

**KUMARİN-HİDRAZON TEMELLİ BİR SCHIFF BAZI İLE  
PEPSİN/HSA ARASINDAKİ BAĞLANMA  
ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROSKOPİK VE MOLEKÜLER  
KENETLENME METOTLARI İLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF BINDING PROPERTIES BETWEEN  
A SCHIFF BASE BASED ON COUMARIN-HYDRAZONE  
AND PEPSIN/HSA BY SPECTROSCOPIC AND  
MOLECULAR DOCKING METHODS**

**ESRA ÖZGENÇ**

**PROF. DR. ELMAS GÖKOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

*Aileme,*

## ÖZET

# KUMARİN-HİDRAZON TEMELLİ BİR SCHIFF BAZI İLE PEPSİN/HSA ARASINDAKİ BAĞLANMA ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROSKOPİK VE MOLEKÜLER KENETLENME METOTLARI İLE İNCELENMESİ

ESRA ÖZGENÇ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU

Aralık 2020, 65 sayfa

Tez çalışması kapsamında kumarin-hidrazon temelli yeni bir schiff bazı sentezlenmiş (HZC) ve yapısı spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. HZC ile protein (pepsin ve HSA) etkileşimleri spektroskopik (absorpsiyon, floresans) ve moleküler kenetlenme yöntemleri ile incelenmiştir. HZC-pepsin etkileşimleri pH 2.0 ve HZC-HSA etkileşimleri pH 7.4 tampon ortamlarında, farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Florimetrik deneylerden elde edilen floresans sönüm sabitleri ( $K_{sv}$ ), bağlanma sabitleri ( $K$ ), bağlanma kısım sayıları ( $n$ ) verilerinin işaret ettiği statik sönüm mekanizmasına göre HZC ve proteinler arasında kompleks yapı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca hesaplanan termodinamik parametrelere ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) göre bağlanma türleri açıklanmıştır. Negatif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  parametreleri, HZC'nin her iki proteinle bağlanmasında, hidrofobik kuvvetlerin yanında elektrostatik etkileşimlerin de rolü olduğu sonucunu göstermiştir. HZC'nin tezde önerilen florimetrik yöntemde, pepsin/HSA içeren deneysel ortamlardan nicel tayini için gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve

tain sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Buna göre HZC için, LOD değeri pepsin ortamında  $3.52 \times 10^{-6}$  M ve HSA ortamında  $3.81 \times 10^{-7}$  M; LOQ değeri ise pepsin ortamında  $1.17 \times 10^{-5}$  M ve HSA ortamında  $1.27 \times 10^{-6}$  M olarak bulunmuştur.

Förster teorisine göre, FRET yöntemi kullanılarak donör-akseptör molekülleri arasındaki uzaklık ( $r$ ), HZC-pepsin için 3.67 nm ve HZC-HSA için 2.19 nm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, türev-protein molekül çiftleri arasında ışımasız enerji aktarımının etkin olduğunu göstermiştir. Elde edilen deneysel veriler, moleküler kenetlenme sonuçları ile desteklenmiştir ve doğrulanmıştır. Gerek spektral ve gerekse hesaplamalı sonuçlar, HZC türevinin diğer benzer schiff bazı bileşikleri için iyi bir model olabileceğini ve ilaç tasarımı için de önemli moleküler türler olarak sınıflandırılabilenini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Floresans sönüm, pepsin, HSA, schiff bazı, termodinamik parametreler, FRET, moleküler kenetlenme.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF BINDING PROPERTIES BETWEEN A SCHIFF BASE BASED ON COUMARIN-HYDRAZONE AND PEPSIN/HSA BY SPECTROSCOPIC AND MOLECULAR DOCKING METHODS**

**ESRA ÖZGENÇ**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU**

**December 2020, 65 pages**

In this thesis, a new schiff base based on coumarin-hydrazone was synthesized (HZC) and its structure were characterized by spectroscopic methods. HZC and protein (pepsin and HSA) interactions were investigated by spectroscopic (absorption, fluorescence) and molecular docking methods. HZC-pepsin and HZC-HSA interactions were studied in pH 2.0 and pH 7.4 buffer environments at different temperatures, respectively. The fluorescence quenching constants ( $K_{sv}$ ), binding constants ( $K$ ), binding part numbers ( $n$ ) were obtained from fluorimetric experiments and besides, according to static quenching mechanism indicated that it was concluded a complex structure was formed between HZC and proteins. Also, bonding types were explained according to the calculated thermodynamic parameters ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ). The negative  $\Delta H$  and positive  $\Delta S$  parameters showed that electrostatic interactions as well as hydrophobic forces play a role in the binding of HZC with both proteins. In the fluorimetric method proposed in the thesis, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) values were calculated for the quantitative determination of HZC under the experimental conditions containing

pepsin/ HSA. Accordingly, for HZC, the LOD and LOQ values were found as  $3.52 \times 10^{-6}$  M and  $1.17 \times 10^{-5}$  M, respectively, in the presence of pepsin; at the same time LOD and LOQ values were found  $3.81 \times 10^{-7}$  M and  $1.27 \times 10^{-6}$  M, respectively, in the presence of HSA.

According to Förster's theory, using the FRET method, the distance (r) between donor-acceptor molecules was calculated as 3.67 nm for HZC-pepsin and 2.19 nm for HZC HSA. These results showed that non-radiative energy transfer between derivative-protein molecule pairs is effective. The obtained experimental data were supported and validated by molecular docking results. Both spectral and computational results show that the HZC derivative can be a good model for other similar schiff compounds and can be classified as critical molecular species for drug design.

**Keywords:** Fluorescence quenching, pepsin, HSA, schiff base, thermodynamic parameters, FRET, molecular docking.

## TEŞEKKÜR

Lisans dönemim ve yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, her zaman desteği ile yanımda olduğunu hissettiren sayın danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

İlgili ana madde sentezinde ve deneysel çalışmalar sırasında ilgili tüm sorularımıza desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Zeynel SEFEROĞLU'na ve Arş. Gör. Halil DUYAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler kenetlenme çalışma sonuçları ve değerlendirmeleri için Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK'a teşekkür ederim.

Beni sonsuz emekleri ile bugünlere getiren, aldığım bütün kararlarda yanımda olan, eğitim ve çalışma hayatım boyunca büyük bir özveri ile desteklerini ve güvenlerini her daim en yakınımnda hissettiren, beni koşulsuz seven, cesaretlendiren ve böyle bir aileye sahip olduğum için beni şanslı hissettiren sevgili babam Adnan YILMAZ'a, sevgili annem Nuriye YILMAZ'a ve canım ablam Kamile NEBİOĞLU'na tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitimlerim süresince desteklerini kilometrelerce uzaktan hissettiren sevgili babam İrfan ÖZGENÇ'e ve sevgili annem Selvi ÖZGENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

En ihtiyacım olduğu anlarda bana ikinci bir aileye de sahip olduğum hissini veren, güler yüz ve samimiyetleriyle her zaman yanımda olan sevgili Recep ARI'ya ve Engin Elmas ARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca tecrübelerini ve öngörülerini benimle paylaşan, katettiğim tüm yollarda benimle birlikte olan, bana güvenen, beni cesaretlendiren ve desteğini her zaman en yakınımnda hissettiren hayat arkadaşım Gökhan ÖZGENÇ'e çok teşekkür ederim.

Esra ÖZGENÇ

Aralık, 2020

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Floresans spektroskopik yöntemler.....	3
2.1.1. Floresan maddeler, floresan uçlar ve işaretleme yöntemi.....	5
2.1.2. Floresans sönüm ve Stern-Volmer eşitliği.....	6
2.1.3. Termodinamik etkileşimler ve bağlanma parametreleri.....	8
2.2. Floresans rezonans enerji transferi (FRET).....	8
2.3. Proteinler ve özellikleri.....	11
2.3.1. Protein-ligand etkileşimlerinde florimetrik çalışmalar .....	14
2.3.2. Proteaz enzimleri ve pepsin .....	15
2.3.3. Serum albüminler ve HSA .....	17
2.4. Kumarin bileşikleri ve schiff bazının özellikleri .....	19
2.5. Moleküler kenetlenme analizi .....	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. HZC bileşiğinin sentezi ve karakterizasyonu.....	23



3.2. Kullanılan kimyasallar.....	25
3.3. Kullanılan cihazlar.....	25
3.4. Florimetrik çalışmalar.....	25
3.5. Absorpsiyon deneyleri.....	26
3.6. Moleküler kenetlenme çalışmaları.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. HZC-pepsin etkileşiminin floresans çalışmaları.....	27
4.1.1. HZC-pepsin etkileşiminde termodinamik parametrelerin ve bağlanma türünün belirlenmesi.....	30
4.1.2. HZC-pepsin etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları.....	31
4.1.3. HZC-pepsin etkileşiminde floresans rezonans enerji transferi çalışmaları.....	33
4.1.4. HZC-pepsin moleküler kenetlenme çalışmaları.....	34
4.2. HZC-HSA etkileşiminin floresans çalışmaları.....	37
4.2.1. HZC-HSA etkileşiminde termodinamik parametrelerin ve bağlanma türünün belirlenmesi.....	39
4.2.2. HZC-HSA etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları.....	40
4.2.3. HZC-HSA etkileşiminde floresans rezonans enerji transferi çalışmaları.....	42
4.2.4. HZC-HSA moleküler kenetlenme çalışmaları.....	43
4.3. HZC'nin pepsin ve HSA varlığında tayini için analitik veriler.....	45
5. YORUM.....	46
KAYNAKLAR.....	49
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Jablonski diagramı.....	4
Şekil 2.2. Donör-akseptör molekül çifti arasındaki enerji aktarım mekanizması.....	9
Şekil 2.3. Molekül içi enerji aktarımı.....	10
Şekil 2.4. Ortamın pH'sına bağlı olarak bir amino asitin yapısal gösterimleri.....	13
Şekil 2.5. Pepsinin üç boyutlu yapısı.....	16
Şekil 2.6. HSA'nın üç boyutlu yapısı.....	18
Şekil 2.7. a) Kumarin ve b) HZC türevinin molekül yapıları.....	21
Şekil 2.8. Moleküler kenetlenme örneği.....	22
Şekil 3.1. HZC (Bileşik 6)'nin sentezlenme şeması.....	24
Şekil 4.1. $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsin üzerine artan derişimlerde HZC eklenmesi ile elde edilen floresans spektrumları. HZC derişimi: 0, 1.95; 3.89; 5.82; 7.75; 9.66; 11.6; 13.5; 15.4; 17.3; 1.91; 21.0; 22.9; 24.7; 26.6 ( $\times 10^{-6}$ ) M. $\lambda_{uy}=280$ nm, 298 K, pH= 2.0.....	27
Şekil 4.2. $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsin ile HZC etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen Stern-Volmer grafikleri.....	28
Şekil 4.3. $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsin ile HZC etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen log-log grafikleri.....	29
Şekil 4.4. Pepsin ile HZC etkileşiminde elde edilen van't Hoff grafiği.....	30
Şekil 4.5. HZC ile Pepsin etkileşiminde elde edilen (1:1) absorpsiyon spektrumları. <b>1)</b> $2.0 \times 10^{-6}$ M HZC <b>2)</b> $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsin <b>3)</b> $2.0 \times 10^{-6}$ M HZC- $2 \times 10^{-6}$ M pepsin karışımı....	32
Şekil 4.6. $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsin (spektrum 2) ile HZC etkileşimine ait absorpsiyon spektrum. 2. spektrumdan 8. spektruma doğru eklenen HZC derişimleri: 0.0, 1.95, 3.89, 5.82, 7.75, 9.66 ve 11.5 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum 1: $2.0 \times 10^{-6}$ M HZC).....	33
Şekil 4.7. $2.0 \times 10^{-6}$ M pepsinin floresans spektrumu <b>(a)</b> ile $2.0 \times 10^{-6}$ M HZC'nin absorpsiyon spektrumunun <b>(b)</b> örtüşmesi.....	34

<b>Şekil 4.8.</b> HZC'nin moleküler yapısı (sol tarafta) ve Gaussian09 programı DFT/B3LYP/6-31G* dayanılarak optimize edilen MEPS haritası (sağ tarafta).....	35
<b>Şekil 4.9.</b> Pepsin bağlanma bölgesinde HZC'nin <b>a)</b> 3 boyutlu ve <b>b)</b> 2 boyutlu etkileşimleri.....	36
<b>Şekil 4.10.</b> $5.0 \times 10^{-6}$ M HSA üzerine artan derişimlerde HZC eklenmesi ile elde edilen floresans spektrumları. HZC derişimi: 0, 0.433; 0.865; 1.29; 1.72; 2.15; 2.57; 3.00; 3.42; 3.84; 4.25; 4.67; 5.09; 5.50; 5.91 ( $\times 10^{-6}$ ) M. $\lambda_{uy}=294$ nm, 298 K, pH=7.4.....	37
<b>Şekil 4.11.</b> $5.0 \times 10^{-6}$ M HZC-HSA etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen Stern-Volmer grafikleri.....	38
<b>Şekil 4.12.</b> $5.0 \times 10^{-6}$ M HZC ile HSA etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen log-log grafikleri.....	39
<b>Şekil 4.13.</b> HZC ile HSA etkileşiminde elde edilen (1:1) absorpsiyon spektrumları. <b>1)</b> $5 \times 10^{-6}$ M HZC, <b>2)</b> $5 \times 10^{-6}$ M HSA, <b>3)</b> $5 \times 10^{-6}$ M HZC- $5 \times 10^{-6}$ M HSA karışımı.....	41
<b>Şekil 4.14.</b> $5.0 \times 10^{-6}$ M HSA (spektrum 2) ile HZC etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. 2. spektrumdan 7. spektruma doğru eklenen HZC derişimleri: 0.0; 4.33; 8.64; 12.9; 17.2 ve 21.4 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum 1: $5.0 \times 10^{-6}$ M HZC) .....	41
<b>Şekil 4.15.</b> $5.0 \times 10^{-6}$ M HSA'nın floresans spektrumu (a) ile $5.0 \times 10^{-6}$ M HZC'nin absorpsiyon spektrumunun (b) örtüşmesi.....	42
<b>Şekil 4.16.</b> HSA bağlanma bölgesinde HZC'nin a) 3 boyutlu ve b) 2 boyutlu etkileşimleri.....	44

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 4.1.</b> HZC-Pepsin etkileşiminde Stern-Volmer verileri.....	28
<b>Çizelge 4.2.</b> HZC-Pepsin etkileşiminde, K bağlanma sabitleri ve n bağlanma kısım sayıları.....	29
<b>Çizelge 4.3.</b> HZC-Pepsin etkileşiminde elde edilen termodinamik parametreler.....	31
<b>Çizelge 4.4.</b> HZC-Pepsin etkileşiminin rezonans floresans enerji transfer parametresi...34	34
<b>Çizelge 4.5.</b> HZC-Pepsin kompleksinin bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti değeri...36	36
<b>Çizelge 4.6.</b> HZC-HSA etkileşiminde Stern-Volmer verileri.....	38
<b>Çizelge 4.7.</b> HZC-HSA etkileşiminde, K bağlanma sabitleri ve n bağlanma kısım sayıları.....	39
<b>Çizelge 4.8.</b> HZC-HSA etkileşiminde elde edilen termodinamik parametreler.....	40
<b>Çizelge 4.9.</b> HZC- HSA etkileşiminin rezonans floresans enerji transfer parametreleri...43	43
<b>Çizelge 4.10.</b> HZC-HSA kompleksinin bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti değeri....44	44
<b>Çizelge 4.11.</b> Pepsin/HSA varlığında HZC tayini için analitik sonuçlar.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\Delta H$	Entalpi
$\Delta G$	Gibbs Serbest Enerji
$\Delta S$	Entropi
HZC	(3-((2-(benzo[d]tiazol-2-il)hidrazon)metil)-7-(dietilamino)-2H-kromen-2-on)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
UV	Ultraviyole
TLC	İnce tabaka kromatografisi
HSA	İnsan Serum Albümin
BSA	Bovin Serum Albümin
DNA	Deoksiribonükleik asit
$K_{sv}$	Stern-Volmer Sönüm Sabiti
K	Bağlanma Sabiti
n	Bağlanma kısım sayısı
$R_0$	% 50 enerji transferindeki kritik uzaklık
r	Donör-akseptör çifti arasındaki uzaklık
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi

# 1. GİRİŞ

Biyomoleküller, canlı organizmaların bakımı, onarımı ve metabolik süreçler içinde yer alan önemli bileşiklerdir. Amino asitler, peptitler ve proteinler, insan vücudunda hayati rol oynayan ve çok miktarda bulunan önemli biyomoleküllerdir. Proteinler; ilaç etkilerini, metal ve çevresel kirleticilerin (organik küçük moleküller, ağır metaller, nano malzemeler, vb.) toksisitelerini araştırmak için ana hedeflerdir. Araştırmalara göre, birçok hastalık bozulmuş amino asit metabolizmasından kaynaklanmaktadır. Çoğu ligand, protein konformasyonunun değişmesine ve dolayısıyla fonksiyonlarının tahrip olmasına neden olabilir. Bu nedenle biyolojik sistem içinde, küçük moleküllerin taşınma ve dağılımında protein-ligand etkileşim çalışmaları oldukça önemli sonuçlar vermektedir (Liu et al. 2009). Protein-ligand bağlanma özelliklerinin incelenmesinde başta floresans, UV-absorpsiyon, sirkular dikroizm, FTIR gibi spektroskopik teknikler kullanılmasının yanında son yıllarda moleküler kenetlenme çalışmaları da büyük önem kazanmıştır. Proteine bir ligandın bağlanması ile protein içindeki floresans özelliğe sahip florofor yapının etrafındaki lokal mikro çevresini değiştirebilir, bu da proteinin konformasyonunda değişikliğe neden olmaktadır.

Floresans spektroskopisi çevre kimyası, klinik kimya, ilaç analizi, genetik analiz, biyomoleküler çalışmalar vb. birçok alanda kullanılan bir yöntemdir. Avantajları arasında; kolaylık, çevresel değişikliklere karşı yüksek duyarlılık ve protein-ligand arasındaki etkileşimleri hem nitel hem nicel olarak tanımlanmasıdır (Bhattacharyya et al. 2010). Floresans sönüm bir florofordan oluşan floresansın kuantum veriminin azalması olarak tanımlanır. Bu ise florofor ile söndürücü molekül arasında çeşitli moleküler etkileşimlerinden meydana gelir. Proteinlerin floresans sönüm çalışmaları, protein ile ligand etkileşiminin incelenmesi açısından oldukça önemlidir ve sönümüne neden olan molekül ile bağlanma mekanizmaları açıklanabilir, yeni floresan ligandların (boya, floresant uç, ilaç etken maddesi, metal-kompleksi vs.) dizayn edilmesine de olanak sağlar. Bir proteinin florimetrik yöntemle çalışılabilmesi için, doğal floroforlar olarak bilinen ve floresans özellik gösteren aromatik amino asit uçlarına sahip olması gerekmektedir. Floresans kuantum verimlerine göre bu uçlar sırasıyla; Triptofan (Trp), Tirozin (Tyr) ve Fenilalanin (Phe) 'dir. Diğer bir yöntem ise floresan işaretleme yöntemi olup, floresan

özelliğ göstermeyen moleküllere floresan özelliği kazandırmak için doğal veya sentetik floresan yapılar ile etkileşimi sağlamaktır (Misra, 2019).

