulundu (7. kuyucuk). Fakat askorbik asit tek başına da DNA kesimini gerçekleştirdiği için (3. kuyucuk) sonra ki deneylerde elektron donör olarak bakır (I) klorür kullanılmasına karar verildi.

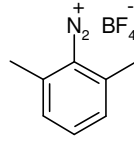
pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Diazonyum tuzları 32-34 ile bakır (I) klorür varlığında kesimi



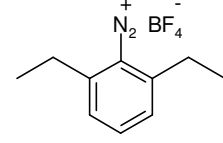
Fotoğraf 4. 2. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (32), (33) ve (34) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (32) (0.5 mM); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (32) (0.375 mM); **5. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (33) (0.5 mM); **6. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (33) (0.375 mM); **7. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (34) (0.5 mM); **8. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (34) (0.375 mM).



(32)



(33)



(34)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	98.42	96.89	95.81	56.54	94.42	53.64	93.25	61.42
Form II (%)	1.58	3.11	4.19	43.55	5.58	46.36	6.75	38.58
Form III (%)	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. 2. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32), (33) ve (34) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

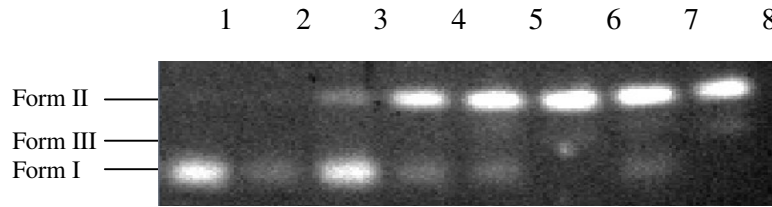
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (32) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (32) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (32) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (32) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (33) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (33) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (33) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (33) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe

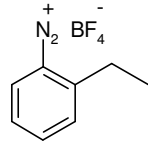
edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**34**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**34**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**34**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**34**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.2.'de verildi.

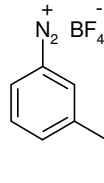
pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Diazonyum tuzları 35-37 ile bakır (I) klorür varlığında kesimi



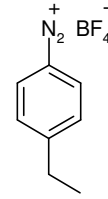
Fotoğraf 4. 3. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (**35**), (**36**) ve (**37**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk,** DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk,** DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk,** DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**35**) (0.5 mM); **4. kuyucuk,** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**35**) (0.375 mM); **5. kuyucuk,** DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**36**) (0.5 mM); **6. kuyucuk,** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**36**) (0.375 mM); **7. kuyucuk,** DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**37**) (0.5 mM); **8. kuyucuk,** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**37**) (0.375 mM).



(35)



(36)



(37)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	81.34	19.97	13.35	-	13.43	-
Form II (%)	-	-	18.66	80.03	86.05	100	86.57	96.46
Form III (%)	-	-	-	-	-	-	-	3.54

Tablo 4. 3. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**35**), (**36**) ve (**37**) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (form III) dönüşümü.

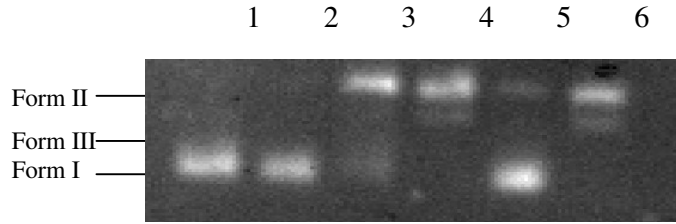
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**35**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**35**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**35**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**35**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**36**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**36**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**36**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**36**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe

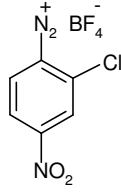
edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**37**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**37**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**37**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**37**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.3.'te verilmiştir.

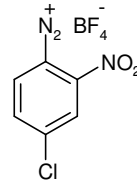
pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Diazonyum tuzları 38-39 ile bakır (I) klorür varlığında kesimi



Fotoğraf 4. 4. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (**38**) ve (**39**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk,** DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk,** DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk,** DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (**38**) (0.5 mM); **4. kuyucuk,** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (**38**) (0.375 mM); **5. kuyucuk,** DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (**39**) (0.5 mM); **6. kuyucuk,** DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (**39**) (0.375 mM).



(38)



(39)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6
Form I (%)	100	100	20.31	-	86.00	-
Form II (%)	-	-	79.69	100	14.00	76.01
Form III (%)	-	-	-	-	-	23.99

Tablo 4. 4. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (38) ve (39) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (Form III) dönüşümü.

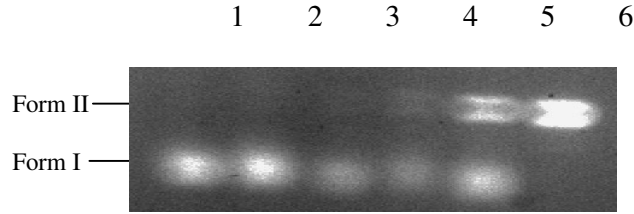
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (38) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (38) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (38) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (38) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (39) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (39) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür

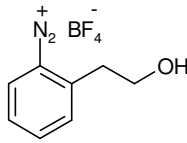
ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**39**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**39**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jel Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.4.'te verilmiştir.

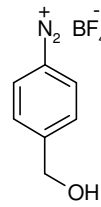
pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Diazonyum tuzları 40-41 ile bakır (I) klorür varlığında kesimi



Fotoğraf 4. 5. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (**40**) ve (**41**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk:** DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk:** DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk:** DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**40**) (0.5 mM); **4. kuyucuk:** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**40**) (0.375 mM); **5. kuyucuk:** DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (**41**) (0.5 mM); **6. kuyucuk:** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (**41**) (0.375 mM).



(40)



(41)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6
Form I (%)	100	100	100	42.66	30.12	-
Form II (%)	-	-	-	57.34	69.88	100
Form III (%)	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. 5. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**40**) ve (**41**) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

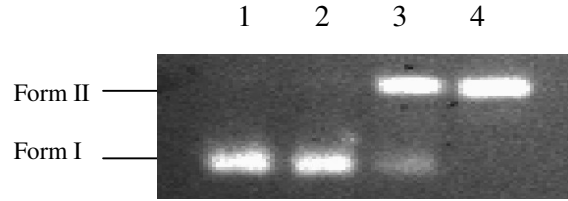
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**40**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**40**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**40**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**40**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**41**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**41**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi.

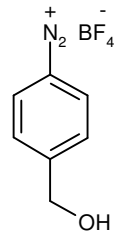
İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%0.1 brom fenol mavisi, 150 mM EDTA, 2 mM Tris içerisinde %1 SDS, 1 mM asetat, pH 8) ilave edildi ve sulu etidyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) içeren %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad

Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.5'te verilmiştir.

Diazonyum tuzu (**41**) yenilebilir bir kültür mantarı olan *Agaricus bisporus*'un metabolit ürünlerinden biridir. *Agaricus bisporus*, hidrazin yapısına sahip agaritine (β -N-4-[γ -L(+)-glutamil]-4-hidroksimetilfenilhidrazin ve bunun parçalanma ürünlerini içermektedir. Agaratinin parçalanma ürünlerinin farelerde kanserojen etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.⁸⁸ Bunlar 4-(hidroksimetil)fenilhidrazin, 4-metilfenilhidrazin hidroklorürün N-asetil türevleri ve 4-(hidroksimetil)benzendiazonyum iyonunun tetrafloroborat formudur. Agaritine'nin temel kanserojenik metabolitinin, yani; 4-(hidroksimetil)benzendiazonyum iyonunun (**41**) oldukça reaktif olduğu bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada diazonyum tuzu (**41**)'un bir elektron donör varlığında plazmid DNA'yı %100 oranında kestiği gözlemlendi.