Schiff bazı ligandları, doğal biyolojik maddelere benzer yapısı nedeniyle klinik, biyolojik, farmasötik ve analitik alanlarda son yıllarda oldukça ilgi görmektedir (Kamaci et al. 2017). Diğer yandan kumarin ve türevleri antioksidan, antiviral, antifungal, antikanserojen vb. gibi özelliklere sahip bir boya molekülü sınıfını oluşturan ve üzerinde geniş çapta araştırmalar yapılan bileşiklerdir. Kumarin türevleri oldukça verimli fotokimyasal/fotofiziksel özellikleri, biyouyumluluğu ve organik birçok sentezde çıkış maddesi olarak kullanılması ile çok yönlülüğe sahip bileşiklerdir. Kısa yanıt süreleri, yüksek seçicilikleri ve duyarlılıkları nedeniyle bazı kumarin türevleri sensör olarak da kullanılmaktadır (Feng et al. 2019).

Bu tez çalışmasında, pepsin ve insan serum albümin (HSA) ile kumarin-hidrazon temelli bir schiff bazı (HZC) arasındaki etkileşimin, başta floresans spektroskopisi olmak üzere UV-görünür bölge spektroskopisi yöntemleri ile incelenmiştir. Stern-Volmer eşitliği kullanılarak farklı sıcaklıklarda floresans sönüm mekanizması, bağlanma kısım sayıları ve bağlanma sabitleri tayin edilmiştir. Bağlanma türünün belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen verilerden termodinamik parametreler ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ) hesaplanmıştır. Floresans rezonans enerji transferi (FRET) yöntemi ile donör-akseptör molekül çiftleri arasındaki uzaklıklar ( $R_0$  ve  $r$ ) belirlenerek proteinden türetilmiş ışısız enerji transferinin gerçekleştiği açıklanmıştır. Ayrıca HZC-pepsin/HSA etkileşim sonuçları, bilgisayar programı içeren moleküler kenetlenme sonuçları ile desteklenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Floresans spektroskopik yöntemler

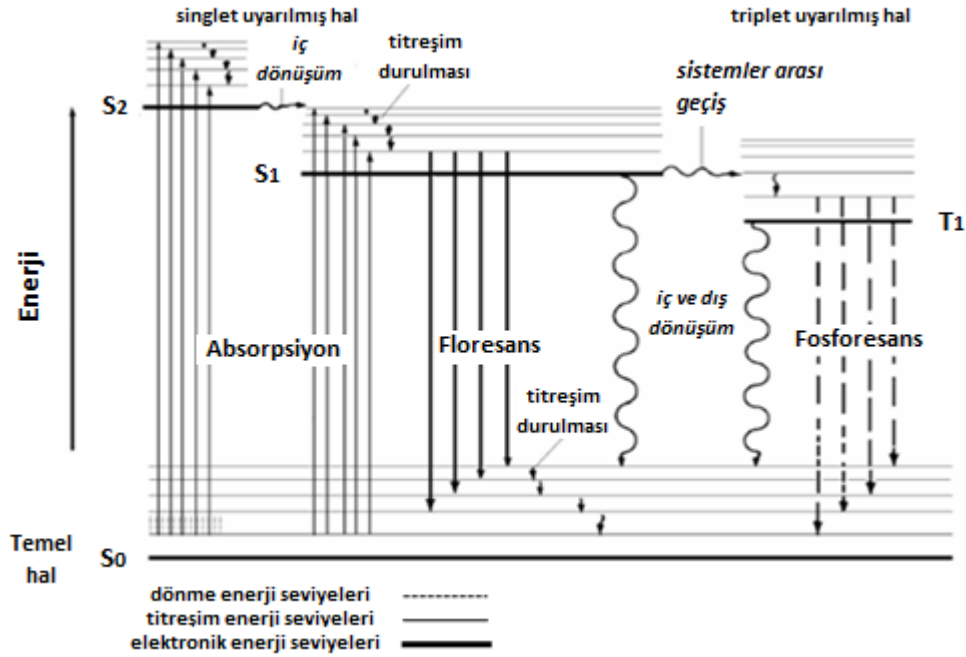
Lüminesans kararlı haldeki bir atom veya molekülün herhangi bir dış etkenle uyarılması sonrasında izlenen ışık emisyonuna dayanan yöntemlerin genel adıdır. İncelenen molekülün uyarılış şekline göre değişik adlandırmalar yapılır. Floresans ve fosforesans, foton absorpsiyonu ile uyarma sağlanması nedeniyle fotolüminesans olarak bilinirler. Kemilüminesans ise bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış bir türün ışın emisyonu yapmasına dayanır. Fotolüminesans ve kemilüminesans şiddetinin ölçümü, eser miktardaki bazı inorganik ve organik türlerin nicel tayinini mümkün kılar. Bu yöntemlerin gözlenebilme sınırları genellikle absorpsiyon spektroskopi yöntemlerinden bin kat daha duyarlıdır. Floresans spektroskopi ile nicel analiz için oldukça önemli olan geniş doğrusal çalışma aralıkları ile birçok bileşiğin analizi yapılabilir.

Şekil 2.1 de Jablonski diyagramında görüldüğü gibi, uyarılmış bir molekül fazla enerjisini farklı yollarla *ışımali* ve *ışımsız* şekilde atabilir. En alttaki koyu çizgi, bir molekülün temel hal enerjisini göstermekte olup, singlettir ve  $S_0$  ile gösterilmiştir. En üstteki koyu çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji düzeylerini göstermektedir.  $S_1$  ve  $S_2$  uyarılmış singlet hal,  $T_1$  uyarılmış triplet haldir. Normal olarak, birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, ona karşılık gelen singlet halin enerjisinden daha düşüktür.  $S_0$  düzeyinde bir molekül ışın absorplayınca uyarılmış singlet halin ( $S_1$  ve  $S_2$ ) farklı titreşimsel alt düzeylerine geçişleri olabilir. Fakat doğrudan triplet hale uyarılma gerçekleşmez. Singlet-triplet geçişlerinin ihtimali çok düşük olup bu tür düşük ihtimalli geçişlere yasaklı geçiş denir.

*Floresans*; uyarılmış singlet halden, temel singlet hale geçişi sırasında molekülün yaymış olduğu ışına denir. *Fosforesans*; uyarılmış triplet halden, temel singlet hale geçişi sırasında molekülün yaymış olduğu ışına denir. Floresans ve fosforesansın birbirinden farkı; fosforesansta ışımaya yol açan elektronik enerji geçişlerinde elektron spininin değişmesi olup, floresansta elektron spin yönleri aynı kalmaktadır. Tripletten singlete geçişin ortalama hızı, buna karşılık gelen singlet-singlet geçişlerinin ortalama hızından azdır. Buna bağlı olarak, floresansta uyarılmış halin ömrü  $< 10^{-5}$  s dolaylarında olup çok



kısadır. Fosforesansta ise elektron spininde değişme olduğundan dolayı uyarılmış halin ömrü saniyeler, dakikalar dolaylarında olabilir.



Şekil. 2.1. Jablonski diyagramı.

*Rezonans floresans*; frekansta değişiklik olmaksızın absorplanan ışının bir değişiklik veya kayıp olmadan yayılmasını kapsayan floresanstır. *Stokes Kayması*; bazı moleküller, floresans veya fosforesans sonrasında rezonans çizgisine göre daha uzun dalga boylarına ya da daha düşük enerjilere kayabilme durumudur.

Sınırlı sayıda molekül fotoluminesans olayını gerçekleştirdiği gibi, bir molekülün fotoluminesans yapıp yapmayacağını o molekülün yapısı ve kimyasal çevresi belirler. Molekülde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimi artırır. Halkalı bir organik molekülde, halkanın elektron yoğunluğunu arttıran süstituentler de floresans verimi artırır. Molekülün yapısında veya çözündüğü çözücüde bulunan ağır atom (I, Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır; triplet oluşumunu artırır, dolayısıyla fosforesans verim artar. pH, ortamın sıcaklığı ve çözücünün viskozitesi fotoluminesans olayları etkileyen faktörlerdir (Skoog et al. 2013).

### 2.1.1. Floresans maddeler ve işaretleme yöntemi

Protein, amino asit ve peptit gibi biyomoleküllerin canlı hücre üzerinde takibini gerçekleştirebilmek amacı ile bazı sensörler ile etiketlenmesine ihtiyaç duyulur. Günümüzde birçok *işaretleme (labeling)* yöntemi olarak izotop işaretleyiciler, radyoaktif izleyiciler, kalorimetrik biyosensörler, elektrokimyasal sensörler ve floresans uçlar bu amaç için kullanıma uygundur. Bu yöntemler arasında, floresans işaretleme yöntemi, zarar vermeyen doğası, floresans tekniğinin küçük hacimli ölçümlerde ve düşük derişimlerde çalışmaya elverişli olması ve yüksek hassasiyet özellikleri ile diğer yöntemlere göre üstünlük gösterir. Floresans işaretleme, genellikle floroforun hedef biyomolekülde bulunan fonksiyonel bir gruba seçici olarak bağlanması ile gerçekleşir. Uygun bir floresan uç ve işaretleme prosesi seçerken aşağıdaki bazı durumlara dikkat edilmesi gerekir:

- Floresans uçların boyutları küçük ve kimyasal olarak kararlı olmalı,
- Floresans uç, hedef proteinin yapısına minimum biyolojik müdahalede bulunabilmeli,
- İşaretleme tepkimesi, yüksek oranda etkili ve hedef moleküle uyarlanabilir olmalı,
- Hedef molekülün spesifik kısmı ile floresans uç arasında tercihen kovalent bağ oluşmalıdır.

Sentetik floresans uçlar, işaretleme tekniğinin gereksinimini karşılamak için farklı reaktif kimyasal gruplarla türevlendirildikleri için, çok çeşitli özellikler ve işlevlere sahiptirler. Geniş aralıklı uyarma ve emisyon dalga boyları ile yüksek kuantum verimine sahip olmalarına rağmen, sentetik organik florofor molekülleri hücre görüntüleme çalışmalarında kullanılamaz. Çünkü hedef proteinler ve onların hücre içerisindeki toksik etkileri arasındaki spesifik bağlantıyı kurmak oldukça zordur (Sahoo, 2012).

Floresans işaretleme yöntemleri ve gelişmiş floresans mikroskopisi, araştırmacıların hem *in vivo* hem de *in vitro* sistemlerde protein dağılımını, yer değiştirmelerini ve etkileşimlerini araştırmasını sağlamıştır. Bu sayede özel ve verimli floresans işaretleme yöntemi ile bir proteinin, biyolojik özelliklerinden yararlanılması ve kompleks bir biyolojik yapıda işlevinin açıklanması sağlanabilir. Bu yöntemin kullanımı, sadece küçük sentetik floroforlar ve floresans proteinler ile sınırlı değildir. Aynı zamanda iletken nanokristaller kullanılarak, biyomoleküllerin kuantum noktaları ile etiketlenmesi son

yıllarda büyük araştırmalara da ilham vermeye başlamıştır (Sahoo, 2012; Fernandez-Suarez and Ting, 2008). Ayrıca, proteinlerde veya peptitlerde moleküldeki konformasyonel araştırmaların (Sahoo, 2011) ve metal iyonlarının, canlı hücre içerisinde ilgili ligand ile etkileşimlerinin de incelenmesine olanak sağlamaktadır (Jung et al. 2013). Floresans uçlar yapı olarak ikiye ayrılırlar:

- İntresik (doğal, iç) uçlar: Yapısında bulunan ve kendiliğinden floresans özelliğe sahip olan doğal uçlardır. Proteinler, Trp ve Tyr gibi aromatik amino asit uçlardan dolayı intrinsik floresans özellik gösterirler (Gonçalves, 2009).
- Ekstrinsik (dış) uçlar: Trp ve Tyr amino asit uçları içermeyen, proteinlere kovalent bağ ile bağlanarak, DNA gibi çok az floresans özelliğe sahip olan veya floresan özelliğe sahip olmayan bileşiklere floresan özelliği kazandıran uçlardır. Floresein izosiyanat, thioflavin T gibi floresans boyalar, etidinyum bromür, akridin oranj, kumarin ve türevleri, rodamin, floresein, naftofuran gibi bileşikler bu gruba örnek olarak verilebilir (Hawe et al. 2008; Pilato et al. 2005). Sentetik floresan uçlar yani ekstrinsik uçlar, geliştirilmiş fotokimyasal özelliklere sahip olduklarından daha geniş dalga boyu aralığı, renk çeşitliliği gibi avantajlar ve etiketlemenin hangi konumdan yapılabileceği konusunda da esneklik sağlamaktadır (Toseland, 2013).

Bununla birlikte, son yıllarda floresans tekniklere dayalı tayin ve teşhis yöntemlerinin özel ilgi görmesiyle birlikte hem floresans cihazlarda hem de yeni sentetik florofofların sentezinde kayda değer ilerleme sağlanmıştır.

### **2.1.2. Floresans sönüm ve Stern-Volmer eşitliği**

Floresans sönüm (quenching) terimi, uyarılmış bir molekülden ortamdaki diğer türlere ışımasız enerji aktarımı olarak tanımlanır (Skoog et al. 2013) ve uyarılmış hal reaksiyonları, enerji transferleri, temel hal kompleks oluşumu ile çarpışma gibi çeşitli süreçlerden kaynaklanan florofofların kuantum veriminin azalmasına sebep olur. Diğer bir deyişle floresans sönüm, çözeltide floresan özellik gösteren bir yapıya (florofoflar), söndürücü (quencher) adı verilen bir maddenin eklenmesi ile floresans yoğunlukta azalma sonucu gerçekteşen olaydır (Shi et al. 2010; Silva et al. 2004).

Floresans sönüm, *dinamik* ve *statik* sönüm olmak üzere iki mekanizma ile açıklanır. *Dinamik sönüm* ya da diğer adıyla *çarpışmalı sönüm*, florofor ile söndürücü arasındaki çarpışmalardan kaynaklanır (Silva et al. 2004). Bu olayın gerçekleşmesi için florofor ile söndürücü türün doğrudan temas etmesi gerekir. Dinamik sönüm hızı, çarpışan türlerin difüzyon hızları ile ilgilidir. Bu hız sıcaklığa ve viskoziteye bağlıdır. *Statik sönüm* ise, söndürücü molekül ile floroforun temel halde, kompleks bir yapı oluşturmasını öne sürmektedir (Skoog et al. 2013). Her iki mekanizmada da floresans sönüm, florofor ve söndürücü arasındaki moleküler etkileşimde önemli gerekliliktir. Ayrıca bir florofor, bazı koşullar altında hem çarpışma hem de kompleks oluşumu ile aynı söndürücü ile söndürülebilir. Dinamik ve statik sönümlenme, sıcaklığa karşı olan farklı davranışları ile ayırt edilebilir. Dinamik sönüm için, yüksek sıcaklıklarda daha hızlı difüzyon ve daha iyi sönüm olayının gerçekleştirdiği bilinmektedir. Dinamik sönüm sabiti artan sıcaklıkla artar, çünkü sıcaklık arttıkça moleküller arası temas ve çarpışma olasılıkları da artmaktadır. Fakat statik sönüm için yüksek sıcaklık kompleks kararlılığını azaltması nedeniyle ters etki gözlenmektedir (Zhang et al. 2012).

Florofor ile söndürücü tür arasındaki sönüm mekanizması, aşağıda verilen *Stern-Volmer* eşitliği kullanılarak incelenir.

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (1)$$

$F_0$  ve  $F$ , sırası ile floresan maddenin söndürücü yokluğunda ve varlığındaki floresans şiddetidir.  $[Q]$ , söndürücü maddenin derişimidir.  $K_{sv}$ , Stern-Volmer sönüm sabiti;  $k_q$ , biyomoleküle ait sönüm hız sabiti ve  $\tau_0$ , ortamda söndürücü yokken biyomolekülün ortalama ömrüdür (Lakowicz, 2006). Bu durumda sönüm olayının hangi mekanizma ile gerçekleştiğinin anlaşılması, farklı sıcaklıklarda floresans ölçümlere dayanmaktadır. Florofor ve söndürücü arasındaki farklı sıcaklıklardaki bağlanma sabitleri ( $K$ ) ve bağlanma kısım sayıları ( $n$ ); Stern Volmer eşitliğinin modifiye edilmesiyle elde edilen çift logaritma eşitliğinden bulunabilir.

$$\log (F_0-F)/F = \log K + n \log [Q] \quad (2)$$

### 2.1.3. Termodinamik etkileşimler ve bağlanma parametreleri

Protein-ligand arasındaki temas esnasında bazı termodinamik etkileşimler ve etkileşimlere bağlı olarak farklı bağ türleri meydana gelmektedir (Li and Yang, 2015). Küçük moleküller ile biyomoleküller arasında dört farklı kovalent olmayan bağlanma tipi mevcuttur. Bunlar; *hidrojen bağları*, *van der Waals kuvvetleri*, *elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerdir*. Farklı sıcaklık çalışmalarından elde edilen termodinamik parametrelerin  $\Delta G$  (serbest enerji),  $\Delta H$  (entalpi değişimi),  $\Delta S$  (entropi değişimi) işaretleri ve büyüklükleri etkileşim türlerinin belirlenmesinde sıkça kullanılır.  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  bağlanma kuvvetleri arasındaki kanıt olarak gösterilebilir. Eğer sıcaklıkta önemli bir değişiklik yoksa,  $\Delta H$  sabit olarak kabul edilebilir ve daha sonra  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri aşağıda verilen *van't Hoff* eşitliğinden bulunabilir.

$$\log K = -\Delta H / 2.303RT + \Delta S / 2.303R \quad (3)$$

$\Delta H$  ve  $\Delta S$  parametreleri,  $\log K$  değerlerinin  $1/T$  değerlerine karşılık gelecek şekilde grafiğe aktarılması ile bulunabilir.  $\Delta G$  değeri ise,  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri bulunduğundan sonra, farklı sıcaklık değerleri için aşağıdaki eşitlikten hesaplanmaktadır.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (4)$$

Elde edilen termodinamik parametrelerin işareti ve büyüklüğü, etkileşim türü hakkında bilgi verir.  $\Delta G < 0$  ise reaksiyon mekanizmasının kendiliğinden ve  $\Delta H < 0$  ise reaksiyonun ekzotermik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Negatif  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  değerleri, florofor ile söndürücü arasındaki etkileşimde, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin ana etken olduğuna işaret etmektedir.  $\Delta S > 0$  ise hidrofobik etkileşimlerin varlığı hakkında bilgi vermektedir (Lakowicz, 2006).

### 2.2. Floresans rezonans enerji transferi (FRET)

İki kromofor arasındaki enerji transfer mekanizması olarak bilinen FRET ile elektronik uyarılmış donörden temel seviyedeki akseptöre, uyarılma enerjisinin aktarımı yoluyla moleküller arası uzaklığa bağlı etkileşim incelenir. Donörün floresans (emisyon) spektrumu ile akseptörün absorpsiyon spektrumlarının örtüşmesi önem taşır (Şekil 2.2). Olayda akseptörün elektronik uyarılması ve donör floresansının sönümü eş zamanlı oluşmaktadır. Enerji transfer verimliliği, donör ve akseptör çifti arasındaki bağlı mesafeyi ölçmede önemli bir durumdur. İlk olarak 1948 yılında T. Förster, donör ve akseptör moleküllerinin geometrik ve spektroskopik özelliklerine göre; ışısız dipol-dipol

etkileşimi sonucunda moleküler rezonans enerji transferi oluştuğunu ve etkileşimin gerçekleşmesi için bu molekül çifti arasındaki mesafenin ( $r$ ) 10 nm den küçük olması gerektiğini öne sürdü (Förster, 1948). Förster teorisine göre donör ile akseptör arasındaki etkileşim parametreleri olan enerji transfer verimliliği ( $E$ ) ve % 50 enerji transferindeki kritik uzaklık ( $R_0$ ) ile donör-akseptör çifti arasındaki uzaklık ( $r$ ) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanır (Lakowicz, 2006).

$$E = 1 - F / F_0 \quad \text{ve} \quad (5)$$

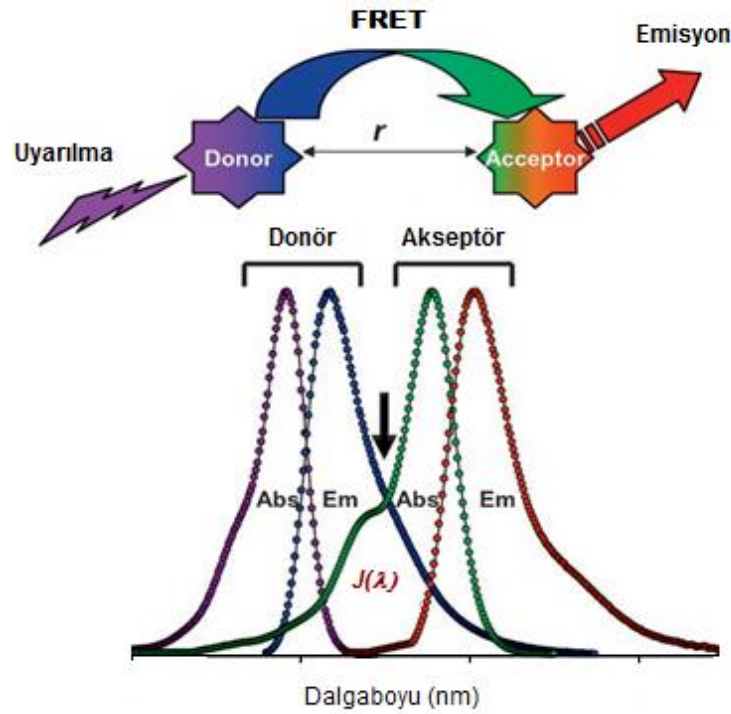
$$E = R_0^6 / R_0^6 + r^6 \quad (6)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} (k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)) \quad (7)$$

$k^2$ , yönelme faktörü;  $n$ , ortamın kırılma indisi;  $Q_D$ , donörün kuantum verimini gösterir.  $J(\lambda)$  parametresi donör floresans spektrumu ile akseptör absorpsiyon spektrumunun örtüşme integrali olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir.

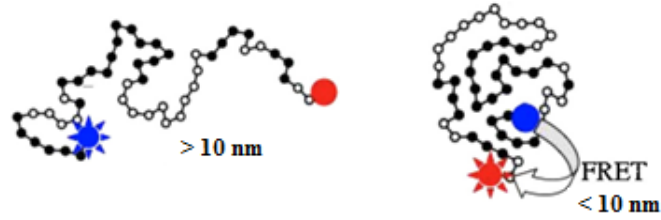
$$J(\lambda) = \sum F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F_D(\lambda) \quad (8)$$

eşitlikte  $F_D(\lambda)$  normalize edilmiş donör emisyon spektrumu ( $\lambda$  ve  $\lambda + \Delta\lambda$  dalga boyları arasındaki eğri altında kalan alan);  $\varepsilon_A(\lambda)$ ,  $\lambda$  dalga boyunda akseptör molar ekstinksiyon katsayısıdır.



**Şekil 2.2.** Donör-akseptör molekül çifti arasındaki enerji aktarım mekanizması.

Protein-protein etkileşim çalışmalarında proteinlerdeki *moleküller arası* ve *molekül içi* değişiklikler hakkında bilgi edinmek için genellikle FRET yöntemi tercih edilmektedir. Moleküller arası enerji aktarımının yanı sıra, bazı moleküllerde molekül içindeki donör-akseptör görevi yapan uçlar arasında da enerji aktarımı meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Molekül içi mesafeleri ölçme araştırmaları, kataliz sırasında enzimin konformasyonel dinamiklerini, farklı mesafelere veya konformasyonel durumlara sahip bir karışımdaki molekül alt popülasyonlarını ayırt etme ve izleme olanağı sağlamıştır. Dedektör teknolojisindeki gelişmeler, büyük kuantum verimleri ve fotokimyasal kararlılığa sahip floroforların kullanımı, FRET'in molekül içi enerji aktarımını ölçmeyi mümkün kılmıştır. Bu gelişme, protein katlanmasına ilişkin tek moleküllü çalışmalara olanak sağlamıştır ve moleküller katlandıkça molekül içi mesafeler hakkında bilgi edinmeyi amaçlamıştır (Best et al. 2007).



**Şekil 2.3.** Molekül içi enerji aktarımı.

Moleküller arası FRET araştırmaları, substrat moleküllerinin birleşme ve ayrışma mesafelerini ölçerek molekül çiftleri arasındaki enerji aktarımı hakkında bilgi vermektedir (Weiss, 1999; Deniz et al. 1999). FRET, moleküler etkileşimler sırasında proteinlerin yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliklerin incelenmesi, duyarlılığının yüksek olması ve seyreltik numune çözeltilerine kolaylıkla uygulanabilmesi açısından oldukça avantajlı bir yöntemdir. Canlı hücrelerde ve hatta organizmalarda moleküler etkileşimlerin nicel olarak açıklanmasını sağlamaktadır (Sahoo, 2011). Ayrıca tıbbi teşhisler, DNA analizi ve optik görüntüleme dahil birçok floresans uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Li and Seeger, 2011).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, ağrı kesici özelliğe sahip olan ibuprofen ve naproxen türevlerinin tripsin ile protein-ligand etkileşimleri FRET yöntemi kullanılarak da incelenmiştir. Her iki ilaç türevinin tripsin ile olan mesafeleri ve enerji aktarımları

nicel olarak hesaplanmıştır ve karşılaştırılmıştır (Gökoğlu et al. 2016). Ateş düşürücü ve ağrı kesici özelliğe sahip indometazin ilaç türevi ile HSA etkileşimini inceleyen bir diğer çalışmada da FRET yöntemi kullanılmıştır (Bogdan et al. 2008). Bu tür ilaç-protein etkileşim çalışmaları yeni ilaç türevlerinin sentezinde, ilaç olarak önerilen moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının araştırılmasında oldukça önemli yer tutmaktadır. Organizmalardaki biyolojik olayların araştırılmasında sensör olarak kullanılan kuantum tanecikleri ile (quantum dots) (Ge et al. 2011; Clapp et al. 2003, Algar and Krull, 2010) FRET çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatürde donör-akseptör çiftleri ile gerçekleştirilen birçok çalışmada, örneğin; perilen ve riboflavin (Bhattar et al. 2008), sülfatiazol ve tripsin (Gökoğlu and Yılmaz, 2014), benzidin ve tripsin (Zhang et al. 2010), kaemprefol ve HSA (Matei and Hillebrand, 2010) arasındaki moleküler etkileşim mesafeleri FRET yöntemi ile hesaplanmıştır ve ışımaz enerji aktarımları açıklanmıştır.

### 2.3. Proteinler ve özellikleri

Proteinler, yirmi çeşit  $\alpha$ -amino asit biriminden oluşmuş, büyük molekül ağırlığına sahip polimerlerdir ve temel katalitik özelliklerinin yanı sıra yapısal destek, taşınma, depolama, sinyal iletimi, savunma gibi canlılarda gerçekleşen birçok işte görev alırlar. Dikkat çeken özellikler arasında, hücrelerin yirmi amino asiti birçok farklı kombinasyon ve dizide birleştirerek, farklı özelliklere ve aktivitelere sahip proteinler üretebilmesidir. Bu yapı taşlarından; farklı organizmalar, enzimler, hormonlar, antikolar, taşıyıcılar, kas lifleri, süt proteinleri, antibiyotikler, mantar zehirleri ve sayısız diğer biyolojik aktivitelere sahip ürünler elde edilir. Bunlar arasında yer alan enzimler, tüm hücrel reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler.

Bir amino asit molekülü, aynı karbon atomuna ( $\alpha$ -karbon) bağlı; bir karboksil asit, amino grubu ve bir R grubundan oluşur. R grupları; yapısal, boyutsal, elektrik yükleri ve sudaki çözünürlükleri ile farklılık gösterirler. Dolayısıyla amino asitler de içerdikleri bu gruplar nedeniyle birbirinden farklı özelliklere sahip alifatik, aromatik, asidik, bazik, amit ve kükürt içeren amino asitler olmak üzere gruplara ayrılırlar. İki amino grup asit molekülü bir su molekülü kaybederek birbirine bağlanabilir ve oluşan bağa peptit bağı denir. Proteinlerin üç boyutlu yapısının ve biyolojik özelliklerinin birçoğunu içerdikleri amino asit birimlerinin niteliği ve dizilişleri belirlemektedir. Her protein genler tarafından



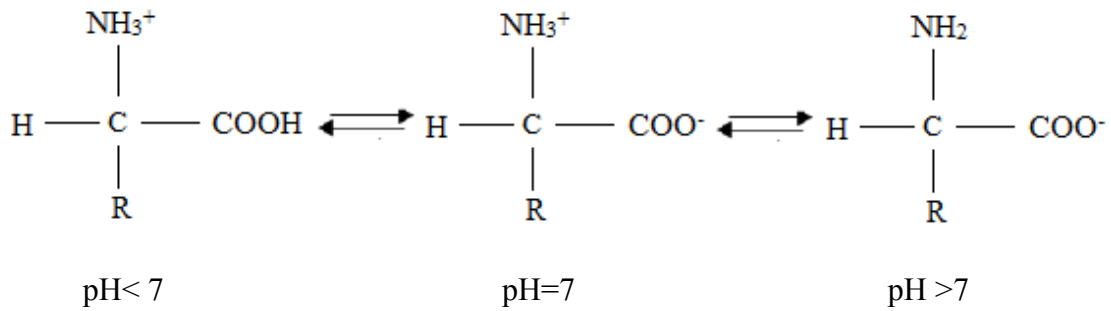
belirlenen kendine özgü bir amino asit sırası içerir. Tek bir polipeptit zinciri olan proteinler genellikle aşağıda verilen yapısal şekillerde bulunurlar:

- *Primer (birincil) yapı:* Belli türde, sayıda ve diziliş sırasında amino asitlerin peptit bağları ile bağlanarak polipeptit zinciri oluşturmaya, o proteinin primer yapısı denir. Primer yapı her protein molekülünün omurgasını oluşturur ve o proteine özgüdür. Amino asit dizilişindeki herhangi bir bozukluk genetik hastalığa yol açabilir. Bu nedenle primer yapının bilinmesi çok önemlidir. Normal ve mutasyona uğramış proteinlerin primer yapısı araştırılarak hastalığın tanısı konulabilir ve tedavisi yapılabilir.
- *Sekonder (ikincil) yapı:* Birçok proteinin polipeptit zinciri, proteinin genel konformasyonunu etkileyen ve tekrarlanan kıvrım ya da katlanmalara sahip bölümler içerir. İkincil yapı olarak adlandırılan bu bölümler polipeptit omurgası boyunca düzenli aralıklarla kurulan hidrojen bağlarıyla oluşurlar. İkincil yapılardan birisi olan  *$\alpha$ -heliks* domain her dört amino asitte bir yer alan hidrojen bağları ile şeklini koruyan bir kıvrımdır. İkincil yapının diğer tipi  *$\beta$ -tabakadır*. Bu yapı içindeki polipeptit zincirinin iki ya da daha fazla bölgesi birbirlerine paraleldir. Omurganın paralel bölgeleri arasındaki hidrojen bağları, bu yapıyı bir arada tutarlar.
- *Tersiyer (üçüncül) yapı:* Peptit zincirinin uzayda kendi üzerine daha ileri derecede katlanıp bükülerek sıkışık bir biçim almasını ve böylelikle yoğunlaşmasını sağlar. Bu yapıyı oluşturan etkileşim tiplerinden olan hidrofobik etkileşimde polar olmayan amino asitler genellikle sudan uzaklaşacak şekilde, proteinin iç kısmında kümelenirler.
- *Kuarterner (dördüncül) yapı:* Birden fazla polipeptit zincirinden oluşan protein yapısıdır. Bir proteinin iki veya daha fazla polipeptit alt birimi olup, uzayda düzenlenmeleri benzer veya farklı olabilmektedir. Kuaterner yapı, bu şekildeki protein alt gruplarının, üç boyutlu kompleksler şeklinde ifade edilmesidir.

Proteinlerin karmaşık yapıları göz önüne alındığında iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. *Fibröz (lifli) proteinler*, uzun iplikler veya tabakalar halinde düzenlenmiş polipeptit zincirlere sahiptirler. *Globüler (küresel) proteinler* ise, küresel veya dairesel bir şekilde katlanmış polipeptit zincirlere sahiptirler. Böylece, bu iki grup yapısal olarak birbirinden farklılık gösterirler. Fibröz proteinler genellikle büyük ölçüde tek tip ikincil yapıdan

oluşur; globüler proteinler genellikle birkaç tür ikincil yapı içerir. Omurgalılara destek, şekil, keratin doku ve dış koruma sağlayan yapılar fibröz proteinlerden oluşurken, enzimlerin ve düzenleyici proteinlerin çoğu globüler proteinlerden oluşmaktadır. Böylelikle bu iki grup protein, işlevsellik olarak da birbirinden farklılık göstermektedir (Nelson and Cox, 2004). Globüler proteinler başlıca biyokimyasal reaksiyonları katalize etme, enzim katalizi, ligand bağlama ve taşıma gibi işlevsel niteliklerinden dolayı gıda, farmasötik ve sağlık bakım ürünlerinde kullanılır. Globüler bir proteinde, amino asit zinciri, polar gruplar proteinin yüzeyinde uzanacak şekilde bükülebilir. Bu, proteinin suyla etkileşime girmesine izin verir ve proteinin sudaki çözünürlüğünü artırır. Lifli proteinlerde bu durum meydana gelmediğinden dolayı suda çözünmezler (McClements, 2002).

Basit amino asitler, hem zayıf asidik hem de zayıf bazik fonksiyonel grup içeren önemli amfiprotik bileşik sınıfını oluştururlar. Amfiprotik madde, uygun bir çözücüde çözüldüğünde hem bir zayıf asit gibi hem de zayıf bir baz gibi davranır. Hem pozitif yük hem negatif yük taşıyan amino asit türlerine *dipolar iyon (zwitterion)* adı verilir. Şekil 2.4 de ortamın pH'sına bağlı olarak amino asitin iyonik yapıları gösterilmiştir. Tek yüklü anyonik ve katyonik türler, zıt yüklü elektrotlara doğru çekildiği halde, bir amino asitin bir pozitif ve bir negatif yük içeren dipolar iyonu, elektrik alanda göç etme meyili göstermez.



**Şekil 2.4.** Ortamın pH'sına bağlı olarak, bir amino asitin yapısal gösterimleri.

Çözücünün pH'sı, anyon ve katyon derişimlerinin eşit olmasını sağlayacak bir değerde ise, amino asit bir elektriksel alanda göç etmez. Net bir göçün olmadığı bu pH değerine, proteinin *izoelektrik noktası (pI)* denir. İzoelektrik nokta, proteinlerin tanınması için

önemli bir fiziksel sabittir (Skoog et al. 2004). Proteinler, izoelektrik noktalarının altında proton alarak pozitif, üstünde ise proton kaybederek negatif yüke sahip olurlar.

### **2.3.1. Protein-ligand etkileşimlerinde florimetrik çalışmalar**

Proteinin üç boyutlu yapısı ve fonksiyonları arasındaki ilişki, hesaplamalı yöntemlerle ilaç keşfi alanında önemli bir yer tutar. X-ışını kristalografisi ve elektron mikroskobu gibi kusursuz görünen uygulamalar, proteinin yapı-işlev ilişkisinin dinamiklerini açıklamakta yetersiz kalabilmektedir. Floresans spektroskopisi gibi teknikler, doğal proteinin üç boyutlu konformasyonlarını incelerken aynı zamanda proteinin yapısına daha az zarar vererek çalışmaları gerçekleştirebilirler.

Protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin biyofiziksel çalışmalarında, floroforlar (floresan özellik gösteren maddeler) yapısal çalışmalar için fiziksel bir belirteç görevi görmesinin yanı sıra bağlı olduğu protein ve çevresi hakkında bilgi verirler (Toseland, 2013). Floroforlar, radyoaktif probalar ve boyalar gibi sentetik veya protein zincirindeki aromatik amino asitler gibi doğal uç olabilirler. Bir proteinin florimetrik yöntemle çalışılabilmesi için, öncelikle proteinin floresans özellikte doğal floroforlar olan aromatik amino asit uçlara sahip olması gerekmektedir. Bu uçlar floresans kuantum verimlerine göre sıralanırsa; triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalanin (Phe)'dir. Proteinin biyofiziksel çalışmalarında Phe amino asiti, Trp ve Tyr ile kıyaslandığında daha az floresans yapan bir uç olduğu görülmektedir. Bu durumda, floresan yoğunluğundaki değişiklikler, protein içindeki Trp ve Tyr uçlardan kaynaklanmaktadır. Trp ve Tyr uçlar, 280 nm'ye eş değer dalga boyu ile uyarılabilir. Ayrıca Trp, 295 nm'ye eş değer dalga boyu ile de uyarılabilir (Misra, 2019).

Protein-ligand etkileşimlerinde bağlanma özelliklerinin incelenmesinde; floresans spektroskopisi, UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, üç boyutlu (3D) floresans spektroskopisi, moleküler kenetlenme, sirkular dikroizm (CD), FRET ve FTIR gibi yöntemler kullanılmaktadır (Li and Li, 2016; Zhang et al. 2009). Floresans spektroskopisi, protein-ligand arasındaki ilişkiyi karakterize etmek için yaygın olarak kullanılır. Avantajları arasında; kolaylık, çevresel değişikliklere karşı yüksek duyarlılık ve protein-ligand arasındaki etkileşimleri hem nitel hem nicel olarak tanımlamasıdır. Floresans spektroskopisi aslında, florofor ortamındaki değişiklikleri algılayan prob tabanlı bir tekniktir. Protein ve ligand gibi yapıların bağlanma çalışmalarında kullanılan

floresans spektroskopisi yöntemleri yapılar arasındaki bağlanma mekanizması, bağlanma yerlerinin sayısı, termodinamik parametreler ve etkileşimleri hakkında bilgi sağlamaktadır (Bhattacharyya et al. 2010). Elde edilen parametreler, protein-ligand arasındaki bağlanma türü, canlı hücrede metabolik ve taşıma hareketleri hakkında da bilgiler vermektedir (Li and Yang, 2015).