Fotoğraf 4. 6. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**41**) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk:** DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk:** DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk:** DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (**41**) (0.5 mM); **4. kuyucuk:** DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (**41**) (0.375 mM).



(**41**)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4
Form I (%)	100	100	30.12	-
Form II (%)	-	-	69.88	100
Form III (%)	-	-	-	-

Tablo 4. 6. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında diazonyum tuzu (**41**) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

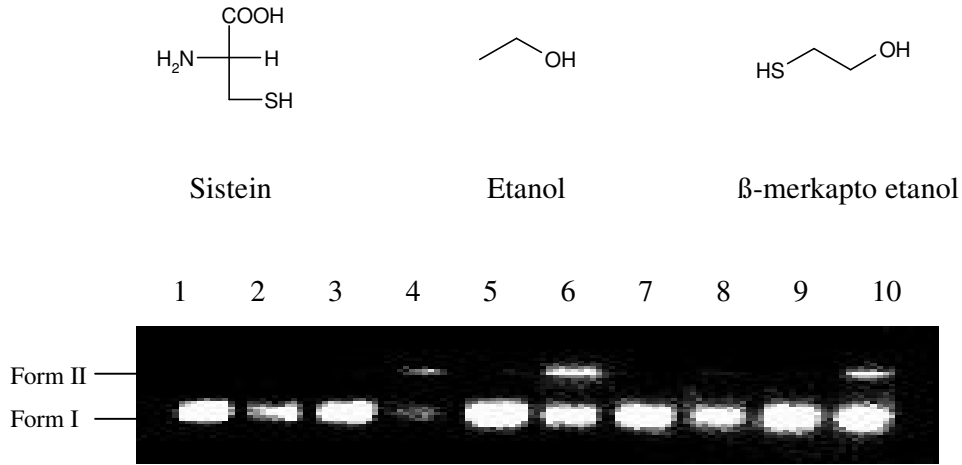
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**41**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**41**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektrophorez 120 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.6'da verilmiştir.

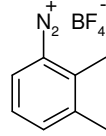
4.1.6. Karbon Merkezli Radikallerin Söndürülmesi

Sistein, etanol ve β -merkпто etanol gibi bazı maddelerin karbon merkezli radikalleri söndürdüğü bilinmektedir.⁸⁸ Diazonyum tuzlarının da aril radikalleri oluşturarak DNA'yı kestiği bilinir. Çalışmada DNA kesimi incelenen diazonyum tuzlarının DNA kesim mekanizması aril radikali üzerinden gerçekleşiyor ise; sistein, etanol, β -merkпто etanol varlığında kesimin önlenmesi gerekir. Bu amaçla bir elektron donör varlığında diazonyum tuzu (**32**)'in, aril radikalini söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol, β -merkпто etanol gibi maddeler varlığında DNA kesimi incelendi.



Fotoğraf 4. 7. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile kesim reaksiyonunun aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol ve β -merkпто etanol varlığında Agaroz Jel Elektroföresi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (**32**) (0.5 mM); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.375 mM); **5. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + etanol (2.5 mg/mL); **6. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + etanol (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM), **7. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + sistein (2.5 mg/mL); **8. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + sistein (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM); **9. kuyucuk**, DNA (31.53) + β -merkпто etanol (2.5

mg/mL); **10. kuyucuk**, DNA (18.92) + β -merkaptto etanol (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM).



(32)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Form I (%)	100	100	100	61.82	100	78.88	100	88.33	100	79.85
Form II (%)	-	-	-	38.18	-	21.12	-	11.67	-	20.15
Form III (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. 7. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol ve β -merkaptto etanol varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi

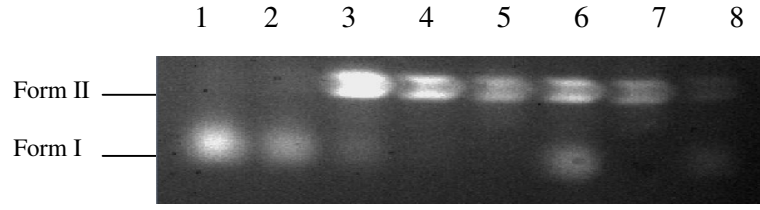
Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 μ l (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 μ l (3.1 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**32**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 μ l (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 μ l (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**32**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 μ l (10 mg/mL) etanol ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, etanol için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript

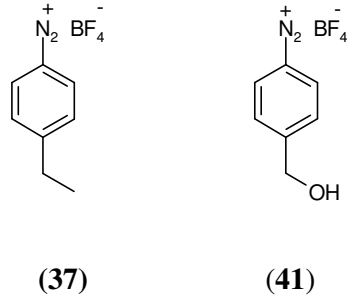
M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) etanol, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, etanol için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, sistein için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, sistein için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **9. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) β-merkapt etanol ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, β-merkapt etanol için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **10. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) β-merkapt etanol, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, β-merkapt etanol için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.7'de verilmiştir.

Fotoğraf 4.7 ve tablo 4.7'den de anlaşıldığı gibi karbon merkezli radikalleri söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol ve β-merkapt etanol varlığında diazonyum tuzu (**32**)'un DNA kesimi etanol ve β-merkapt etanol varlığında ~%18, sistein varlığında ise ~%26 oranında azalmıştır. Bu sonuçtan dolayı daha sonra yapılacak deneylerde karbon merkezli radikalleri söndürmek amacı ile sistein kullanılmasına karar verildi.



Fotoğraf 4. 8. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (37) ve (41) ile kesim reaksiyonunun aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein varlığında Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (37) (0.5 mM); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (37) (0.375 mM); **5. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + sistein (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN₂⁺ (37) (0.3 mM), **6. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN₂⁺ (41) (0.5 mM); **7. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN₂⁺ (41) (0.375 mM); **8. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + sistein (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN₂⁺ (41) (0.3 mM)



Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	13.35	-	-	11.82	-	59.19
Form II (%)	-	-	86.05	100	100	83.18	100	40.81
Form III% ()	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. 8. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (37) ve (41) ile aril radikali söndürme kapasitesi olduğu

bilinen sistein varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**37**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**37**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**37**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**37**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**37**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, sistein için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**37**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**41**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**41**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**41**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**41**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, etanol için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**41**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroferez 120 V'ta TAE (40 mM Tris asetat,

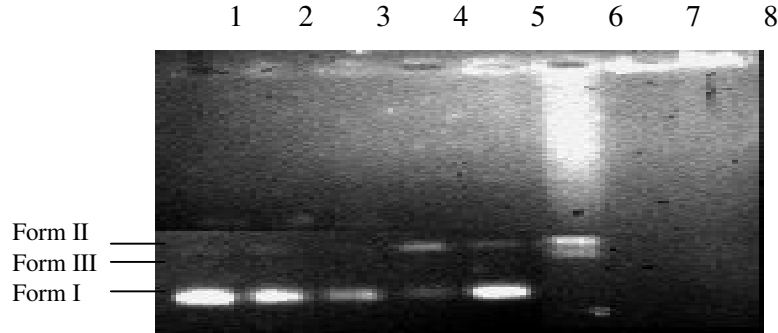
1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.8'de verilmiştir.

4. 2. Bazı *Hypericum* ve *Achillea* Türü Bitkilerin Aril Radikalleri Sonucu Oluşan DNA Kesimini Önleme Kapasitelerinin İncelenmesi

Bitkilerin etanol ekstraktlarının aril radikaller sonucu oluşan DNA kesimini önleme kapasitelerine bakıldı. Bu çalışmada aril radikali kaynağı olarak diazonyum tuzu (32), karbon merkezli radikal söndürücü olarak da sistein kullanıldı. Bitkilerin DNA'yı koruma kapasitesi sisteinle kıyaslandı.

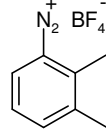
Hypericum Türü Bitkilerin pBluescript M13+ plazmid DNA'yı Koruma Kapasitesi

Çalışmada daha önce antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olan *Hypericum* türlerinden *H. scabrum* (H1), *H. retusum* (H2) ve *H. lysimachioides* (H3) kullanıldı.



Fotoğraf 4. 9. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile kesim reaksiyonunun H1, H2, H3 varlığında Agaroz Jel Elektrofrezisi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (32) (0.5 mM); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (32) (0.375 mM); **5. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + sistein (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (32) (0.3 mM); **6.**

kuyucuk, DNA (18.92 nM) + H1 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mmol) + PhN₂⁺ (**32**) (0.3 mM); **7. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + H2 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mmol) + PhN₂⁺ (**32**) (0.3 mM); **8. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + H3 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN₂⁺ (**32**) (0.3 mM).



(32)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	100	42.49	84.81	-	-	-
Form II (%)	-	-	-	57.51	15.19	2.43	-	-
Form III (%)	-	-	-	-	-	2.86	-	-

Tablo 4. 9. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile H1, H2 ve H3 varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**32**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**32**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+

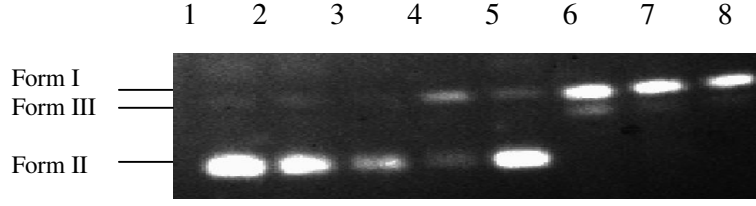
plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, sistein için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H1, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, H1 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H2, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, H2 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H3, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, H3 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.9'da verilmiştir.

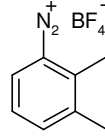
Fotoğraf 4. 9 ve tablo 4. 9'dan da anlaşıldığı gibi *Hypericum* türü bitkilerin DNA kesimini önlemediği, aksine arttırdığı gözlemlendi.

***Achillea* Türü Bitkilerin pBluescript M13+ plazmid DNA'yı Koruma Kapasitesi**

Çalışmada daha önce antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olan *Achillea* türlerinden *A. aleppica* subsp. *aleppia* (A1), *A. aleppica* subsp. *zederbaueri* (A2), *A. biebersteinii* (A3) kullanıldı.



Fotoğraf 4. 10. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile kesim reaksiyonunun H1, H2, H3 varlığında Agaroz Jel Elektrofrezisi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (I) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + PhN_2^+ (**32**) (0.5 mM); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (I) klorür (0.775 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.375 mM); **5. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + sistein (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM); **6. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + A1 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mmol) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM); **7. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + A2 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mmol) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM); **8. kuyucuk**, DNA (18.92 nM) + A3 (2 mg/mL) + bakır (I) klorür (0.62 mM) + PhN_2^+ (**32**) (0.3 mM).



(32)

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	100	42.49	84.81	-	-	-
Form II (%)	-	-	-	57.51	15.19	71.80	100	100
Form III (%)	-	-	-	-	-	28.20	-	-

Tablo 4. 10. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (**32**) ile A1, A2 ve A3 varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (I) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM diazonyum tuzu (**32**) için 0.5 mM olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ve 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (I) klorür için 0.775 mM ve diazonyum tuzu (**32**) için 0.375 mM olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) sistein, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, sistein için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A1, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, A1 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A2, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, A2 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A3, 1 µl (1.5 mM) diazonyum tuzu (**32**) ve 1 µl (3.1 mM) bakır (I) klorür ile son konsantrasyon DNA için 19.92 nM, A3 için 2 mg/mL, diazonyum tuzu (**32**) için 0.3 mM ve bakır (I) klorür için 0.62 mM olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (% 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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat,

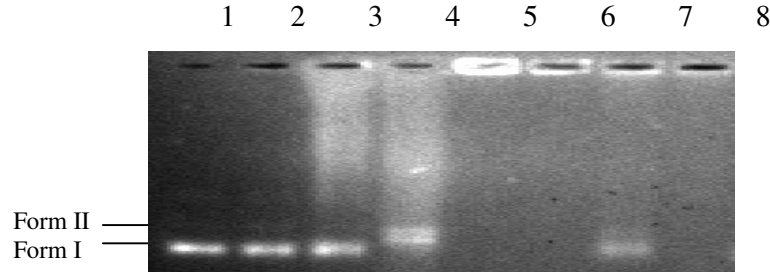
1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.10'da verilmiştir.

Achillea türü bitkilerin DNA kesimini önlemediği aksine arttırdığı gözlemlendi.

4. 3. Bazı *Hypericum* ve *Achillea* Türü Bitkiler ile DNA Kesimi

DNA kesimini önlemesi düşünülen *Hypericum* ve *Achillea türü bitkilerin* DNA kesimini önlemeyip arttırdığı gözlenince, bu bitkilerin bakır (II) klorür varlığında DNA kesim etkisi incelenmeye karar verildi.

pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Bazı *Hypericum* türü bitkiler ile bakır (II) klorür varlığında kesimi



Fotoğraf 4. 11. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında H1, H2 ve H3 ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (II) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + H1 (3.33 mg/mL); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + H1 (2.5 mg/mL); **5. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + H2 (3.33 mg/mL); **6. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + H2 (2.5 mg/mL); **7. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + H3 (3.33 mg/mL); **8. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + H3 (2.5 mg/mL).

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	10.53	-	-	-	-	-
Form II (%)	-	-	-	12.40	-	-	-	-
Form III (%)	-	-	-	-	-	-	-	-

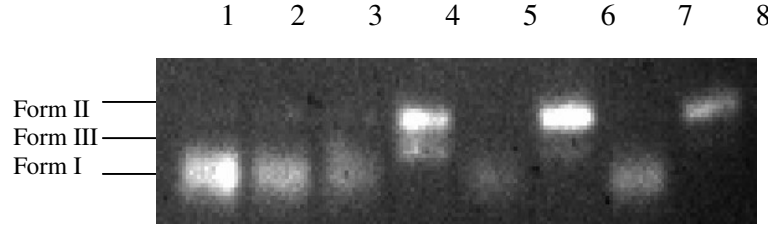
Tablo 4. 11. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında H1, H2 ve H3 ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Aşağıdaki reaksiyonlar 05 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (II) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H1 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, H1 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) H1 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve H1 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H2 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, H2 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) H2 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve H2 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) H3 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, H3 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) H3 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve H3 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%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 %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta 1 x TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.11'de verilmiştir.

pBluescript M13+ plazmid DNA'nın Bazı *Achillea* türü bitkiler ile bakır (II) klorür varlığında kesimi



Fotoğraf 4. 12. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında A1, A2 ve A3 ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA (47.30 nM); **2. kuyucuk**, DNA (31.53 nM)+ bakır (II) klorür (1.03 mM); **3. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + A1 (3.33 mg/mL); **4. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + A1 (2.5 mg/mL); **5. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + A2 (3.33 mg/mL); **6. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + A2 (2.5 mg/mL); **7. kuyucuk**, DNA (31.53 nM) + A3 (3.33 mg/mL); **8. kuyucuk**, DNA (23.65 nM) + bakır (II) klorür (0.775 mM) + A3 (2.5 mg/mL).

Kuyucuk	1 (Kontrol)	2	3	4	5	6	7	8
Form I (%)	100	100	83.99	-	100	-	100	-
Form II (%)	-	-	16.01	64.39		87.04	-	100
Form III (%)	-	-	-	35.61	-	12.91	-	-

Tablo 4. 12. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında A1, A2 ve A3 ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (Form III) dönüşümü.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu.