### 2.3.2. Proteaz enzimleri ve pepsin

Proteaz enzimleri, proteinlerdeki peptid bağlarının ayrılmasını katalize ederler. Analitik tekniklerdeki gelişmeler, proteazların; protein katabolizmasında, kanın pıhtılaşmasında, hücre büyümesi ve göçünde, protein aktivasyonunda, hücre düzenlenmesi ve sinyalinde, doku gelişiminde, fibrin pıhtılarının parçalanmasında, salgı proteinlerinin zarlar boyunca taşınmasında, enflamasyon, tümör büyümesi, metastaz ve patogenez gibi birçok biyolojik proseslerde önemli rol oynar (Pinto and Schanze, 2004). Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, kanser ve AIDS gibi ölümcül hastalıklara karşı terapötik/farmasötik ajanlar geliştirmek için potansiyel hedef haline gelmişlerdir.

İnsan genomunda, farmasötik hedeflerin bir diğer önemli sınıfı olan kinazların sayısına (> 500) rakip olan tahmini 561 proteaz vardır. Proteazlar, kanser ve felç gibi birçok hastalıkta kilit katılımcı olmanın yanı sıra, elliden fazla genetik bozukluğa doğrudan etki etmektedir. Ek olarak bakteriler, virüsler ve parazitler dahil olmak üzere birçok bulaşıcı mikroorganizma, patojenlik faktörleri olarak proteazları kullanırlar. Kanser, felç ve enfeksiyon gibi hastalıkların yanı sıra birçok normal biyolojik süreçte yoğun bir şekilde rol oynarlar. Aslında proteolitik aktivite bazen bazı kanser türleri için bir belirteç olarak kullanılır (Medintz, 2006).

**Pepsin;** sindirim proteazlarından biri olup, hidrofobik ve tercihen aromatik amino asitler arasındaki peptid bağlarını parçalayarak gıda proteinlerini peptidlere indirgemek için midedeki ana hücreler tarafından salgınır. N-terminali (1-172 amino asit uçları) ve C-terminali (173-326 amino asit uçları) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Toplamda 326 amino asitten oluşan ve moleküler ağırlığı 35.000 Da olan asidik bir enzimdir (Spelzini et al. 2008). Pepsinin aktif bağlanma bölgesi, beşinci domain ile iki aspartat amino asit uçları (Asp32 ve Asp215) arasındadır (Fang et al. 2015). Şekil 2.5 de pepsinin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Açık gri renkler  $\beta$  tabakaları, açık gri renkler  $\alpha$ -heliks yapısını, sarı

kısımlar pepsin enziminin aktif bölgesi olan Asp32 ve Asp215'i ifade etmektedir (Raufman, 2004).



**Şekil 2.5.** Pepsinin üç boyutlu yapısı.

Yiyeceklerin sindiriminde önemli bir rol oynadığı için, genellikle küçük moleküller ve proteinler arasındaki etkileşimleri araştırmak için sindirim proteazlarının önemli bir modeli olarak kullanılır. Pepsin, çoklu triptofan içeren bir protein olup yapısında floresans özellik gösteren beş triptofan (Trp39, Trp141, Trp181, Trp190 ve Trp300), on üç tirozin ve on üç fenilalanin aromatik amino asit uç içerir. Bu Trp uçlar, proteinin doğal olarak floresans yapması açısından, pepsin-ligand etkileşiminin ve bu etkileşim sonrasında meydana gelen konformasyonel değişikliklerin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir (Wang et al. 2019; Yue et al. 2020).

Literatürde pepsin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, ev ve kişisel bakım ürünlerinde antibakteriyel ajan görevi gören triklosan (TCS) ve triklokarbon (TCC) etken maddelerinin pepsin ile olan floresans sönüm tekniği ile etkileşim sonuçları, vücuttaki toksisite mekanizmasına ilişkin bilgiler vermiştir (Yue et al. 2019). Diğer birçok çalışmada pepsin ile etkileşimin incelendiği ligandlara örnekler verilirse; organ naklinde, organın reddine engel olan bağışıklık baskılayıcı bir ilaç olan mikofenolat mofetil (MMF) (Ma et al. 2016), tip-2 diyabetin tedavisinde kullanılan metformin ilacı (Pathak et al. 2018), uykusuzluk ve baş ağrısı tedavisinde kullanılan bir Çin bitkisi olan helisid (Meti et al. 2018), iltihaplı hastalıkların ve tümör hücrelerinin tedavisinde kullanılan zerdeçal (Ying et al. 2015), kan dolaşımının düzenli işlevini sağlamak ve sinirsel bozuklukların

(migren, baş ağrısı, felç, demans gibi) tedavisinde kullanılan bir bitkisel ilaç olan gastrodin (Wang et al. 2017), antioksidan, antikanser gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olan daidzein ve genistein (Nan et al. 2016) gibi bileşiklerin pepsin ile olan etkileşimleri ve karşılaştırmalı sonuçlar başlıca floresans teknikleri ile incelenmiştir ve diğer yöntemlerle de desteklenmiştir.

### 2.3.3. Serum albüminler ve HSA

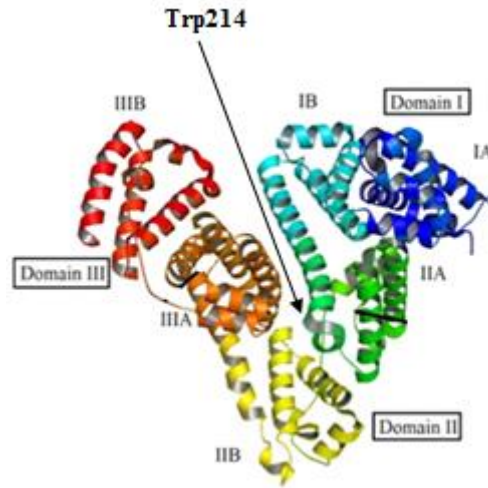
İnsan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan globüler yapıya sahip serum albüminleri kanda bulunan proteinlerin büyük bir kısmını (%52-60 civarında) oluşturur. Albümin yumurtanın beyazında bulunur ve karaciğerde sentezlendiği gibi, proteaz grupları veya diğer katkı maddeleri olmadan sadece amino asitlerden oluşan basit bir proteindir. Üç domain birbirine 17 disülfid bağı ile sıkıca katlanmış olarak 585 amino asitten oluşmaktadır (Peters, 1995). Serum albüminleri; yağ asitleri, bilirubin, safra tuzları ve benzeri türler için fizyolojik taşıyıcı olarak görev yaparlar. En önemli özellikleri arasında çeşitli içsel (endojen) ve dışsal (ekzojen) ligandları *tersinir* olarak kendilerine bağlayabilmeleridir. Ayrıca metaller, hormonlar ve ilaçların etken maddeleri ile bağ yapabilirler. Bu nedenle serum albüminler ile küçük moleküllerin bağlanma çalışmaları protein yapısı ve dinamiği, bağlanma mekanizmalarının aydınlatılması açısından ilgi çekicidir.

Serum albüminler, globüler proteinler olup ikiye ayrılır; HSA (human serum albümin) ve BSA (bovin serum albümin)'dir. HSA ve BSA, omurgalılarda hormonların, iyonların, yağ asitlerinin ve ilaç taşınmasında/depolanmasında önemli rol oynayan proteinlerdir. Bu işlevleri gerçekleştirirken, plazma konsantrasyonunun düzenlenmesine de önemli etkisi olur. Kan plazmasında birkaç farklı taşıma proteini mevcuttur fakat albümin yüksek afinite ile tersinir olarak bağlanabilen *tek* proteindir (Silva et al. 2004). Tüm proteinler içerisinde en çok çalışılan protein grubudur ve uygulamaları klinik ve temel araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. En saf proteinlerden biri olan albümin, klinikçiler, beslenme uzmanları, fiziksel kimyacılar, biyokimyacılar, immünologlar, genetikçiler ve moleküler biyologların araştırma konuları arasında yer almaktadır.

Serum albüminlerin uyarılma dalga boyları 280 nm civarında gerçekleşmekte olup, Trp ve Tyr uçlardan kaynaklıdır. Maksimum floresans şiddetleri sırası ile 340 nm ve 300

nm'dir. Serum albüminlerle bağ kurabilen küçük bir molekül bu Trp uçlara konumlanmıştır ya da çok yakınında yer almalıdır. Bu şekilde triptofan uçların floresansını sönmüleyebilir. Albümin proteininin sönmü çalışmaları ve diğer maddeler ile olan etkileşimlerinin incelenmesi konusunda floresans önemli bir yöntemdir (Bi et al. 2005).

**HSA (insan serum albümin);** üç homolog  $\alpha$ -heliks domainden (I, II, III) oluşur ve bu domainler de iki alt kısım (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) içerir (Dockal et al. 2000; Tang et al. 2006). İki temel ilaç bağlanma bölgesi vardır; domain I ve domain II (Şekil 2.6) Domain I, IIA alt kısmının hidrofobik boşluğunda bulunan, güçlü hidrofobik etkileşimler ile çoğunlukla nötr, hacimli heterosiklik bileşikler bağlayabilen alandır. Domain II ise, IIIA alt kısmında bulunan, dipol-dipol, van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları ile birçok aromatik karboksilik asitleri bağlayabilen alandır (Carter and He, 1990; Jana et al. 2012). HSA'nın floresansı tek triptofan uçtan (*Trp214*) kaynaklanmaktadır.



**Şekil 2.6.** HSA'nın üç boyutlu yapısı.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, HSA'nın birçok ligand ile bağlanma özellikleri ve mekanizmaları çalışılmıştır. Örneğin bağışıklık, iltihaplanma ve kanser tedavilerinde kullanılan flavonoid (Dufour and Dangles, 2005), ilaç taşıyıcı ve biyomedikal görüntüleme uygulamalarında kullanılan kuantum taneciklerinden CdTe (Lai et al. 2012), özellikle Afrika kıtasında karşılaşılan malaryaya (sıtmaya sebep olan parazit) karşı antimalaryal özellik gösteren amodiakin (Samari et al. 2012), akciğer kanser tedavisinde

kullanılan gefitinib (GEF) (Kabir et al. 2016), antialerjik, antiviral ve antienflamatuar gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan glisiretinik asit (Tang et al. 2006), antimikrobiyal ajan olarak kullanılan Co(III) schiff bazı kompleksi (Fard et al. 2012), kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve hormon düzenleyici olarak kullanılan ikariin (Zhang et al. 2008) gibi bileşiklerin HSA ile olan etkileşimleri başlıca floresans teknikleri ile incelenmiştir ve sonuçlar diğer yöntemlerle de desteklenmiştir.

#### **2.4. Kumarin bileşikleri ve Schiff bazlarının özellikleri**

**Kumarinler:** Oksijenli heterosiklik bileşiklerin bir grubunu oluşturan lakton yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.7, a). Kumarin ve kumarin türevleri, geniş biyolojik aktiviteye sahip önemli bir bileşik sınıfını oluştururlar. Bu bileşiklerin çoğunun antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar, antikoagülan ve antitümör ajanları olarak aktif oldukları kanıtlanmıştır. Bu tür bileşikler, ilaç sentez ve tasarımında moleküler iskelet yapıyı sağlayan önemli moleküllerdir (Al-Majedy et al. 2016).

Kumarinler önemli ticari malzemeler olup kimyasal, termal ve fotokimyasal kararlılıklarının yanı sıra floresan kuantum verimleri yüksektir. Bu özellikleri ile kumarin türevleri, gıda ve kozmetik endüstrisinde, boya, lazer teknolojisinde oldukça sık kullanılırlar (Li et al. 2014). Çeşitli doğal bitkiler ile çilek, kiraz, ahududu gibi meyvelerde, doğal kaynaklarda, özellikle yeşil bitkilerde bin üç yüzün üzerinde kumarin türü tespit edilmiştir. Ayrıca parfümlerde, boya ve sprej katkı maddelerinde ve gıda aromasında sabitleyici olarak kullanılır. İnsanlarda yapılan birçok çalışmada, kumarin, organizma tarafından dağıtılan *gastrointestinal* sistemde (oral alım) yani tüm sindirim sisteminde hızla emilmektedir (Marcolan et al. 2011).

Kumarin ve türevleri ile ilgili çalışmalar literatürde geniş yer almaktadır. Antikanser etkili beş farklı kumarin türevi schiff bazları ile HSA arasındaki etkileşim özellikleri floresans sönüm ve moleküler kenetlenme çalışmaları ile incelenerek sonuçlar birbiri ile karşılaştırılmıştır (Dömötör et al. 2014). Başka bir çalışmada  $Ca^{2+}$  iyonu için floresans kemosensör kumarin bazlı schiff bazı ile rodamin bileşiği arasındaki etkileşim (An et al. 2013); diğer bir çalışmada ise bakır(II) iyonu için kemosensör kumarin bileşiği arasındaki etkileşim incelenmiştir (Warrier and Kharkar, 2018). Floresans çalışmalarında metal

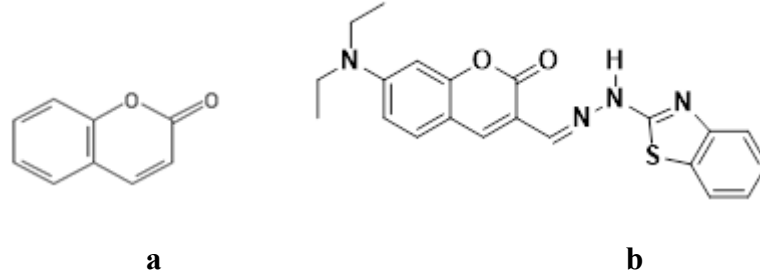


kompleksleri genel olarak bir iyon için sensör görevi gören bileşik olarak sentezlenmiş olup çalışmalarda etkin bir şekilde kullanılmıştır.

**Schiff bazları:** Herhangi bir birincil amin belirli koşullar altında bir aldehit veya bir keton ile reaksiyona girdiğinde oluşur.  $-CH=N-$  olarak elde edilen yapı, imin veya azometin olarak bilinir. Schiff bazları antifungal, antibakteriyel, antikanser, antioksidan, antimalaryal, antiviral ve ateş düşürücü gibi farmakolojik özellikler gösterdiğinden dolayı biyolojideki uygulama alanlarında oldukça geniş bir alana sahiptir. Bu tür bileşiklerde, biyolojik aktivitelerden sorumlu imin grubudur. Schiff bazı ligandları kolaylıkla sentezlenir ve genellikle birçok metal iyonuyla kompleks oluştururlar ve bu kompleksler de genellikle sensör görevi görürler. Schiff bazları, imin grubunun geçiş metali iyonlarına olan kuvvetli afinitesi nedeniyle geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturma kabiliyetleri ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çok önemli organik bileşik sınıfı olarak kabul edilirler (Abu-Dief and Mohamed, 2015). Boya ve pigment gibi gıda endüstrisinde başlangıç malzemeleri olarak kullanılırlar. Son zamanlarda, kumarin gibi floresans özellik gösteren farklı schiff baz türevlerinin tasarlanması ve sentezlenmesi, sentetik kimyacılar için çeşitli metal iyonlarının optik algılama amacı için çekici bir alan haline gelmiştir (Ghosh et al. 2018). Ayrıca polimerik malzemeler, sensörler, fotovoltajik malzemeler, enerji malzemeleri, nükleer tıp ve farmasötik alandaki uygulamalarda da yerini almıştır. Memelilerde ve diğer solunum sistemlerinde fotosentez ve oksijenin taşınması gibi önemli biyolojik aktiviteleriyle de bilinmektedir (Liu and Hamon, 2019).

Schiff bazlarının çeşitli farmakolojik özellikleri sebebi ile DNA ve proteinler arasındaki etkileşimler literatürdeki birçok araştırmada floresans sönüm çalışmaları ile açıklanmıştır. Çalışmalar incelendiğinde, bir schiff bazının Zn metal kompleksi ile BSA arasındaki etkileşimleri (Xiang and Wu, 2010), suda çözünebilir polimerik özelliğe sahip Ni-schiff bazı kompleksi ile DNA arasındaki etkileşim çalışmaları (Xiao and Zhan, 2002), bakır(II)-schiff bazı kompleksi ile ct-DNA arasındaki etkileşim çalışmaları (Sabolova et al. 2011), Co(III)-schiff bazı kompleksi ile ct-DNA arasındaki biyomoleküler etkileşimleri (Subramanian et al. 2019) floresans spektroskopik yöntemler ile desteklenmiştir.

Tez çalışması kapsamında kumarin-hidrazon temelli bir schiff bazı sentezlenmiştir ve Bölüm 3.1 de sentez şeması ile spektral özellikleri detaylı olarak verilmiştir. Tez içinde HZC (Şekil 2.7, b) kısaltması ile verilen türev ile pepsin ve HSA proteinlerinin etkileşimi, bağlanma özellikleri floresans yöntemler ile incelenmiş olup hesaplamalı moleküler kenetlenme sonuçları ile desteklenmiştir.



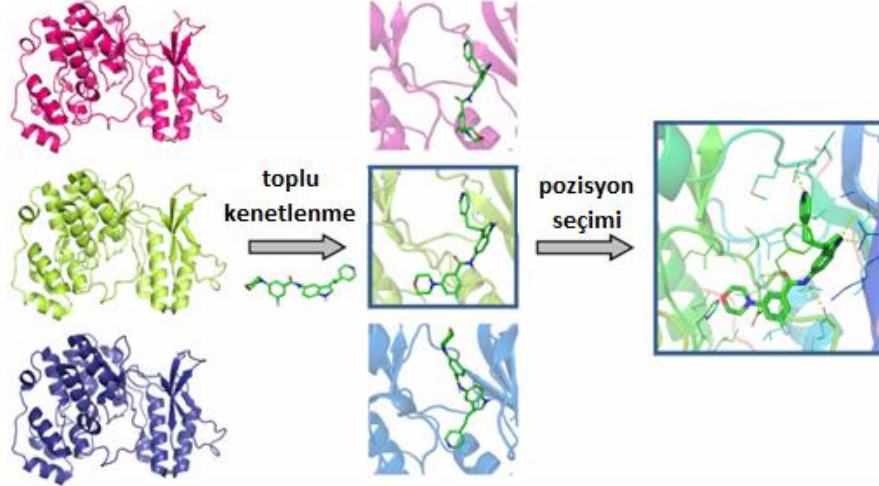
Şekil 2.7. a) Kumarin ve b) HZC türevinin molekül yapıları.