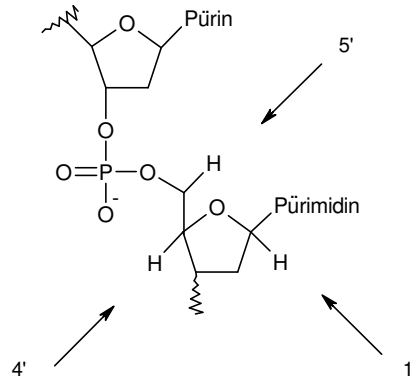
1. kuyucuk: pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) tek başına. **2. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM), 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, bakır (II) klorür için 1.03 mM olacak şekilde inkübe edildi. **3. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A1 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, A1 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **4. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) A1 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve A1 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **5. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A2 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, A2 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **6. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) A2 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve A2 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **7. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (10 mg/mL) A3 ile son konsantrasyon DNA için 31.53 nM, A3 için 3.33 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi. **8. kuyucuk:** pBluescript M13+ plazmid DNA (47.30 nM) 1 µl (3.1 mM) bakır (II) klorür ve 1 µl (10 mg/mL) A3 ile son konsantrasyon DNA için 23.65 nM, bakır (II) klorür için 0.775 mM ve A3 için 2.5 mg/mL olacak şekilde inkübe edildi.

İki saatlik inkübasyon süresinden sonra numunelere 5 µl % 50 gliserollü yürütme tamponu (%0.1 brom fenol mavisi, 150 mM EDTA, 2 mM Tris içerisinde %1

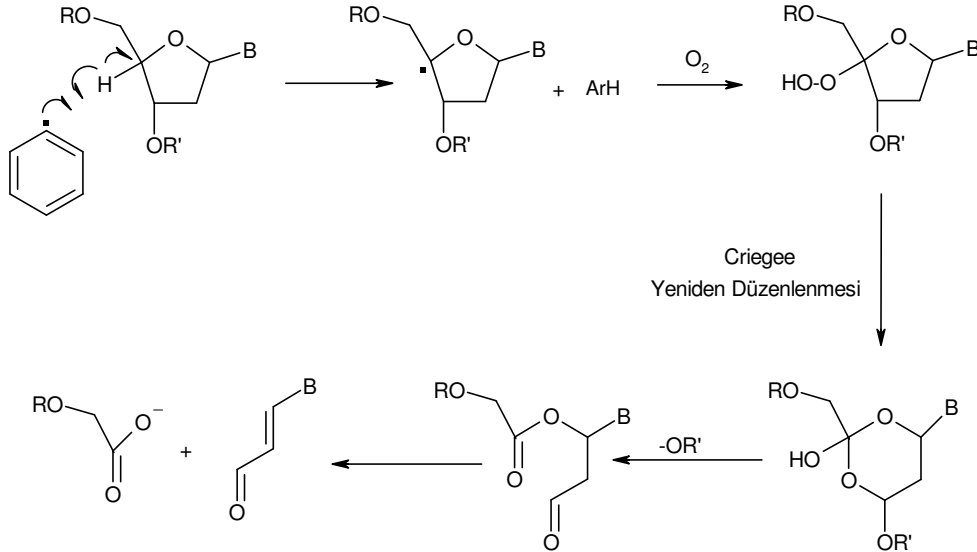
SDS, 1 mM asetat, pH 8) ilave edildi ve sulu etidyum bromür çözeltilisi (10 mg/mL) içeren %1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez 120 V'ta TAE (40 mM Tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) tamponu içerisinde 80 dakika yürütüldü. Jelin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu) hesaplandı. Kesim %'leri tablo 4.12'de verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diazonyum tuzlarının DNA ile olan reaksiyonları daha önce çalışılmış olup bunların DNA'yı kestiği bilinmektedir.^{89,96} Bu kesim mekanizması deoksiriboz şekerden hidrojen atomu koparılmasıyla gerçekleşir. Aril radikalleri için DNA deoksiriboz şekerinin 5', 4' ve 1' Hidrojen atomunu (Şekil 5. 1) koparmak diğer hidrojen atomlarına oranla daha kolaydır.¹¹⁹ Şekil 5. 2'de aril radikallerinin 4' Hidrojen atomu koparılması gösterilmiştir.



Şekil 5. 1. Deoksiriboz şekerinden 1', 4' ve 5' hidrojen atomları.



Şekil 5. 2. 4' Hidrojen atomu koparılması.

Diazonyum tuzlarından aril radikali oluşturmak için gerekli olan elektron donör için Arya ve arkadaşlarının⁹¹ yapmış oldukları gibi farklı elektron donörler denendi. Bu amaçla inorganik elektron donör olarak bakır (I) klorür ve sodyum iyodür, organik elektron donör olarak da askorbik asit kullanıldı. En iyi elektron donörün askorbik asit olduğu belirlendi. Yoshikawa ve ark.,¹²¹ daha önce yaptıkları çalışmada askorbik asidin DNA dubleks yapısında konformasyonel değişikliğe sebep olduğunu belirttiği gibi, biz de askorbik asidin tek başına DNA kesme kapasitesi olduğunu tespit ettik (Fotoğraf 4. 1ve tablo 4. 1). Askorbik asit tek başına DNA'nın % 38'lik kısmını supercoiled formdan open circular forma dönüştürürken, diazonyum tuzuyla birlikte kullanıldığında bu oran %100'e çıkmıştır. Bakır klorür tek başına DNA kesimine sebep olmazken diazonyum tuzuyla birlikte kullanıldığında %33 oranında DNA'nın kesilmesine neden olduğu gözlenmiştir. Sodyum iyodür ise ne tek başına ne de diazonyum tuzuyla beraber kullanıldığında DNA kesimine sebep olmamıştır. Sonraki deneylerde bir elektron donör olarak DNA'yı tek başına kesmeyen bakır (I) klorür kullanarak DNA kesimini incelemeye karar verildi.

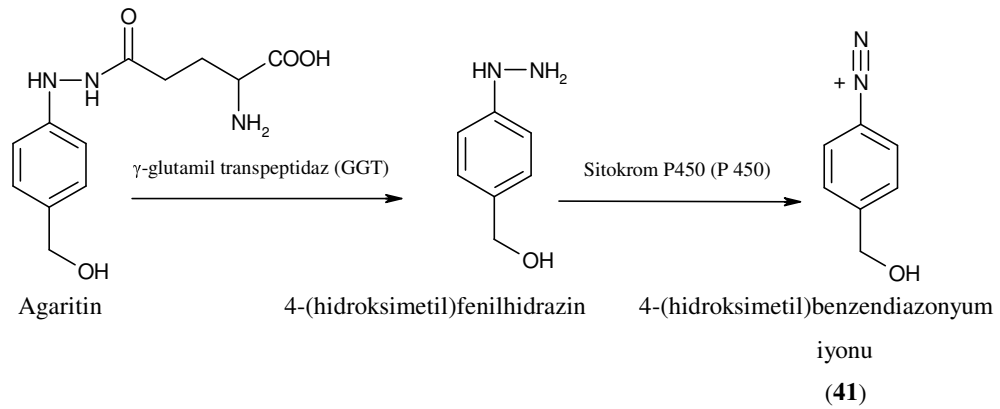
Metil ve etil gruplarının radikal reaktivitesi ve DNA kesim etkisi araştırılırken, metil ve etil gruplarının DNA kesimine etkisinde anlamlı bir farklılık görülmedi. Bir elektron donör varlığında diazonyum tuzu (32)'in %44 , (33)'ün %46 ve (34)'ün %39 oranında plazmid DNA'yı supercoiled formdan open circular forma dönüştüğü tespit edilmiştir. Elde edilen verilerden diazonyum tuzlarının tek başına DNA'yı az da olsa kestiği belirlenmiştir. Bu kesimin diazonyum tuzundan fenil katyonu oluşarak gerçekleştiği düşünülmektedir.^{107,108} Diazonyum tuzları organik çözücülerde ışığa karşı kararlı olmalarına rağmen, sulu çözeltilerinde bozunarak DNA kesimini başlatan fenil katyonu oluşturabilirler. DNA'nın doğal çevresine organik çözücülerden daha uygun olduğu için reaksiyonlar su içerisinde gerçekleştirildi ve her ne kadar ışıktan korumaya çalışsak da bir miktar fenil katyonu oluşup az da olsa DNA kesimine neden olabilir (Fotoğraf 4. 2 ve tablo 4.2)

Etil gruplarının orto, meta ve para pozisyonlarında DNA kesim etkisi incelendiğinde üçünün de tek başına DNA kesimine sebep oldukları gözlenmiştir. Meta ve para pozisyonlarında kesim elektron donör olmadan % 86 oranında gerçekleşirken, orto pozisyonunda kesimin %17 civarında olduğu tespit edilmiştir. Elektron donör

varlığında orto pozisyonda supercoiled formun % 80'i open circular forma dönüşmüşken meta pozisyonunda %100 opencircular form, para pozisyonunda ise % 96 open circular ve %4 oranında linear forma dönüşmüştür (Fotoğraf 4. 3 ve tablo.4.3).

Klor ve nitro gruplarının DNA kesim etkisi incelendiğinde ise hem (38) hem de (39)'nın bir elektron donör varlığında DNA'yı %100 oranında kestiği belirlenmiştir. (39) bileşiği elektron donör varlığında DNA'nın %23'lük kısmını linear forma dönüştürmüştür. Diazonyum tuzu (38) tek başına %77 oranında, diazonyum tuzu (39) ise % 14 oranında DNA'yı supercoiled formdan open circular forma dönüştürmüştür (Fotoğraf 4. 4 ve Tablo 4.4).

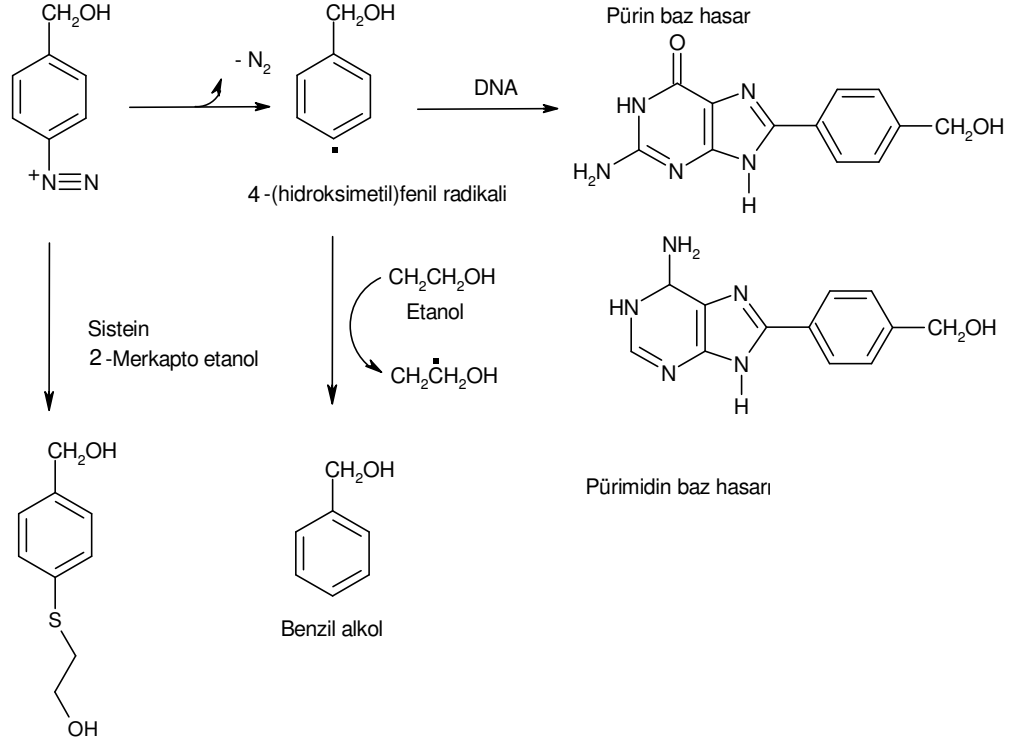
Diazonyum tuzları (40) ve (41)'in DNA kesim etkisi incelendiğinde (40) bileşiğinin DNA'yı tek başına kesmediği (41) bileşiğinin ise DNA'yı tek başına %70 oranında kestiği gözlemlendi. Elektron donör varlığında bu oran (40) için %57, (41) için ise %100 olarak tespit edildi (Fotoğraf 4. 5 ve tablo 4. 5). Diazonyum tuzu (41)'in yenilebilir kültür mantarı olan *Agaricus bisporus*'un parçalanma ürünü olması bu sonucun önemini vurgular.



Şekil 5. 3. Agaritinin biyoaktivasyon yolu.

Diazonyum tuzlarının aril radikali oluşturarak DNA'yı kestiğini belirtmiştik (Şekil 5. 2). Önceki çalışmalarda sistein, etanol ve β -merkapt etanol gibi bazı maddelerin karbon merkezli radikalleri söndürdüğü rapor edilmiştir⁸⁸ (Şekil 5. 4). DNA kesimi incelenen diazonyum tuzları karbon merkezli radikal oluşturarak DNA kesimine

sebepler oluyorsa sistein, etanol ve β -merkapt etanol gibi karbon merkezli radikalleri söndüren maddelerle beraber kullanıldığı zaman DNA kesiminin önlenmesi gerekir.



Şekil 5. 4. Karbon merkezli radikallerin söndürülmesi.

Bu amaçla sistein, etanol ve β -merkapt etanol varlığında diazonyum tuzu (32)'in DNA kesiminin incelenmesine karar verildi. Diazonyum tuzu (32) sadece bir elektron donör varlığında DNA kesimine sebep olduğu için kullanıldı. Etanol ve β -merkapt etanol varlığında diazonyum tuzu (32)'nin DNA kesim etkisinin %18 oranında, sistein varlığında ise bu değer %26 oranında azaldığı belirlendi. Bu sonuç kesimin karbon merkezli radikal üzerinden gerçekleştiği düşüncesini doğruladığı düşüncesindeyiz (Fotoğraf 4. 7 ve tablo 4.7).

Yine aynı amaçla diazonyum tuzları (37) ve (41) kullanılarak sisteinin karbon merkezli radikalleri söndürme ve dolayısıyla da DNA kesimini önleme kapasitesi incelendi. Diazonyum tuzları (37) ve (41) tek başlarına DNA kesim etkisi en fazla olan diazonyum tuzları olduğu için tercih edildi. Sistein varlığında diazonyum tuzu (37)'nin

DNA kesim etkisinde bir değişiklik olmadığı, diazonyum tuzu (**41**)'in ise kesiminin sistein varlığında %40 oranında azaldığı gözlendi (Fotoğraf 4. 8 ve tablo 4. 8).

Önceki çalışmalarda antioksidant ve antimikrobiyal özellikleri olduğu belirlenen bazı bitki ekstraktlarının da DNA'yı koruma kapasitelerinin olduğu rapor edilmiştir.⁹⁷⁻⁹⁸ Bu amaçla antioksidant ve antimikrobiyal aktivitesi bilinen bazı *Hypericum* ve *Achillea* türü bitkilerin etanol ekstraktlarının DNA kesimini önleme kapasitesinin araştırılmasına karar verildi. Bitkilerin kesimi önleme kapasitesi sisteinle kıyaslandı.

Hypericum türü bitkilerin kesim önleme kapasitesi incelendiğinde H1'in DNA kesimini azaltmadığı aksine arttırdığı, H2 ve H3 türlerinin ise DNA'nın jelde tutunmasına sebep olduğu gözlendi. *Hypericum* türü bitkilerin, etanol ekstraktlarının içinde bulunan pozitif yüklü moleküller, DNA'nın büyük ve küçük olukları ile interkalasyon veya elektrostatik etkileşim yaparak DNA'nın jelde yürümesini engellemiş olabilirler (Fotoğraf 4. 9 ve tablo 4. 9).