## 2.5. Moleküler kenetlenme analizi

Moleküler kenetlenme, hedef molekül olarak seçilen bir reseptörün genellikle bir protein veya bir nükleik asit molekülü (DNA/RNA) ile ligandın küçük bir molekül olduğu hedef-ligand kompleksinin konformasyonunu tahmin etmek amacı ile kullanılan bilgisayar simülasyon programıdır. Ayrıca, bir ligandın öngörülen veya önceden tanımlanmış bir bağlanma bölgesinde tahmin edildiği bir simülasyon işlemi olarak da tanımlanabilir. Son birkaç yılda, biyolojik aktivite, yapı ve inhibisyon ile ilgili veriler önemli ölçüde artmıştır. Protein Veri Bankası (PDB) ve Dünya Çapında Protein Veri Bankası (wwPDB) gibi yapı veritabanları elli binden fazla protein yapısına sahiptir ve bu yapıların çoğu potansiyel ilaç hedefleri olarak kabul edilebilir (Dias and Azevedo, 2008).

IR-spektroskopisi, X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi spektroskopik yöntemler, herhangi bir organik molekül veya biyomoleküler hedefin üç boyutlu yapılarının araştırılması ve oluşturulmasına yönelik tekniklerdir. Moleküler kenetlenme ise, ligand ve hedef molekülün bağlanma özelliklerine bağlı olarak, bir kompleksin üç boyutlu yapısını önermektedir (Dar and Mir, 2017). Ligandın DNA/protein gibi hedef molekülün tercih edilen bağlanma bölgesine, temelde kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kararlı kompleksler oluşturmasını içeren çalışmalardır (Şekil 2.8) (Guedes et al. 2014). İlaç-protein etkileşimlerinde, ilacın protein üzerinde tercih edilen bağlanma bölgesini tahmin etmek ve elde edilen verilere göre yeni ilaç

dizaynında kullanılmak üzere moleküler kenetlenme analizi gerçekleştirilmektedir (Tayyab et al. 2016). Moleküler kenetlenme sonuçlarının, deneysel sonuçlarla uyumluluğu kontrol edilerek etkileşimler hakkında daha net bilgiler elde edilmektedir.



**Şekil 2.8.** Moleküler kenetlenme örneği.

Literatürde bazı moleküler kenetlenme çalışmaları incelendiğinde, örneğin insülin direncini azaltıcı etkiye sahip pioglitazon ilacı ile HSA etkileşimi arasında hidrojen bağlarının baskın olduğunu ve ilgili amino asit uçlardan gerçekleştiği konusunda net bilgiler elde edilmiştir (Faridbod et al. 2011). Diğer bir çalışmada antikanserojen ve antibakteriyel özelliklere sahip olan polifenol türevleri ile BSA'nın etkileşimi sırasındaki amino asit uçlar ile olan etkileşim türleri belirlenmiş olup birbiri ile karşılaştırılmıştır. Moleküler kenetlenme çalışmaları floresans çalışmaları ile paralel olarak yürütülmüş ve birbirini destekleyici çalışmalar olduğu gösterilmiştir (Skr et al. 2012). Moleküler kenetlenme ile elde edilen sonuçlar ilaç-protein etkileşimlerinin incelenmesinde ve yeni ilaç tasarımı ve dizaynında oldukça etkilidir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

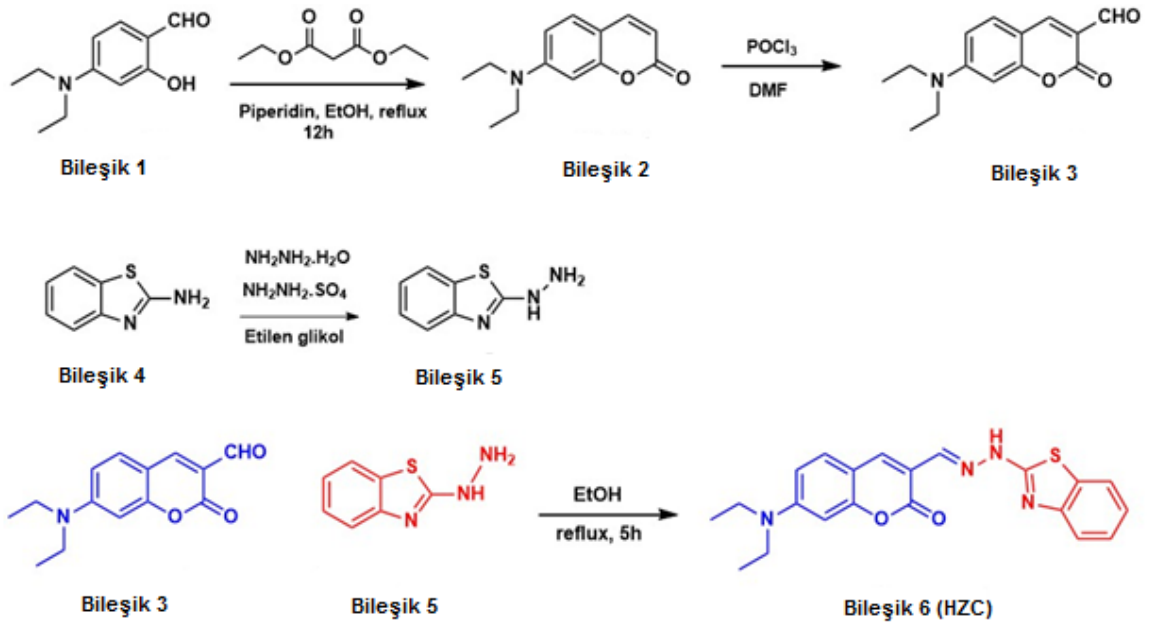
#### 3.1. HZC bileşiğinin sentezi ve karakterizasyonu:

Şekil 3.1'e göre 7-(dietilamino)-2*H*-kromen-2-on bileşiği (**Bileşik 2**), 0.02 mol dietil malonat ile 0.01 mol 4-(dietilamino)salisilaldehit (**Bileşik 1**) 30 mL etanolde çözülmüştür. Daha sonra bu karışıma 2.15 mL piperidin eklenerek geri soğutucu altında ısıtılarak 12 saat karıştırılmıştır. Çöken sarı renkli katı süzülerek sıcak metanolle yıkanmıştır. 7-dietilaminokumarin-3-aldehit (**Bileşik 3**) ise susuz DMF ve POCl<sub>3</sub> içeren çözeltiden azot gazı geçirilerek literatürde verildiği gibi sentezlenmiştir (Li et al. 2014).

2-Hidrazinobenzotiyazol (**Bileşik 5**), 0.03 mol (4.5 g) 2-aminobenzotiyazol (**Bileşik 4**), 0.6 mol (2.92 mL) hidrazin monohidrat, 0.03 mol (3.9 g) hidrazinyum sülfat ve 20 mL etilen glikol üç boyunlu bir balonda karıştırılmıştır. Balon bir geri soğutucu düzeneğine bağlanarak, sistemden sürekli olarak azot gazı geçirilmiştir. Tepkime karışımı gliserin banyosunda 110 °C sıcaklıkta iki saat boyunca azot atmosferinde karıştırılarak ısıtılmıştır. Bu süre sonunda tepkime karışımı soğutulmuştur. Çöken katı ürün üzerine saf su ile yıkama işlemi uygulanarak katı ürün süzümüştür ve etanolden kristallendirilmiştir. Verim %95, erime noktası 195-197 °C (literatürdeki e.n: 198-199°C) (Barnett, 1976). Kumarin-hidrazon temelli schiff bazı olan HZC (**Bileşik 6**), **Bileşik 3** ve **Bileşik 5** kullanılarak literatürde verildiği gibi sentezlenmiştir (Feng et al. 2019).

Yukarıda belirtilen sentez tepkimeleri manyetik karıştırma ile etüvde kurutulmuş cam malzemelerde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ilerlemesi, Merck silika jel (60 F254) plakaları (0.25 mm) kullanılarak ince tabaka kromatografisi (TLC) ile izlenerek UV ışık altında görüntülenmiştir. Erime noktası tayini için Elektrotermal IA9200 cihazı kullanılmıştır. FT-IR spektrumları Thermo Scientific, Nicolet iS5 ile ATR aparatı kullanılarak kaydedilmiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrumu iç standart olarak TMS ile DMSO-d<sub>6</sub> çözücüsü içinde bir Bruker Avance 300 Ultra-Shield cihazında ve <sup>13</sup>C NMR spektrumu Bruker 400MHzAV ile kaydedilmiştir. Kimyasal kaymalar δ, ppm olarak ve kenetleme sabitleri (J) hertz (Hz) cinsinden verilmiştir. Elektron iyonizasyon (EI) kütle spektrometrisi (Waters-LCT-Premier-XE-LTOF (TOF-MS)) kullanılarak yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları (HRMS), m/z (rel.%) olarak kaydedilmiştir. Ultraviyole-görünür (UV-vis) absorpsiyon spektrumları, Shimadzu UV-1700 PharmaSpec

spektrofotometresinde kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. HZC (Bileşik 6)'nin sentezlenme şeması.

**HZC** (3-((2-(benzo[d]thiazol-2-il)hidrazon)metil)-7-(diethylamino)-2H-kromen-2-on) spektral karakterizasyonları: (Kaydedilen spektrumlar EK 1 de verilmiştir.)

**FT-IR** (cm<sup>-1</sup>): 3420 (N-H), 3055 (aromatik C-H), 2969 (alifatik C-H), 1724 (C=O), 1680, 1529 (aromatik C=C), 1000-1260 (alifatik C-N), 700-950 (aromatik C-H ve C-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.30 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 0H), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.48 (q, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 167.2, 162.8, 161.1, 156.7, 151.6, 137.9, 131.1, 126.5, 122.1, 110.2, 108.6, 96.9, 44.7, 12.8.

**HRMS** (ESI, CH<sub>3</sub>CN, *m/z*) (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S) [M+H]<sup>+</sup> calcd for 393.1385; found 393.1392.

**Elemental Analiz (%)**: C, 64.27; H, 5.14; N, 14.28; O, 8.15; S, 8.17.

### 3.2. Kullanılan kimyasallar

Tüm çalışma çözeltileri stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır ve çözeltiler buzdolabında 4°C'de saklanmıştır. Bütün reaktifler analitik saflıkta olup ileri saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Gerekli seyreltme ve yıkama işlemlerinde çift destile su kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalar iki farklı tampon çözelti ortamında gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri olan Tris-HCl tampon çözeltisi, çift destile suda (0.05 M Tris-hidroksimetil amino-metan, 0.05 M HCl ve 0.1 M NaCl) pH 7.4 de hazırlanmıştır. Sitrik asit-sodyum sitrat tampon çözeltisi, 0.1 M sitrik asit çözeltisi ile 100 ml 1 M NaOH çözeltisi karıştırılıp belirli bir hacime seyreltilmiştir ve 0.1 M HCl çözeltisi ile pH 2.0'ye ayarlanmıştır.

$1.05 \times 10^{-5}$  M stok HSA çözeltisi (human serum albumin, MW: 66.500 Da, Sigma Aldrich) pH 7.4 Tris-HCl tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.  $1.2 \times 10^{-4}$  M stok pepsin çözeltisi (MW: 35.000 Da, Sigma Aldrich) pH 2.00 sitrat tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.  $2.17 \times 10^{-3}$  M HZC schiff bazının stok çözeltisi DMSO içinde hazırlanmıştır.

HZC sentez şemasında kullanılan 4-(dietilamino)salisilaldehit (Bileşik 1) ve 2-aminobenzotiyazol (Bileşik 4) bileşikleri Sigma Aldrich'den temin edilmiştir.

### 3.3. Kullanılan cihazlar

Floresans çalışmalar Hitachi F-4500 spektroflorimetre cihazında gerçekleştirilmiştir. FL Solutions 2.0 programı kapsamında, 150 W ksenon lamba ışık kaynaklı cihaz ile bütün çalışmalarda uyarılma ve emisyon slit aralıkları 2.5 nm / 2.5 nm, PMT voltajı 700 V, 1 cm kuartz hücreler kullanılarak yürütülmüştür. Absorpsiyon çalışmaları Shimadzu UV-1700 (PharmaSpec, UVProbe PC software) UV-görünür spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. pH ile ilgili ölçümler Mettler Toledo (FiveEasy Plus) pH metrede kaydedilmiştir.

### 3.4. Florimetrik çalışmalar

Pepsin-HZC etkileşimi üç farklı sıcaklıkta (298, 303 ve 310 K) ve HSA-HZC etkileşimi iki farklı sıcaklıkta (298 ve 310 K) florimetrik titrasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. HZC'nin, pepsin ve HSA floresans emisyonları üzerindeki etkilerini incelemek için  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin ve  $5.0 \times 10^{-6}$  M HSA üzerine mikro enjeksiyon ile 5-70 µL hacim aralığında HZC stok çözeltisinden eklenmiştir. Çözeltiler 280 nm (pepsin için) ve 294 nm (HSA için) dalga boylarında uyarılarak, floresans şiddet ve emisyon spektrumlarındaki

değişiklikler 250-450 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir. Florimetrik çalışmalardan elde edilen floresans sönüm verileri Stern-Volmer eşitliğine göre değerlendirilmiştir. Ayrıca sıcaklık çalışmalarından elde edilen verilerden van't Hoff eşitliği kullanılarak termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Förster'in ışısız enerji transfer teorisine göre de HZC ile pepsin/HSA bileşikleri arasındaki  $J(\lambda)$ ,  $r$ ,  $R_0$  gibi FRET parametreleri hesaplanmıştır.

### **3.5. Absorpsiyon deneyleri**

HZC ile pepsin/HSA etkileşimindeki değişiklikleri incelemek için UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. HZC'nin pepsin/HSA varlığında ve yokluğundaki UV absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Absorpsiyon şiddetindeki değişiklikler ve/veya pik maksimumlarındaki kaymalar incelenmiştir.

### **3.6. Moleküler kenetlenme çalışmaları**

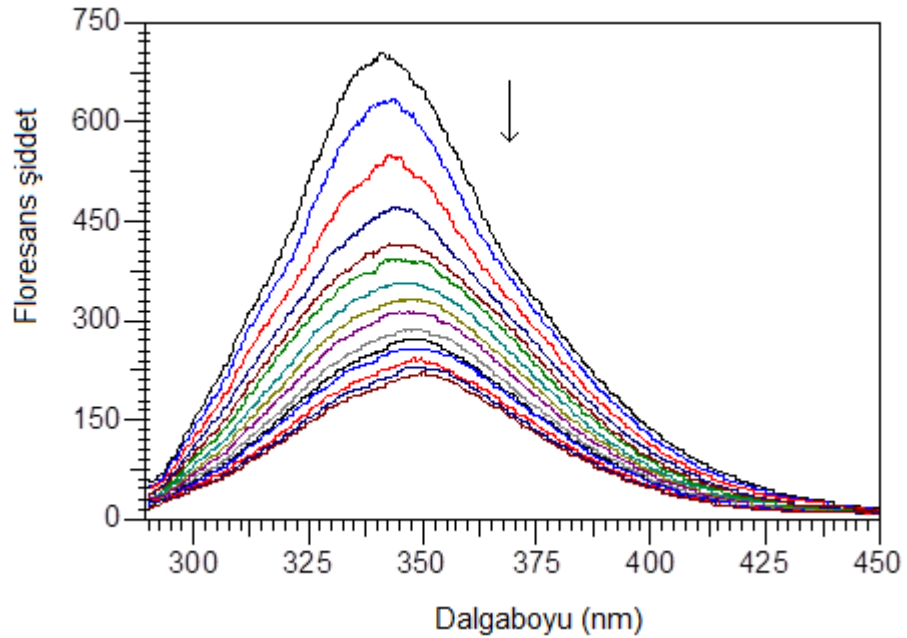
HZC'nin Pepsin ve HSA ile olan olası yönelim ve etkileşimlerini araştırmak için AutoDock 4.2 (Morris and Lim-Wilby, 2008) yazılımı kullanılarak moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. HSA (ID: 1H9Z) ve pepsin (ID: 5PEP) model yapıları protein data bankasından indirilmiştir. Yarı deneysel kuvvet alanında minimize edilmiş ve Lamarckian genetic algoritma temelinde moleküler kenetlenme için protein molekülleri *hedef* olarak hazırlanmıştır. Yapısal ve enerji optimizasyonu için Gaussian 09 yazılımı kullanılarak DFT/B3LYP/6-31 G\* temel setinde HZC *ligand* olarak hazırlanmıştır. Kenetlenme sonuçlarına göre, HZC-Pepsin ve HZC-HSA arasındaki bağ türleri belirlenmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar detaylı olarak aşağıda verilmiştir. Tez içinde HZC kısaltması ile verilen, yapısında kumarin ve hidrazon içeren bir schiff bazı sentezlenmiştir ve spektral özellikleri karakterize edilmiştir. HZC bileşiğinin pH 2.0 tampon ortamında pepsin ile pH 7.4 tampon ortamında HSA ile etkileşimleri absorpsiyon ve floresans spektroskopik yöntemlerle incelenmiştir. Molekül çiftleri arasındaki bağlanma sabitleri, bağlanma türleri gibi özellikler açıklanmıştır ve moleküller arası uzaklıklar hesaplanmıştır. Ayrıca HZC-pepsin/HSA etkileşim sonuçları, bilgisayar programı içeren moleküler kenetlenme yöntemi ile desteklenmiştir.

### 4.1. HZC-pepsin etkileşiminin floresans çalışmaları

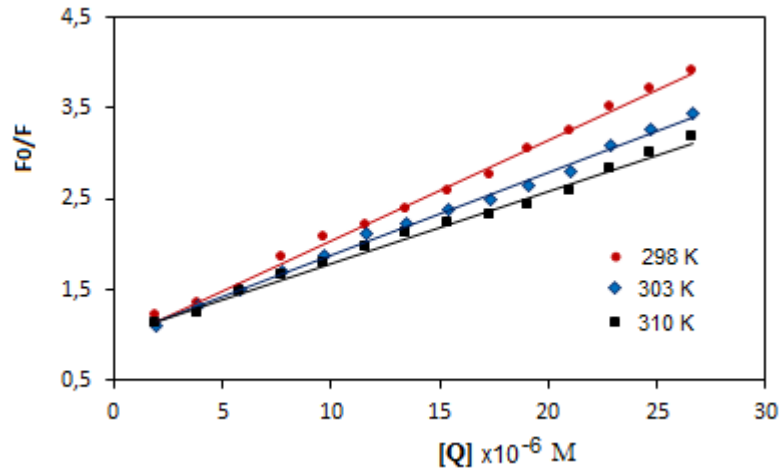
2.5 mL  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin içeren çözeltiliye belirli ve artan derişimlerde mikro enjeksiyon ile HZC çözeltileri eklenerek floresans titrasyon yapılmıştır. Çözeltiler 280 nm'de uyarılarak floresans şiddet ve emisyon spektrumlarındaki değişimler 290-450 nm dalga boyu aralığında farklı sıcaklıklarda (298, 303 ve 310 K) kaydedilmiştir. Şekil 4.1 de 298 K sıcaklıkta kaydedilen pepsinin floresans sönüm spektrumları görülmektedir.