Achillea türü bitkilerin kesim önleme kapasitesi incelendiğinde ise DNA kesimini arttırdığı gözlendi. Diazonyum tuzu (**32**) bakır (I) klorür varlığında DNA'yı %57 oranında supercoiled formdan open circular forma dönüştürürken, ortama A1 eklendiğinde supercoiled formun %72 oranında open circular forma, %28 oranında ise linear forma dön üştüğü gözlendi. Ortama A2 ve A3 ayrı ayrı eklendiği zaman supercoiled formun tümünün open circular forma dönüştüğü gözlendi (Fotoğraf 4. 10 ve tablo 4. 10).

Cu²⁺ iyonları varlığında bitki ekstraktları tarafından DNA sarmalının kesim mekanizmasında aromatik çekirdeklerin oksijenlenmesi rol oynamaktadır. Bunun sonucunda katekol oluşur ve bu oluşan katekol Cu²⁺ ile koordinasyon yapar. Oluşan bu koordinasyon bileşiği dioksijeni daha reaktif türlere indirgedikten sonra katekolün Cu²⁺ iyonu ile koordinasyonu sonucu oksidasyona uğrar. Önceki çalışmalarda antioksidant ve antimikrobiyal aktiviteleri olduğu belirlenen bazı bitki ekstraktların içerisinde bulunan flavonoidlerin Cu²⁺ ile kompleks oluşturarak DNA'yı kestiği belirtilmiştir.¹¹⁰ DNA kesimini önlemesi düşünülen *Hypericum* ve *Achillea* türü bitkilerin kesimi önlemeyip arttırdığı da gözlenince bu bitkilerin bakır (II) klorür varlığında DNA kesim etkisi incelenmeye karar verildi.

Hypericum türü bitkilerin kesim etkisi araştırılırken yine DNA'nın jelde tutunduğu gözlendi. *Hypericum* türü bitkilerin, etanol ekstraktlarının içinde bulunan

pozitif yüklü moleküller, DNA'nın daha önce açıkladığımız nedenle jelde tutunduğu düşünüyoruz. (Fotoğraf 4.11 ve tablo 4. 11).

Achillea türü bitkilerin kesim etkisi araştırılırken A1 bitkisinin etanol ekstraktının tek başına DNA'nın %16'lık kısmını supercoiled formdan open circular forma dönüştürdüğü gözlemlendi. Cu^{2+} varlığında ise supercoiled DNA'nın %64 oranında open circular, % 36 oranında linear forma dönüştüğü gözlemlendi. A2 bitkisinin etanol ekstraktının tek başına DNA'yı kesmediği, Cu^{2+} varlığında ise supercoiled DNA'nın %87 oranında open circular, % 13 oranında linear forma dönüştüğü gözlemlendi. A3 bitkisinin etanol ekstraktının tek başına DNA'yı kesmediği, Cu^{2+} varlığında ise supercoiled DNA'yı %100 oranında open circular, forma dönüştüğü gözlemlendi (Fotoğraf 4. 12 ve tablo 4. 12).

Sonuçlar farklı süstitüe diazonyum tuzlarının DNA'yı kestğini göstermiştir. Diazonyum tuzlarının radikal reaktivitesinin süstitüe gruba bağlı olarak değışebileceği tespit edilmiştir. Bazı diazonyum tuzları DNA'yı ancak bir elektron donör varlığında keserken bir kısmının elektron donör olmadan da DNA kesimine sebep olduğu tespit edilmiştir. DNA kesim etkisi incelenen diazonyum tuzlarının herhangi bir spesifitesi olmadığı için DNA'yı rastgele keserler. Bundan sonraki çalışmalarda DNA'yı spesifik olarak kesebileceği düşünülen diazonyum tuzları sentezlenerek DNA kesimi incelenecektir. Ayrıca Cu^{2+} varlığında DNA kesimine sebep olan bitki ekstraktlarının içerdiği etken maddeler saflaştırılarak yapı aydınlatılmasına gidilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Watson, J. D., 1968. The Double Helix. Weidenfeld and Nicholson, LONDON.
2. Dekker, C. A.; Michelson, A. M., Todd, A. R., 1953. *J. Chem. Soc.* 947.
3. Zamenhof, S., Braverman, G., Chargaff, E., 1952. *Biochim. Biophys. Acta.* 9, 402.
4. Astbury, W. T., 1947. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 66.
5. Gulland, J. M., 1947. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 95.
6. Watson, J. D., Crick, F. H. C., 1953. *Nature.* 171, 737.
7. Wilkins, M. H. F., 1963. *Science.* 140, 941.
8. Hanlon, S., 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 861.
9. Beak, P., 1977. *Acc. Chem. Res.* 10, 186.
10. Silverman, R. B., 1991. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Academic Press. ILLINOIS.
11. Wolfenden, R. V., 1969. *J. Mol. Biol.* 40, 307.
12. Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., Rahman, S. K. 1989. *J. Nat. Prod.* 52, 1189.
13. Hertzberg, R. P., Johnson, R. K., 1993. *Annu. Rep. Med. Chem.* 28,167.
14. Remers, W. A., 1991. Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. (J. W. Delgado and W. A. Remers. Editör) Lippincott. PHILADELPHIA.
15. Foye, W. O., 1995. *Am. Chem. Soc.* WASHINGTON.
16. Hurley, L. H., 1989. *J. Med. Chem.* 32, 2027.
17. Brookers, P., Lawley, P. D., 1961. *Biochem. J.* 80, 496
18. Pullman, A., Pullman, B., 1981 *Q. Rev. Biophys.* 14, 289
19. Ts'o, P., E., 1974. Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry. Academic Press, NEW YORK
20. Lawley, P. D., Brookes, P., 1963 *Biochem. J.* 89, 127.
21. Bennett, R. A. O., Swerdlow, P. S., Povirk, L. F., 1993. *Biochemistry.* 32, 3188.
22. Lindahl, T., Andersson, A., 1972. *Biochemistry.* 11, 3618.
23. Maxam, A. M., Gilbert, W., 1980. *Methods Enzymol.* 65, 499.
24. Mattes, W. B., Hartley, J. A., Kohn, K. W., 1986. *Biochim. Biophys. Acta.* 868, 71.

25. Sugiyama, H., Fujiwara, T., Ura, A., Tashiro, T., Yamamoto, K., Kawanishi, S., Saito, I., 1994. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 673.
26. Wong, C. H., Li, B. F. L., 1994. *Nucleic Acids Res.* 22, 882.
27. Lawley, P. D., 1973. *Chem.-Biol. Interact.* 7, 127.
28. Singer, B., Kroger, M., Carrano, M., 1978. *Biochemistry*, 17, 1246.
29. Breen, A. P., Murphy, J. A., 1995. *Free Radical Biol. Med.* 18, 1033.
30. Pratviel, G., Bernadou, J., Meunier, B., 1995. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 746.
31. Von Sonntag, C., Hagen, U., Schon-Bopp, A., Schulte-Frohlinde, D., 1981. *Adv. Radiat. Biol.* 9, 109.
32. Zady, M. F., Wong, J. L., 1980. *Org. Chem.* 45, 2373.
33. Sies, H., 1986. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058.
34. Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z., Dizdaroğlu, M., 1990. *Biochemistry*. 29, 7876.
35. Barvarin, M. R., Greenberg, M. M., 1995. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8291.
36. Tullius, T. D., Dombroski, B. A., Churchill, M. E. A., Kam, L., 1987. *Methods Enzymol.* 155, 537.
37. Neidle, S., Abraham, Z., 1984. *Crit. Rev. Biochem.* 17, 73.
38. Lerman, L. S., 1961. *J. Mol. Biol.* 3, 18.
39. Krugh, T. R., Reinhardt, C. G., 1975. *J. Mol. Biol.* 97, 133.
40. Adair, F. E., Bagg, H. J., 1931. *Ann. Surg. (Chicago)*. 93, 190.
41. Gilman, A., Philips, F. S., 1946. *Science*, 103, 409.
42. Lawley, P. D., Brookes, P., 1963. *Biochem. J.* 89, 127.
43. Lown, J. W., Sim, S. K., Majumdar, K. C., Chang, R. Y., 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 705.
44. Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T., Maeda, K., 1966. *J. Antibiot., Ser. A.* 19, 210.
45. Sugiura, Y., Takita, T., Umezawa, H., Met., 1985. *Ions Biol. Syst.* 19, 81
46. Stubbe, J., Kozarich, J. W. 1987. *Chem. Rev.* 87, 1107.
47. Sausville, E. A., Peisach, J., Hortwitz, S B., 1976. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 814.
48. Wilson, W. D., 1990. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press, NEW YORK.
49. Hecht, S. M., 1986. *Acc. Chem. Res.* 19, 383.