**Şekil 4.1.**  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin üzerine artan derişimlerde HZC eklenmesi ile elde edilen floresans spektrumları. HZC derişimi: 0, 1.95; 3.89; 5.82; 7.75; 9.66; 11.6; 13.5; 15.4; 17.3; 19.1; 21.0; 22.9; 24.7; 26.6 ( $\times 10^{-6}$ ) M.  $\lambda_{uy}=280$  nm, 298 K, pH= 2.0.



Pepsinin triptofan floresans şiddeti, artan HZC derişimi ile birlikte düzenli bir azalma (sönüm) göstermiştir. Sonuçlar üç sıcaklıkta Stern-Volmer grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.2) ve elde edilen sönüm verileri Çizelge 4.1 de listelenmiştir. Pepsinin triptofan uçları etrafındaki mikro çevresindeki değişiklik, aynı zamanda maksimum emisyon dalga boyunun 342 nm'den yaklaşık 8 nm kırmızıya kaydığı görülmüştür. Buna göre, HZC-pepsin arasında etkileşimle birlikte bir kompleks yapı oluştuğu sonucuna varılmıştır (Huang et al. 2010).



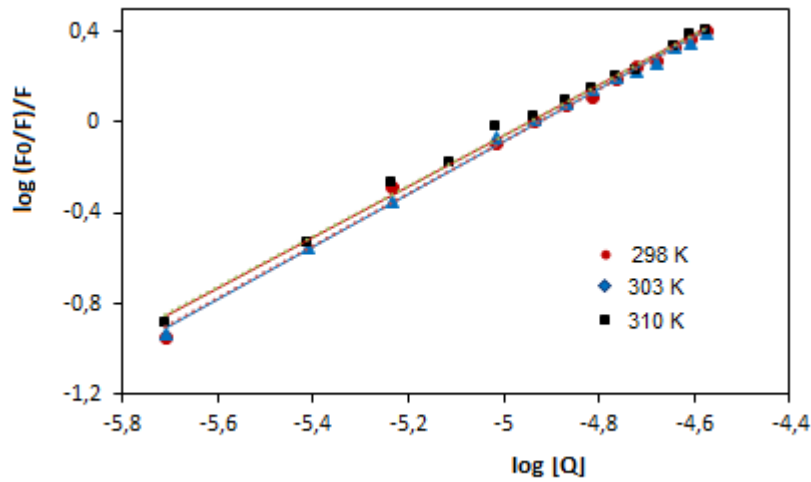
Şekil 4.2.  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin ile HZC etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen Stern-Volmer grafikleri.

Çizelge 4.1. HZC-Pepsin etkileşiminde Stern-Volmer verileri.

	T (K)	Stern Volmer eşitliği	$K_{sv} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{12}$	$R^2$
Pepsin	298	$F_0/F = 0.9323 + 1.108 \times 10^5 [Q]$	11.08	11.08	0.997
	303	$F_0/F = 0.9693 + 9.170 \times 10^4 [Q]$	9.170	9.170	0.996
	310	$F_0/F = 0.9896 + 8.010 \times 10^4 [Q]$	8.010	8.010	0.993

Doğrusal Stern-Volmer grafikleri statik sönüm (söndürücü ve florofor arasında bir kompleks oluşumu) veya dinamik (söndürücü ve florofor arasında bir çarpışma süreci) olmak üzere tek bir söndürme mekanizmasını temsil eder (Huang et al. 2010).

Çizelge 4.1 de elde edilen verilere göre, sıcaklık artışı ile  $K_{sv}$  değerlerinde azalma olduğunu ve  $k_q$ , biyomoleküler sönüm sabitlerinin  $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  değerinden çok daha büyük olduğunu göstermiştir (Li and Li, 2016). Buna göre sönümün dinamik olmadığı, HZC ile pepsinin etkileşiminde *statik sönüm* mekanizmasının etkili olduğu ve etkileşim esnasında HZC-pepsin arasında kompleks yapının oluştuğunu göstermektedir. HZC-pepsinin etkileşiminin, çift logaritma eşitliği (Eşitlik 2) kullanılarak, üç farklı sıcaklıkta pepsin ile gerçekleştirilen floresans titrasyonlarından elde edilen  $\log (F_0-F) / F - \log [Q]$  grafikleri (Şekil 4.3) çizilmiştir. Çizilen grafiklerden K, bağlanma sabiti ve n, bağlanma kısım sayıları Çizelge 4.2 de listelenmiştir.



**Şekil 4.3.**  $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  pepsin ile HZC etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen log-log grafikleri.

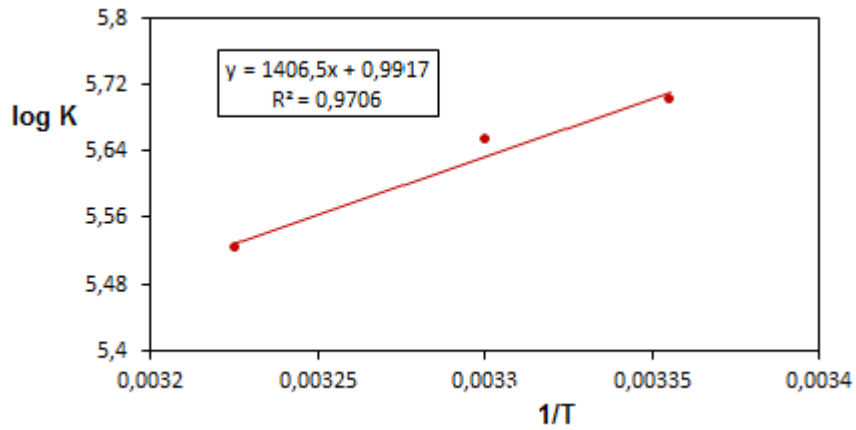
**Çizelge 4.2.** HZC-Pepsin etkileşiminde, K bağlanma sabitleri ve n bağlanma kısım sayıları.

	T (K)	Eşitlik (log-log)	K ( $\text{M}^{-1}$ ) $\times 10^5$	n	R <sup>2</sup>
Pepsin	298	$\log (F_0-F)/F = \log 5.701 + 1.157 \log [Q]$	5.02	1.157	0.995
	303	$\log (F_0-F)/F = \log 5.652 + 1.147 \log [Q]$	4.49	1.147	0.997
	310	$\log (F_0-F)/F = \log 5.521 + 1.116 \log [Q]$	3.32	1.116	0.994

Çizelge 4.2 de elde edilen sonuçlara göre, sıcaklığın artmasıyla K, bağlanma sabitlerindeki azalma oluşan HZC-pepsin kompleksinin kararlılığının azaldığını ve yüksek sıcaklıklarda kompleksin bir kısmının nispeten ayrıştığını göstermektedir. Oda sıcaklığındaki K, bağlanma sabitinin  $10^5$  mertebesinde olması pepsin-HZC arasında güçlü bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. n, bağlanma kısım sayılarının yaklaşık bir olması ise, HZC ile pepsin arasında yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesinin var olduğunu ve etkileşiminin bir noktadan gerçekleştiğini göstermektedir (Wang et al. 2008; Ma et al. 2017).

#### 4.1.1. HZC-pepsin etkileşiminde termodinamik parametrelerin ve bağlanma türünün belirlenmesi

Proteinler ile küçük moleküllerin (ilaç, boya, floresan uç vb.) etkileşimine katkıda bulunan moleküler kuvvetler; hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler önemli rol oynamaktadır (Wang et al. 2008). Termodinamik parametrelerden entalpi ( $\Delta H$ ) ve entropi ( $\Delta S$ ) değişimi değerlerinin, büyüklüklerinin ve işaretlerinin bulunması biyomolekül-ligand etkileşim türünün belirlenmesinde oldukça önemlidir. HZC ile pepsin etkileşiminde, sıcaklık değişimine göre, Çizelge 4.2 de bulunan bağlanma sabitleri, K değerlerinin log ifadeleri, van't Hoff Eşitliğine (Eşitlik 3) göre  $1/T$ 'ye karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrusal grafiğin ( $\log K = 0.9917 + 1406.5 / T$ ,  $R^2=0.9706$ ) eğiminden  $\Delta H$ , kesim noktasından  $\Delta S$  parametreleri hesaplanmıştır (Şekil 4.4). Serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) ise Eşitlik 4 den hesaplanmıştır. Bulunan termodinamik parametreler Çizelge 4.3 de listelenmiştir.



Şekil 4.4. Pepsin ile HZC etkileşiminde elde edilen van't Hoff grafiği.

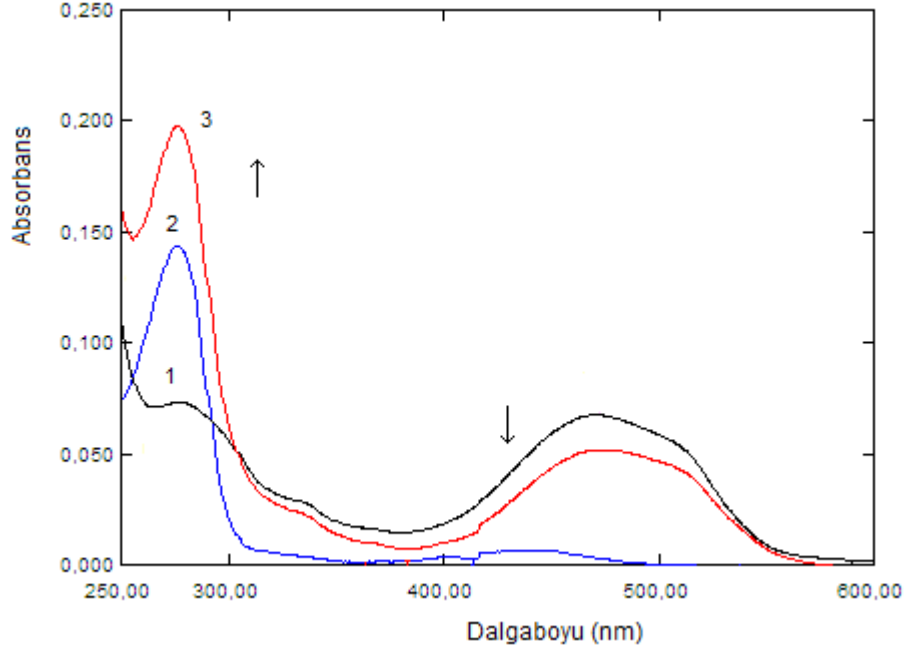
**Çizelge 4.3.** HZC-Pepsin etkileşiminde elde edilen termodinamik parametreler.

	T (K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)
Pepsin	298	-26.92	-32.34	18.18
	303		-32.43	
	310		-32.56	

Çizelge 4.3 de elde edilen termodinamik parametrelere göre, negatif  $\Delta G$  değerleri, HZC'nin pepsin ile etkileşiminin kendiliğinden oluştuğunu ve negatif  $\Delta H$  değeri ise reaksiyonun ekzotermik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca negatif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değerleri, HZC-pepsin kompleksinde başlıca *hidrofobik* etkileşimler yanında *elektrostatik* etkileşimlerin de etkili olduğunu göstermektedir (Cui et al. 2006; Ge et al. 2010; Ross and Subramanian, 1981).  $\Delta S$  değişiminin pozitif değeri, pepsin ve HZC etrafında rastgele dizilmiş su moleküllerinden kaynaklandığını, bunun da pepsin-HZC arasında hidrofobik etkileşimlere neden olduğu bilinmektedir. Bu sonuçlar pepsin-HZC kompleks oluşumuna bağlı olarak, pepsinin ikincil yapısının kısmen düzensizleştiğini göstermektedir (Huang et al. 2009; Cheng et al. 2020).

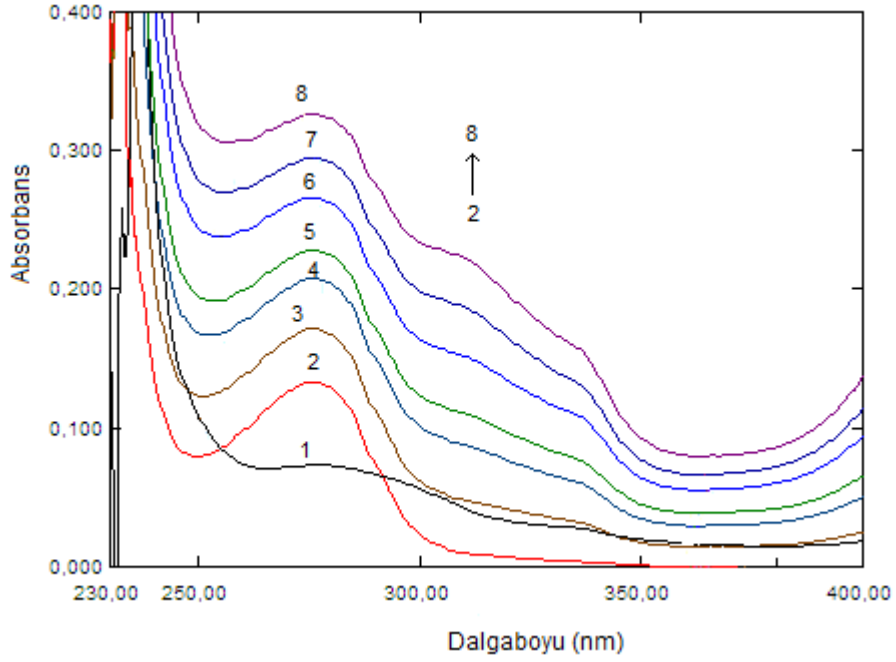
#### 4.1.2. HZC-pepsin etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları

UV-görünür bölge absorpsiyon ölçümü, kompleks oluşumunun tespit edilmesinde basit, etkili ve temel bir yöntemdir. Pepsindeki yapısal değişiklikleri araştırmak için pepsinin, HZC'nin ve eşit derişimde her ikisini de içeren çözeltilerin UV-görünür absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5). 276 nm de pepsinin absorpsiyon pikindeki artış ve görünür bölgede HZC'nin absorpsiyon pikindeki azalma HZC-pepsin arasında etkileşiminin olduğuna işaret etmektedir.



**Şekil 4.5.** HZC ile pepsin etkileşiminde elde edilen (1:1) absorpsiyon spektrumları.  
**1)**  $2 \times 10^{-6}$  M HZC, **2)**  $2 \times 10^{-6}$  M pepsin,  
**3)**  $2 \times 10^{-6}$  M HZC- $2 \times 10^{-6}$  M pepsin karışımı.

2.5 mL  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin içeren çözeltiliye belirli ve artan derişimlerde mikro enjeksiyon ile HZC çözeltileri eklenerek, aralarındaki etkileşime ait UV absorpsiyon spektrumu elde edilmiştir (Şekil 4.6). Spektrumda açıkça görüldüğü üzere pepsinin triptofan ucundan kaynaklı 276 nm de absorpsiyon piki mevcut olup, HZC çözeltilerinin eklenmesi ile beraber yaklaşık olarak dalga boyunda 4 nm ( $276\text{nm} \rightarrow 280\text{nm}$ ) kayma gözlenmiştir. Kırmızıya kayma (batokromik kayma), polar olmayan hidrofobik boşluklara gömülü aromatik uçların daha hidrofilik bir ortama geçtiğini göstermektedir (Ma et al. 2016). Kırmızıya kayma ve 276 nm'deki aromatik amino asit uçların absorbans değerlerindeki artış ( $\pi-\pi^*$  geçişleri), HZC ile pepsin arasında bir etkileşimin olduğunu ve floresans sönüm çalışmalarında elde edilen veriler ile uyum göstermektedir (Ge et al. 2010; Guo et al. 2015). HZC-pepsin etkileşimi sonucu pepsindeki triptofan uçların çevresindeki hidrofobiklikte bir azalma olduğu sonucuna varılır (Yue et al. 2020).



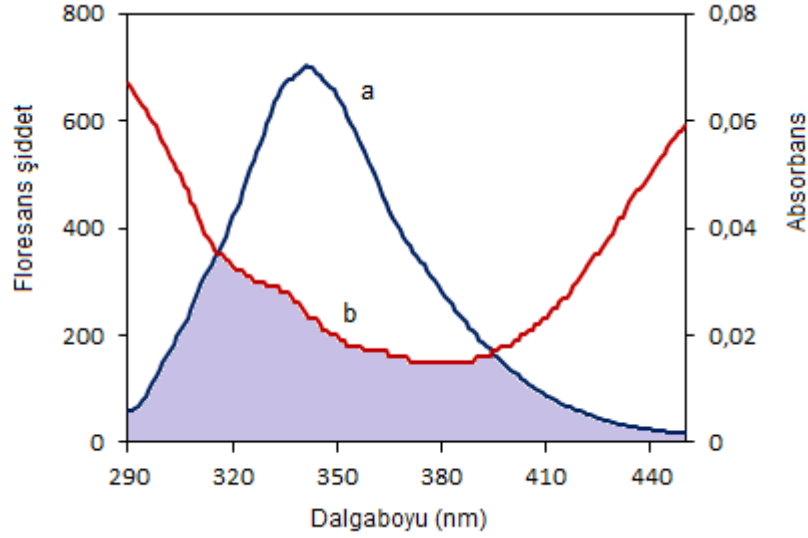
**Şekil 4.6.**  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsin (spektrum 2) ile HZC etkileşimine ait absorsiyon spektrumları. 2. spektrumdan 8. spektruma doğru eklenen HZC derişimleri: 0.0, 1.95, 3.89, 5.82, 7.75, 9.66 ve 11.5 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum 1:  $2.0 \times 10^{-6}$  M HZC).

#### 4.1.3. HZC-pepsin etkileşiminde floresans rezonans enerji transferi çalışmaları

Donör-akseptör molekülleri arasındaki enerji aktarımını açıklamak için önemli bir parametre olan  $J(\lambda)$  değerinin bulunması önemlidir. Bunun için HZC'nin absorpsiyon spektrumu ile pepsinin floresans spektrumunun örtüşmesinin (Şekil 4.7) integrasyonu değerlendirilmiştir. 290-450 nm dalga boyu aralığında yapılan çalışmada  $J(\lambda)$  değeri, Eşitlik 8 e göre  $1.84977 \times 10^{-14} \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^3$  olarak bulunmuştur. Eşitlik 5 kullanılarak elde edilen E değeri, pepsin ve HZC'nin eşit derişimlerinde 0.173 olarak elde edilmiştir. Pepsin için  $\kappa_2 = 2/3$ ,  $n = 1.336$  ve  $Q_D = 0.15$  (Zeng et al. 2014) değerleri kullanılarak  $R_0 = 2.83 \text{ nm}$  (Eşitlik 7) ve  $r = 3.67 \text{ nm}$  (Eşitlik 6) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4 de verilen sonuçlara göre, r değerinin 8 nm'den az ve  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$  aralığında olması, pepsinden HZC'ye ışımaz enerji transferinin yüksek olasılıkla gerçekleştiğini ve Förster'in ışımaz enerji transferi teorisine uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca r, donör-akseptör çiftinin arasındaki uzaklık değerinin,  $R_0$ , %50 enerji transferindeki kritik uzaklık değerinden büyük olması floresans sönümün, statik

sönüm mekanizmasına göre gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Wang et al. 2008; Gadallah et al. 2021).