50. Fisher, L. M., Kuroda, R., Sakai, T. T., 1985. *Biochemistry*. 24, 3199.
51. Umezawa, H., 1980. Medicinal Chemistry Series: Anticancer Agents Based on Natural Product Models. Academic Press. NEW YORK.
52. Ishida, N., Miyazaki, K., Kumagai, K., Rikimaru, M., 1965. *J. Antibiot.* 18, 68.
53. Konishi, M., Ohkuma, H., Saitoh, K., Kawaguchi, H., Golik, J., Dubay, G., Gronewold, G., Krishnan, B., Doyle, T. W., 1985. *J. Antibiot.* 38, 1605.
54. Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O., Borders, D. B., 1987. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3464.
55. Konishi, M., Ohkuma, H., Matsumoyo, K., Tsuno, T., Kamei, H., Miyaki, T., Oki, T., Kawaguchi, H., Van Duyne, G. D., Clardy, J., 1989. *J. Antibiot.* 42, 1449.
56. Myers, A. G., 1987. *Tetrahedron Lett.* 28, 4493.
57. Breen, A. P., Murphy, J. A., 1994. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 1033-1077
58. Kappen, L. S., Goldberg, I. H., Frank, B. L., Worth, L., Jr., Christner, D. F., Kozarich, J. W., Stubbu, J., Kappen, L. S., Goldberg, I. H. 1991. *biochemistry*. 113, 2271.
59. Snyder, J. P., 1990. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 7630.
60. Golik, J., Clardy, J., Dubay, G., Gronewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, N., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K-I., Doyle, T. W., 1987. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3462.
61. Pryor, W., 1988. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 219-223.
62. Clemens, M. R., Eisele, H., Farnk, H., Remmer, H. G., Waller, H. D., 1983. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3877-3878.
63. Thornalley, P. J., 1985. *Health Perspect.* 64, 297-307.
64. Soares, C. H. L., Bechara, E. J. H., 1982. *Photochem. Photobiol.* 136, 117-119.
65. Monteiro, H. P., Abdalla, D. S. P., Augusto, O., Bechera, E. J. 1989 *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 206-216.
66. Poyer, J. L., McCay, P. B., Lai, E. K., Janzen, E. G., Davis, E.R., 1980. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94, 1154-1160.
67. Connor, H. D., Thurman, R. G., Galizi, M. D., Mason, R. P., J. 1986. *Biol. Chem.* 261, 4542-4548.
68. Augusto, O., 1989. CRC handbook of free radicals and antioksidants in biomedicine (Miquel, L. editör). CRC Press. 3, 193-208.

69. Porter, D. J. T., Bright, H. J., 1983. *Biochem. J.* 258, 9913-9924.
70. Kuo, C. F., Fridovic, I., 1986. *Biochem. J.* 237, 505-510.
71. Reinka, L. A., Lai, E. K., DuBose, C. M., McCay, P. B., 1987. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84, 9223-9227.
72. Knecht, K. T., Bradford, B. U., Mason, R. P., Thurman, R. G., 1990. *Mol. Pharmacol.* 38, 26-30.
73. Kikughawa, K., Kato, T., Kojima, K., 1992. *Mutat. Res.* 268, 65-75.
74. Kato, T., Kojima, K., Kikughawa, K., 1992. *Mutat. Res.* 268, 105-114.
75. Marnett, L. J., 1987. *Carcinogenesis.* 8, 1365-1373.
76. Athar, M., Mukhtar, H., Bickers, D. R., Khan, I. V., Kalyanaraman, B., 1989. *Carcinogenesis.* 10, 1499-1053.
77. Simic, M. G., Bergtold, D. S., Karam, L. R., 1989. *Mutat. Res.* 214, 3-10.
78. Preussman, R., Duckrey, H., Ivankovic, S., Hodenberg, A. V., 1969. *Ann. NY Acad. Sci.* 163, 697-716.
79. Lawley, P. D., 1984. *Am. Chem. Soc.* 1, 325-475.
80. Augusto, O. 1993. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 329-336.
81. Edwards, J. E., Dalton, A. J., 1942. *J. Natl. Cancer Inst.* 3, 19-41.
82. Fiala, E. S., Conaway, C. C., Mathis, J. E., 1989. *Cancer Res.* 49, 5518-5522.
83. Lindenschmidt, R. C., Tryka, A. F., Goad, M. E., Witschi, H. P., 1986. *Toxicology.* 38, 151-160.
84. Taffe, B. G., Zweier, J. L., Pannell, L. K., Kensler, T. W., 1989. *Carcinogenesis.* 10, 1261-1268.
85. Cavalieri, E., Rogan, E., 1985. *Environ. Health Perspect.* 64, 69-84.
86. Griffiths, J., Murphy, J. A., 1992. *J. Chem. Commun.*, 23-25.
87. Fukuhara, K., Miyata, N., 1998. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 3187-3192.
88. Hiramoto, K., Kaku, M., Suoyoshi, A., Fujise, M., Kikughawa, K., 1995. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 356-362.
89. Barış, D., 2004. Bazı *Hypericum* ve *Achillea* türlerinin antimikrobiyal ve antioksidant aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. D. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. DİYARBAKIR.
90. Reszka, J. K., Chignell, C. F., 1995. *Chem. Biol. Interact.* 96, 223-234.
91. Arya, D. P., Jebaratnam, D. J., 1995. *Tetrahedron.* 36, 4369-4372.