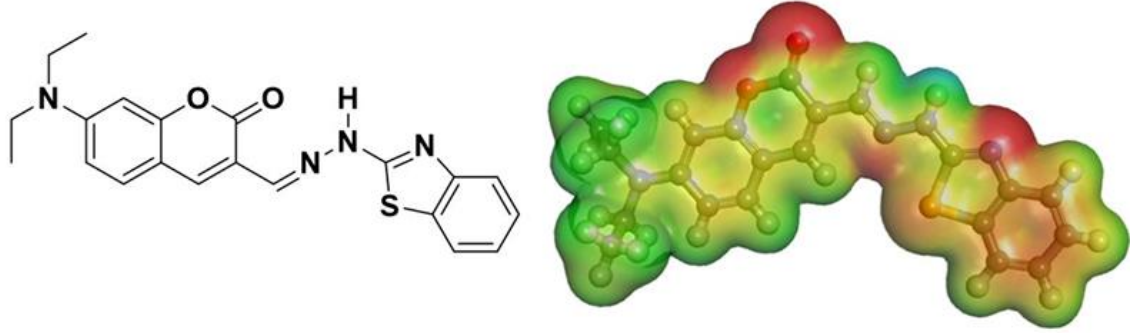
**Şekil 4.7.**  $2.0 \times 10^{-6}$  M pepsinin floresans spektrumu (a) ile  $2.0 \times 10^{-6}$  M HZC'nin absorpsiyon spektrumunun (b) örtüşmesi.

**Çizelge 4.4.** HZC-Pepsin etkileşiminin rezonans floresans enerji transfer parametreleri.

Protein	J ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^3$ )	$R_0$ (nm)	E	r (nm)
Pepsin	$1.85 \times 10^{-14}$	2.83	0.173	3.67

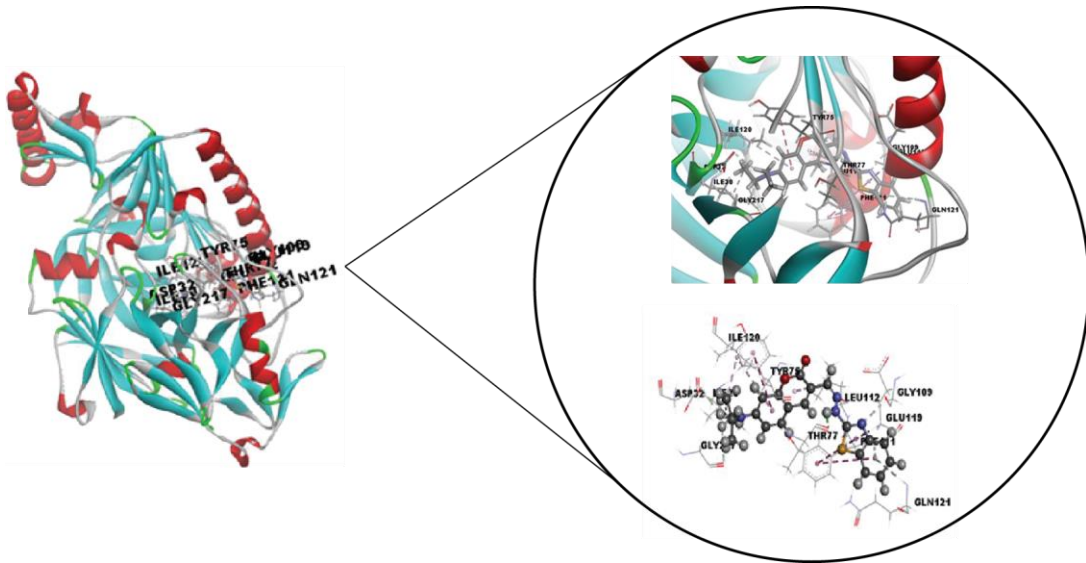
#### 4.1.4. HZC-pepsin moleküler kenetlenme çalışmaları

HZC türevi optimize edildikten sonra, elektrofilik ve nükleofilik reaktif bölgelerini incelemek için MEPS (moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyi) haritası, G09 software programı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.8). Benzotiyazola ait azot ve kükürt atomları ile kumarin yapısında bulunan oksijenler koyu kırmızı renk ile negatif yük yoğunluğu; N-H bağının olduğu kısımdaki azot atomu mavi renk ile pozitif yük yoğunluğu gösterilmiştir.



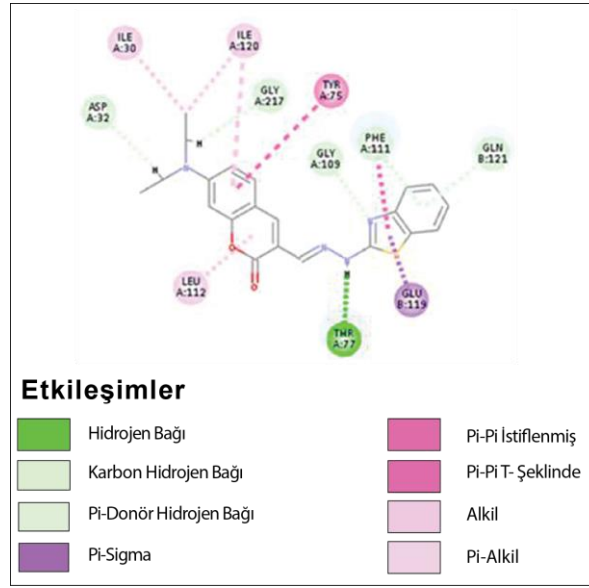
**Şekil 4.8.** HZC'nin moleküler yapısı (sol tarafta) ve Gaussian09 programı DFT/B3LYP/6-31G\* dayanılarak optimize edilen MEPS haritası (sağ tarafta).

Hedef molekül olarak pepsinin bağlanma alanını, ligand olarak HZC'nin afinitesini tahmin etmek ve HZC-pepsin etkileşiminin detaylı açıklanması için moleküler kenetlenme çalışması yapılmıştır. Seçilen hedef bağlanma bölgelerine HZC'yi yerleştirmek için AutoDock kenetlenme uygulanmıştır. Moleküler kenetleme sonuçları, üç boyutlu amino asit etkileşimleri, bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti, ( $K_i$ ) değerleri ile değerlendirilmiştir. Ligandın on olası yapısı üretilmiştir ve en iyi poz, her bir kompleks için en düşük enerji değerlerine göre tanımlanmıştır. Oluşan kompleks için HZC'nin nispi yönelimleri Şekil 4.9 da gösterilmiştir.



**a**





**b**

**Şekil 4.9.** Pepsin bağlanma bölgesinde HZC'nin **a)** 3 boyutlu ve **b)** 2 boyutlu etkileşimleri.

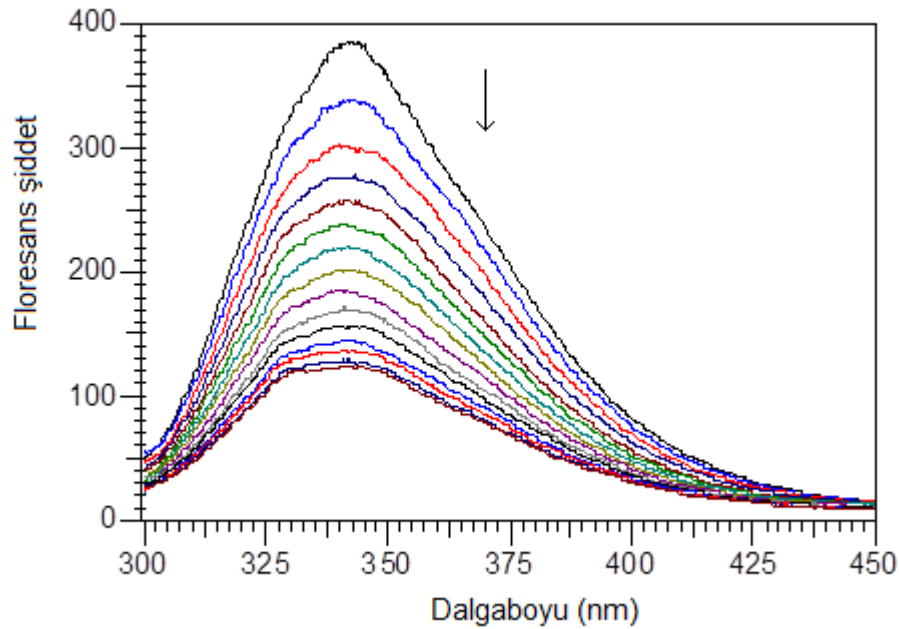
HZC-Pepsin kompleksindeki üç boyutlu etkileşimlerde, pepsinin Thr77, Gly109, Gly217, Asp32, Phe111 ve Gln121 amino asit uçları ile HZC'nin farklı oksijen ve azot atomları ile altı hidrojen bağı oluşturduğu EK 2: Çizelge 1 de gösterilmiştir. Hidrojen bağları, oluşan kompleksin kararlılığına büyük katkı sağlamakla beraber, proteinin ikincil ve üçüncül yapılarının oluşumunda önceliklidir. Sonuçlar hidrojen bağ oluşumunun hidrofiliği azalttığını ve hidrofobikliği artırarak, HZC-pepsin kompleks kararlılığını arttırdığını göstermektedir (Ma et al. 2016). Hidrojen bağlarının yanı sıra pepsin enziminde mevcut olan Glu119, Phe111, Tyr75, Ile30, Ile120 ve Leu112 amino asit uçları HZC ile sekiz hidrofobik etkileşime sahip olduğu görülmektedir. Moleküler kenetlenmeden elde edilen sonuçların termodinamik çalışmalardan elde edilen bağlanma türleri ile uyum gösterdiği ve HZC-pepsin arasındaki etkileşimde hidrofobik kuvvetlerin esas olduğu, beraberinde hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetlerin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 4.5.** HZC-pepsin kompleksinin bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti değeri.

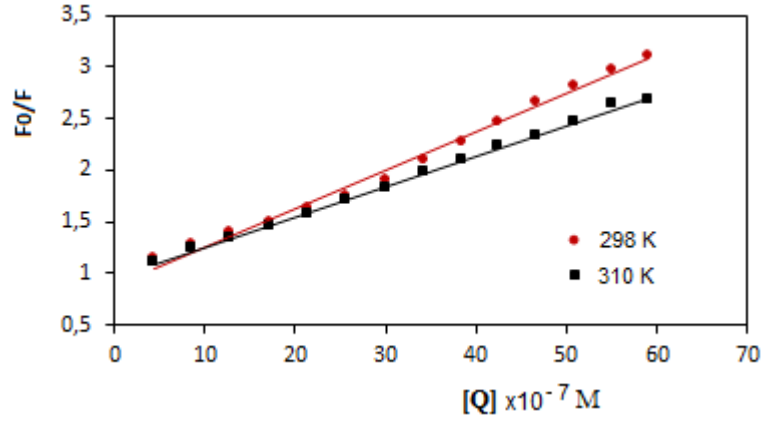
Ligand	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	İnhibisyon Sabiti (K <sub>i</sub> , nM)
HZC	-9.140	200.94

## 4.2 HZC-HSA etkileşiminin floresans çalışmaları

2.5 mL  $5 \times 10^{-6}$  M pepsin içeren çözeltiliye belirli ve artan derişimlerde mikro enjeksiyon ile HZC çözeltileri eklenerek floresans titrasyon yapılmıştır. Çözeltiler 294 nm'de uyarılarak floresans şiddet ve emisyon spektrumlarındaki değişimler 300-450 nm dalga boyu aralığında farklı sıcaklıklarda (298 ve 310 K) kaydedilmiştir. Şekil 4.10 da 298 K sıcaklıkta kaydedilen HSA'nın floresans sönüm spektrumları görülmektedir. HSA'nın triptofan floresans şiddeti, artan HZC derişimi ile birlikte düzenli bir azalma (*sönüm*) gösterdiği ve etkileşimin olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlar iki sıcaklıkta Stern-Volmer grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.11) ve elde edilen sönüm verileri Çizelge 4.6 da listelenmiştir.



**Şekil 4.10.**  $5.0 \times 10^{-6}$  M HSA üzerine artan derişimlerde HZC eklenmesi ile elde edilen floresans spektrumları. HZC derişimi: 0, 0.433; 0.865; 1.29; 1.72; 2.15; 2.57; 3.00; 3.42; 3.84; 4.25; 4.67; 5.09; 5.50; 5.91 ( $\times 10^{-6}$ ) M.  $\lambda_{uy}$ =294 nm, 298 K, pH=7.4.

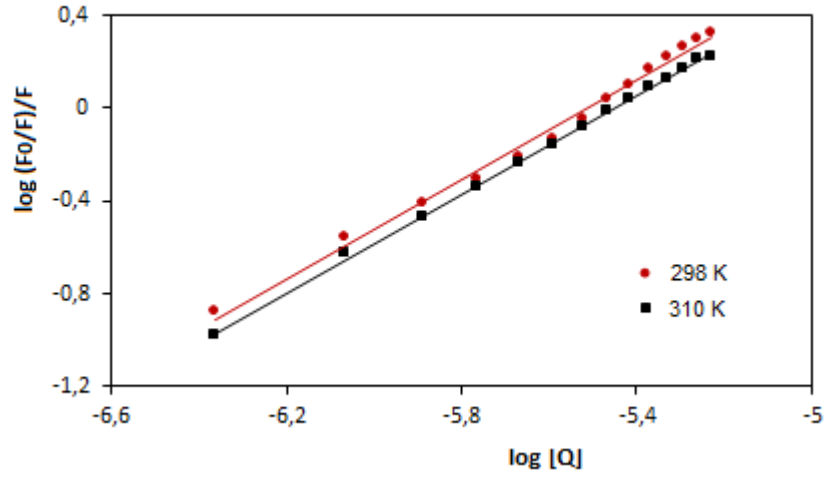


Şekil 4.11.  $5.0 \times 10^{-6}$  M HZC ile HSA etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen Stern-Volmer grafikleri.

Çizelge 4.6. HZC-HSA etkileşiminde Stern-Volmer verileri.

	T (K)	Stern Volmer eşitliği	$K_{sv} (M^{-1}) \times 10^5$	$k_q (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{13}$	$R^2$
HSA	298	$F_0/F = 0.877 + 3.70 \times 10^5 [Q]$	3.70	3.70	0.991
	310	$F_0/F = 0.959 + 2.90 \times 10^5 [Q]$	2.90	2.90	0.998

Çizelge 4.6 da elde edilen verilere göre, sıcaklık artışı ile  $K_{sv}$  değerlerinde azalma olduğunu ve  $k_q$ , biyomoleküler sönmü sabitlerinin  $10^{10} M^{-1}s^{-1}$  değerinden çok daha büyük olduğunu göstermektedir. Buna göre HZC ile HSA etkileşiminde *statik sönmü* mekanizmasının etkili olduğu ve etkileşim esnasında HZC-HSA arasında kompleks yapının oluştuğunu göstermektedir (Li and Li, 2016). HZC-HSA etkileşiminin, çift logaritma eşitliği (Eşitlik 2) kullanılarak, iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen floresans titrasyonlarından elde edilen  $\log (F_0 - F) / F - \log [Q]$  grafikleri (Şekil 4.12) çizilmiştir. Çizilen grafiklerden K, bağlanma sabiti ve n, bağlanma kısım sayıları Çizelge 4.7 de listelenmiştir.



**Şekil 4.12.**  $5.0 \times 10^{-6}$  M HZC ile HSA etkileşiminde, farklı sıcaklıklarda elde edilen log-log grafikleri.

**Çizelge 4.7.** HZC-HSA etkileşiminde, K bağlanma sabitleri ve n bağlanma kısım sayıları.

	T (K)	Eşitlik (log-log)	K ( $M^{-1}$ ) $\times 10^5$	n	R <sup>2</sup>
HSA	298	$\log (F_0-F)/F = \log 5.902 + 1.071 \log [Q]$	7.98	1.071	0.993
	310	$\log (F_0-F)/F = \log 5.808 + 1.066 \log [Q]$	6.43	1.066	0.999

Çizelge 4.7 de elde edilen sonuçlara göre, sıcaklığın arttıkça K, bağlanma sabitlerindeki görülen azalma, HZC-HSA kompleksinin kararlılığının azaldığını göstermektedir. Oda sıcaklığındaki K, bağlanma sabitinin  $10^5$  mertebesinde olması moleküllerin arasında güçlü bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. n, bağlanma kısım sayılarının yaklaşık bir olması ise etkileşiminin bir noktadan olduğuna işaret etmektedir. (Wang et al. 2008; Ma et al. 2017; Guo et al. 2015)

#### 4.2.1. HZC-HSA etkileşiminde termodinamik parametrelerin ve bağlanma türünün belirlenmesi

HZC ile HSA etkileşiminde, Çizelge 4.7 de verilen iki sıcaklıktaki bağlanma sabitleri kullanılarak aşağıda verilen van't Hoff eşitliğine göre,  $\Delta H$  değeri Eşitlik 9 dan

hesaplanmıştır. Serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) Eşitlik 4 ve  $\Delta S$  Eşitlik 3 den hesaplandı. Bulunan termodinamik parametreler Çizelge 4.8 de listelenmiştir.

$$\ln K_2/K_1 = - \Delta H/R (1/T_2-1/T_1) \quad (9)$$

$T_2$  ve  $T_1$  iki farklı Kelvin cinsinden sıcaklık değeri;  $K_2$  ve  $K_1$  sıcaklıklara ait bağlanma sabitleri;  $\Delta H$  entalpi değeri;  $R$  ise gaz sabiti olup  $8.3145 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ 'dir (Petrucci et al. 2011).

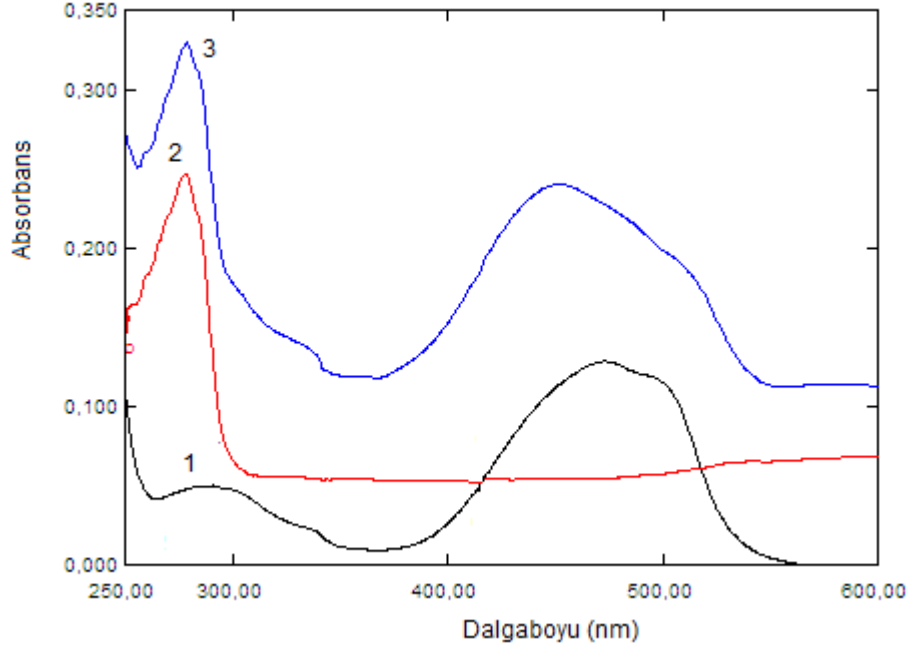
**Çizelge 4.8.** HZC-HSA etkileşiminde elde edilen termodinamik parametreler.