92. Arya, D. P., Jebaratnam, D. J., 1995. *J. Org. Chem.* 60, 3268-3269
93. Gannett, P. M., Lawson, T., Miller, M., Thakkar, D. D., Lord, J. W., Yau, W.-M., Toth, B. , 1996. *Chem. Biol. Interact.* 101, 149-164
94. Warner, P. M. , Qi, J., Meng, B., Li, G., Xie, L., El-Shafey, A., Jones, B., 2001. *Bio. Med. Chem. Lett.* 12, 1-4
95. Burr, J. S., Mseati, A., Thomas, E. W., 2003. *Tetrahedron Lett.* 44, 7307-7309
96. Kızıllı, M., Yılmaz, E. İ., Pirinççioğlu, N., Aytekin, Ç., 2003. *Turk J. Chem.* 27, 539-54.
97. Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. *Cell Bio. Tox.* 16, 83-90.
98. Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L., Vanella, A., 2000. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 91-98.
99. Russo, A., Izzo, A. A., Cardile, V., Borrelli, F., Vanella, A., 2001. *Phytomedicine*, 8, 125-132.
100. Russo, A., Bonina, F., Acquaviva, R., Campisi, A., Galvano, F., Ragusa, N., Vanella, A., 2002. *J. Food Sci.* 67, 2814-2818.
101. Acquaviva, R., Russo, A., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Barcellona, M. L., Avitabile, M., Vanella, A., 2002. *J. Food Sci.* 67, 137-141.
102. Wang, L., Yen, J. H., Liang, H. L., Wu, M. J., 2003. *J. Food. Drug Anal.* 11, 60-66.
103. Acquaviva, R., Russo, A., Galvano, F., Barcellona, M. L., Li Volti, G., Vanella, A., 2003. *Cell Biol. Toxicoll.* 19, 243-252.
104. Russo, A., Izzo, A. A., Borrelli, F., Renis, M., Vanella, A., 2003. *Phytother. Res.* 17, 870-875.
105. Tian, V., Hua, Y., 2004. *Food Chem.* 91, 413-418
106. Lee, E., U., Jang, H., D., 2004. *Bio Factors.* 21, 285-292
107. Yen, G., C., Duh, P., D., Su, H., J., 2004. *Food Chem.* 30, 99-101.
108. Yamaguchi, L., Y., Vassao, D., G., Kato, M., J., Mascio, P., D., 2005. *Phytochemistry* (Basımda)
109. Ahmad, A., Syed, F., A., Singh, S., Hadi, S., M., 2005. *Tox. Lett* (Basımda).
110. Hadi, N., Singh, S., Ahmad, A., Zaidi, R., 2001. *Neurosci. Lett.* 308, 83-86

111. Uddin, Q., Malik, A., Azam, S., Hadi, N., Azmi, A., S., Parveen, N., Khan, N., U., Hadi, S., M., 2003. *Toxicology In Vitro*. 18, 435-440.
112. Ma, J., Hecht, M., 2004. *Chem. Commun.* 1190-1191.
113. Ma J., Jones, S., H., Hecht, S., M., 2004. *Bio. Med. Chem.* 12, 3885-3889.
114. Ma J., Jones, S., H., Marshall, R., Johnson, R., K., Hecht, S., M., 2004. *J. Nat. Prod.* 67, 1162-1164.
115. Ma, J., Jones, S., H., Hecht, S., M., 2004. *J. Nat. Prod.* 67, 1641-1616.
116. Baytop, T., 1984. Türkiyede Bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3255, İSTANBUL.
117. Quintero, B., Puentedura, M., M., I., Megias, M., T., Cabeza, M., C., Gutierrez, M., P., Martinez de las Parras, P., J., 2004. *J. Chromatog. A* 1035, 227-236.
118. Vcelak, J., Friesova, A., Rericha, R., Hetflejs, J., 1994. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 59, 1368-1383.
119. Behr, J., P., 1989. *J. Chem. Commun.* 101-103.
120. Yoshikawa, Y., Suzuki, M., Chen, N., Zinchenko, A., A., Murata, S., Kanbe, T., Nakai, T., Oana, H., Yoshikawa, K., 2003. *Eur. J. Biochem.* 270, 3101-3106.

7. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 1. 1. Genetoksik Xenobiotiklerden oluşan karbon merkezli serbest radikal metabolitleri.

Tablo 4. 1. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür, askorbik asit ve sodyum iyodür varlığında diazonyum tuzu (32) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Tablo 4. 2. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32), (33) ve (34) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Tablo 4. 3. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (35), (36) ve (37) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (form III) dönüşümü.

Tablo 4. 4. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (38) ve (39) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (Form III) dönüşümü.

Tablo 4. 5. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (40) ve (41) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Tablo 4. 6. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında diazonyum tuzu (41) ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Tablo 4. 7. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol ve β -merkaptto etanol varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi

Tablo 4. 8. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (37) ve (41) ile aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Tablo 4. 9. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile H1, H2 ve H3 varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Tablo 4. 10. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile A1, A2 ve A3 varlığında supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümünün önlenmesi.

Tablo 4. 11. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında H1, H2 ve H3 ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) dönüşümü.

Tablo 4. 12. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında A1, A2 ve A3 ile supercoiled formdan (Form I), open circular forma (Form II) veya linear forma (Form III) dönüşümü.

8. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1.1. DNA tek zinciri, Deoksişoliribonükleotid zinciri.

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

Şekil 1.3. DNA ikili zincir yapısı.

Şekil 1.4. DNA yapısı.

Şekil 1. 5. DNA'nın üç farklı formu.

Şekil 1. 6. DNA bazlarını hidrojen bağı yapan kısımları. D, Donör; A, Akseptör.

Şekil 1. 7. Watson – Crick baz çifti ve Şeker fosfat omurgası.

Şekil 1.8. Abazik bölge oluşumu ve DNA kesimi.

Şekil 1. 9. DNA Şekerinden hidrojen atomu koparılması (R, R'= DNA omurgası).

Şekil 1.10. Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu.

Şekil 1. 11. Azot hardallarıyla alkilasyon.

Şekil 1.12. Azot hardallarının neden olduğu çapraz bağlanma.

Şekil 1.13. Neocarzinostatinin tişol ile aktivasyonu.

Şekil 1.14. Aktive edilmiş neocarzinostatin ve diğer enediyen antibiyotikleri tarafından DNA kesim mekanizması.

Şekil 1. 15. Alkil radikali ile DNA hasarı; 1,2-dimetil hidrazin ile DNA baz ürünlerinin oluşumu.

Şekil 1.16. Karbon merkezli radikal metabolitleri ile oluşan DNA modifikasyon Şeması.

Şekil 2.1. Aril radikali oluşum mekanizması.

Şekil 2.2. Arendiazonyum iyonları ve DNA'dan elde edilen C8-arilguanin ürünleri (X = CH₃, CH₂OCH₃, CH₂OH)

Şekil 2. 3. Süstitüe triarilamidlerin DNA'yı kesimi

Şekil 2. 4. N-(3-Hydroxypropyl)-Berenil sentezi

Şekil 2. 5. Brezilya çamı *Araucaria angustifolia*'nın içerdii biflavonoidler.

Şekil 3. 1. Plazmid DNA.

Şekil 4.1. Sandmeyer Reaksiyonu.

Şekil 5. 1. Deoksiriboz Şekerinden 1', 4' ve 5' hidrojen atomları.

Şekil 5. 2. 4' Hidrojen atomu koparılması.

Şekil 5. 3. Agaritinin biyoaktivasyon yolu.

Şekil 5. 4. Karbon merkezli radikallerin söndürülmesi.

9. FOTOĞRAFLARIN LİSTESİ

Fotoğraf 4. 1. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür, askorbik asit ve sodyum iyodür varlığında diazonyum tuzu (32) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 2. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (32), (33) ve (34) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi. Reaksiyonlar su içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirildi.

Fotoğraf 4. 3. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (35), (36) ve (37) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 4. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (38) ve (39) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 5. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (40) ve (41) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 6. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (41) ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 7. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile kesim reaksiyonunun aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein, etanol ve β -merkapt etanol varlığında Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 8. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzları (37) ve (41) ile kesim reaksiyonunun aril radikali söndürme kapasitesi olduğu bilinen sistein varlığında Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 9. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile kesim reaksiyonunun H1, H2, H3 varlığında Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 10. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında diazonyum tuzu (32) ile kesim reaksiyonunun H1, H2, H3 varlığında Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 11. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (I) klorür varlığında H1, H2 ve H3 ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

Fotoğraf 4. 12. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, (3.2 kb), bakır (II) klorür varlığında A1, A2 ve A3 ile kesim reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi.

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Bircan ÇEKEN
Doğum Tarihi : 12.06.1979
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Merkez/DİYARBAKIR
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
21280-Diyarbakır
E-Mail : bircan@dicle.edu.tr

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1985-Şubat 1997

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

Eylül 1998-Temmuz 2002

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Eylül 2002-Temmuz 2004

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “**Sentetik Maddeler ile DNA Kesimi**” adlı master tezine Yrd. Doç. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında bitirdim.