	T (K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)
Pepsin	298	-13.83	-33.67	66.60
	310		-34.47	

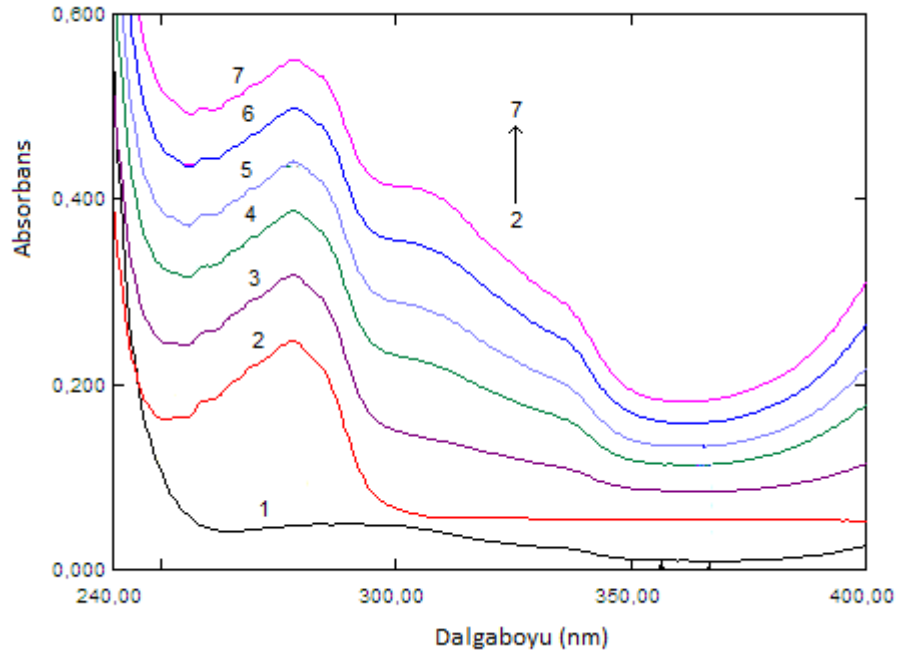
Çizelge 4.8 de elde edilen termodinamik parametrelere göre, Negatif  $\Delta G$  değerleri, HZC'nin HSA ile etkileşiminin kendiliğinden oluştuğunu ve negatif  $\Delta H$  değeri ise reaksiyonun ekzotermik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Negatif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değerleri, HZC-HSA kompleksinde başlıca *hidrofobik* etkileşimler yanında *elektrostatik* etkileşimlerin de etkili olduğunu göstermektedir (Cui et al. 2006; Ge et al. 2010; Ross and Subramanian, 1981).

#### 4.2.2. HZC-HSA etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları

HSA'daki yapısal değişiklikleri araştırmak için HSA'nın, HZC'nin ve eşit derişimde her ikisini de içeren çözeltilerin UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 4.13). 278 nm de HSA'nın absorpsiyon pik şiddetindeki artış HZC-HSA arasında etkileşimin olduğunu göstermektedir.  $5.0 \times 10^{-6}$  M HSA içeren çözeltilere belirli ve artan derişimlerde HZC çözeltileri eklenerek, UV absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 4.14). Spektrumda açıkça görüldüğü gibi HSA'nın triptofan ucundan kaynaklı 278 nm deki absorpsiyon piki, HZC çözeltilerinin eklenmesi ile birlikte yaklaşık 5 nm ( $278\text{nm} \rightarrow 283\text{nm}$ ) dalga boyunda kırmızıya kayma göstermektedir. Bu sonuca göre, HZC ile HSA arasında bir etkileşimin olduğu sonucuna varılmıştır.



**Şekil 4.13.** HZC ile HSA etkileşiminde elde edilen (1:1) absorpsiyon spektrumları.  
 1)  $5 \times 10^{-6}$  M HZC, 2)  $5 \times 10^{-6}$  M HSA,  
 3)  $5 \times 10^{-6}$  M HZC- $5 \times 10^{-6}$  M HSA karışımı.

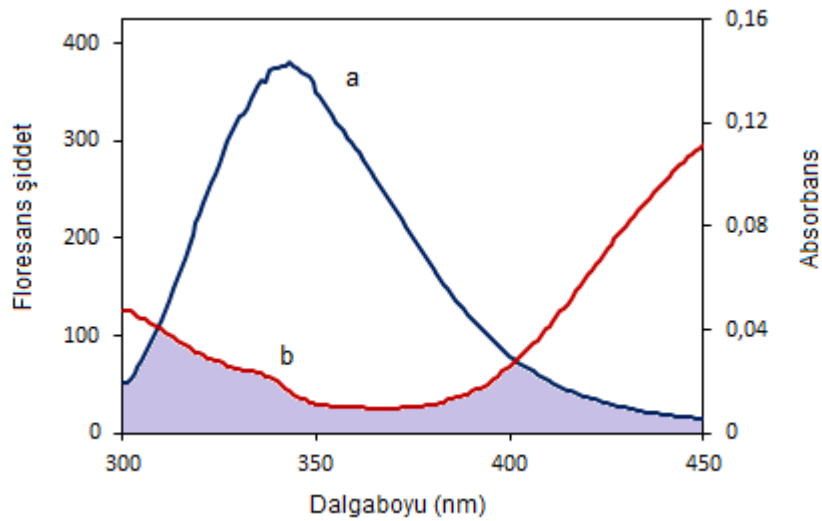


**Şekil 4.14.**  $5.0 \times 10^{-6}$  M HSA (spektrum 2) ile HZC etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. 2. spektrumdan 7. spektruma doğru eklenen HZC derişimleri: 0.0; 4.33; 8.64; 12.9; 17.2 ve 21.4 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum 1:  $5.0 \times 10^{-6}$  M HZC).

#### 4.2.3. HZC-HSA etkileşiminde floresans rezonans enerji transferi çalışmaları

HSA-HZC molekülleri arasındaki rezonans enerji aktarımında  $J(\lambda)$  değerini bulmak için HZC'nin absorpsiyon spektrumu ile HSA'nın floresans spektrumunun örtüşmesinin (Şekil 4.15) integrasyonu değerlendirilmiştir. 300-450 nm dalga boyu aralığında yapılan çalışmada  $J(\lambda)$  değeri, Eşitlik 8 e göre  $7.44775 \times 10^{-15} \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^3$  olarak bulunmuştur. Eşitlik 5 kullanılarak elde edilen E değeri, HSA ve HZC'nin eşit derişimlerinde 0.617 olarak elde edilmiştir. HSA için  $\kappa^2 = 2/3$ ,  $n = 1.336$  ve  $Q_D=0.13$  (Zeng et al. 2014) değerleri kullanılarak,  $R_0=2.37 \text{ nm}$  (Eşitlik 7) ve  $r = 2.19 \text{ nm}$  (Eşitlik 6) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9 da elde edilen sonuçlara göre, r değerinin 8 nm'den az ve  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$  aralığında olması, HSA'dan HZC'ye ışmasız enerji transferinin yüksek olasılıkla gerçekleştiğini ve Förster'in ışmasız enerji transferi teorisine uygun olduğunu göstermektedir.



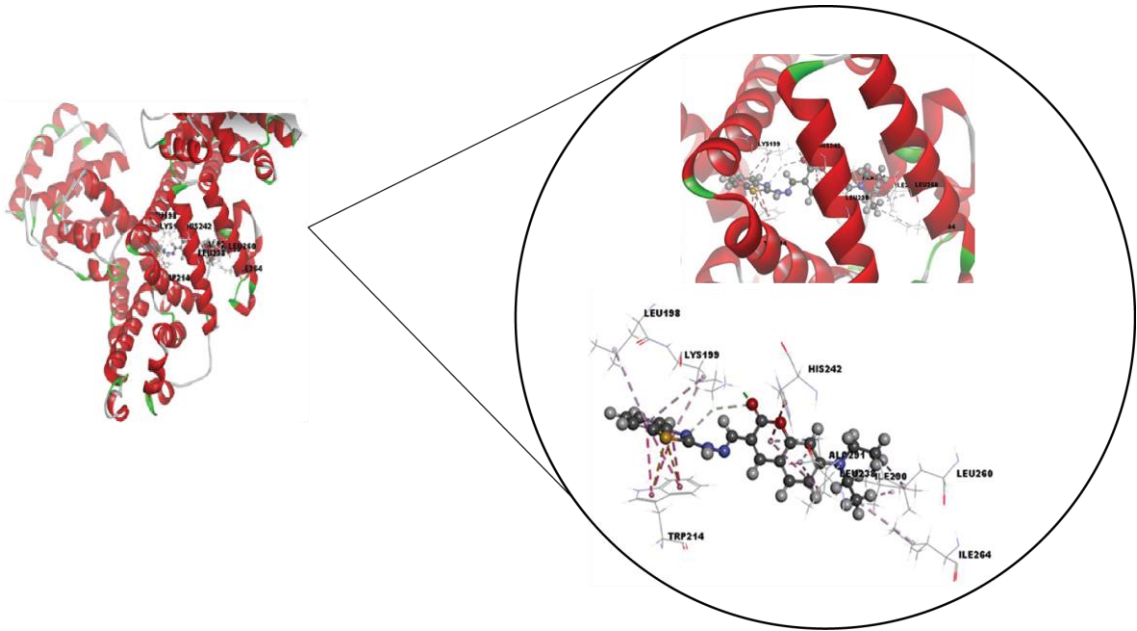
**Şekil 4.15.**  $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  HSA'nın floresans spektrumu (a) ile  $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  HZC'nin absorpsiyon spektrumunun (b) örtüşmesi.

**Çizelge 4.9.** HZC- HSA etkileşiminin rezonans floresans enerji transfer parametreleri.

Protein	J (Lmol <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> )	R <sub>0</sub> (nm)	E	r (nm)
HSA	7.45x10 <sup>-15</sup>	2.37	0.617	2.19

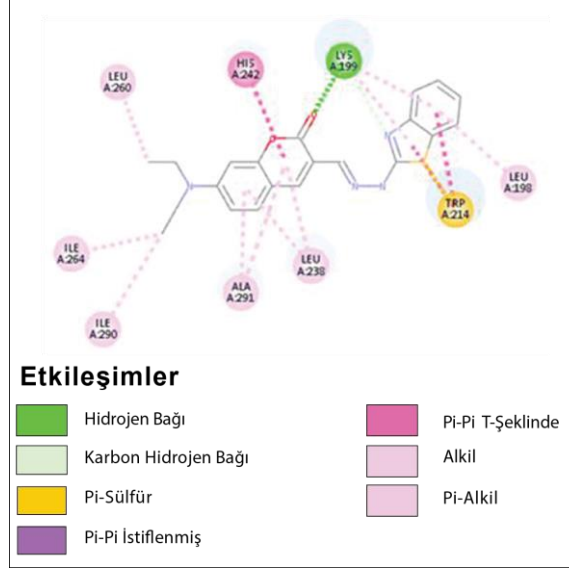
#### 4.2.4. HZC-HSA moleküler kenetlenme çalışmaları

HSA olarak hedef modelde bağlanma alanını ve ligand olarak HZC'nin afinitesini tahmin etmek için moleküler kenetlenme uygulanmıştır. Seçilen hedef bağlanma bölgelerine HZC'yi yerleştirmek için AutoDock kenetlenme uygulanmıştır. Moleküler kenetleme sonuçları, üç boyutlu amino asit etkileşimleri, bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti, (K<sub>i</sub>) değerleri ile değerlendirilmiştir. Ligandın on olası yapısı üretilmiştir ve en iyi poz, her bir kompleks için en düşük enerji değerlerine göre tanımlanmıştır. Oluşan kompleks için HZC'nin nispi yönelimleri Şekil 4.16 de gösterilmiştir.



**a**





**b**

**Şekil 4.16.** HSA bağlanma bölgesinde HZC'nin **a)** 3 boyutlu ve **b)** 2 boyutlu etkileşimleri.

HZC-HSA kompleksindeki üç boyutlu etkileşimlerde, HSA'nın Lys199 amino asit ucu ile HZC'nin oksijen ve azot atomları arasında üç hidrojen bağının olduğu EK 2: Çizelge 2 de gösterilmektedir. Ayrıca HZC bileşiği, HSA'nın Trp214, His242, Ala291, Leu238, Ile290, Lys199 ve Leu198 aromatik uçları ile on altı hidrofobik etkileşime sahiptir. HSA, hidrofobik etkileşimlerini iki ilaç bağlanma bölgesinden biri olan IIA alt kısmının hidrofobik boşluğunda gerçekleştirmektedir (Jana et al. 2012).

Çizelge 4.10'a göre, HZC-HSA kenetlenme çalışmasında bağlanma enerjisi (-24.001 kcal/mol), HZC-pepsin arasındaki etkileşimin bağlanma enerjisine (-9.140 kcal/mol) göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum HZC'nin HSA'ya karşı daha yüksek bağlanma afinitesine (ilgisine) sahip olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.10.** HZC-HSA kompleksinin bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti değeri.

Ligand	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	İnhibisyon sabiti (K <sub>i</sub> , nM)
HZC	-24.001	1.870,65

### 4.3. HZC'nin pepsin ve HSA varlığında tayini için analitik veriler

HZC'nin tez çalışmasındaki etkileşim deneysel ortamındaki nicel tayini için; pepsin/HSA için oda sıcaklığında elde edilen ve aşağıda verilen doğrusal Stern Volmer grafikleri, kalibrasyon grafikleri olarak kullanılmıştır.

$$\text{Pepsin-HZC için} \quad F_0/F = 0.9323 + 1.108 \times 10^5 [Q] \quad (R^2=0.997)$$

$$\text{HSA-HZC için} \quad F_0/F = 0.877 + 3.70 \times 10^5 [Q] \quad (R^2=0.991)$$

Hesaplanan analitik sonuçlar Çizelge 4.11 de verilmiştir. HZC için gözlenebilme sınırı (detection limit, LOD)= $3Sb/m$  ve tayin sınırı (quantification limit, LOQ)= $10Sb/m$  olarak hesaplanmıştır.  $Sb$ , kalibrasyon grafiği kesim noktasının standart sapması ve  $m$ , kalibrasyon grafiğinin eğimidir.  $n$  ise tekrarlanan ölçüm (deney) sayısıdır (Zhu et al. 2004). Yöntemin kesinliği için, pepsin ile yapılan deneylerde  $1.35 \times 10^{-5}$  M HZC için tekrarlanan sonuçlardan ( $n=6$ ) elde edilen bağıl standart sapma (BSS), % 4.09 olarak bulunmuştur. HSA ile yapılan deneylerde  $3.0 \times 10^{-6}$  M HZC için tekrarlanan sonuçlardan ( $n=4$ ) elde edilen BSS ise % 1.65 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.11.** Pepsin/HSA varlığında HZC tayini için analitik sonuçlar.

	Pepsin	HSA
HZC doğrusal çalışma aralığı (M)	$1.95 \times 10^{-6} - 2.66 \times 10^{-5}$	$4.33 \times 10^{-7} - 5.91 \times 10^{-6}$
Kesim noktası standart sapması ( $Sb$ )	0.1299	0.04704
Kalibrasyon grafiğinin eğimi ( $m$ )	$1.108 \times 10^5$	$3.70 \times 10^5$
Ölçüm sayısı ( $n$ )	8	9
Gözlenebilme sınırı (LOD) (M)	$3.518 \times 10^{-6}$	$3.814 \times 10^{-7}$
Tayin sınırı (LOQ) (M)	$1.173 \times 10^{-5}$	$1.272 \times 10^{-6}$
BSS (%)	4.09	1.65

## 5. YORUM

Tez çalışmasında, kumarin-hidrazon temelli olan ve HZC kısaltması ile verilen bir schiff bazı sentezlenmiştir ve spektral özellikleri karakterize edilmiştir. HZC'nin pepsin ve HSA ile etkileşim çalışmaları florimetrik titrasyon, absorpsiyon ve moleküler kenetlenme yöntemleri ile yürütülmüştür ve elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- Florimetrik titrasyon yöntemi ile yapılan çalışmalar, pepsin için üç farklı sıcaklıkta (298,303 ve 310 K) ve HSA için iki farklı sıcaklıkta (298 ve 310 K) yürütülmüştür. Pepsin ve HSA'nın floresans sönümden elde edilen verilerden çizilen Stern-Volmer grafikleri, sıcaklık artışı ile Ksv (sönüm sabiti) değerlerinde azalma olduğunu göstermiştir. Buna göre HZC molekülünün pepsin ve HSA ile etkileşiminin kompleks oluşumuna dayalı statik sönüm mekanizması ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
- HZC molekülünün pepsin ve HSA ile farklı sıcaklıklarda elde edilen çift logaritma grafiğinden K (bağlanma sabiti) ve n (bağlanma kısım sayısı) değerleri hesaplanmıştır. Sıcaklığın artması ile beraber K sabitlerinde gözlenen azalma HZC-pepsin ve HZC-HSA arasında oluşan kompleks kararlılığındaki azalmayı göstermiştir. n sayılarının yaklaşık bir olması ise HZC-pepsin ve HZC-HSA arasında yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesinin var olduğunu ve etkileşiminin bir noktadan gerçekleştiğini göstermiştir.
- Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen HZC-pepsin ve HZC-HSA arasındaki bağlanma türlerinin belirlenmesi için van't Hoff eşitliği kullanılarak termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Negatif  $\Delta H$  değeri ve pozitif  $\Delta S$  değeri, oluşan HZC-pepsin ve HZC-HSA komplekslerinde hidrofobik etkileşimler yanında elektrostatik etkileşimlerin de etkili olduğu belirlenmiştir. Negatif  $\Delta G$  değeri reaksiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini ve negatif  $\Delta H$  değeri ayrıca reaksiyonun ekzotermik olarak gerçekleştiğini göstermiştir.
- Pepsin ve HSA'nın HZC ile etkileşimi UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları ile de incelenmiştir. Ayrı ayrı pepsin ve HSA içeren çözeltilere, artan miktarlarda HZC çözeltisi eklendiğinde, sırası ile triptofan uçlardan kaynaklı 276 nm ve 278 nm dalga boylarındaki absorpsiyon pik şiddetlerinin arttığı ve hiperkromik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca dalga boylarında her iki etkileşim için kırmızıya kayma (batokromik kayma) gözlenmiştir. Kırmızıya

kayma ve absorbans pik şiddetlerindeki artış HZC-pepsin ve HZC-HSA arasında kuvvetli bir etkileşimin olduğunu, floresans çalışmaları ile UV-görünür bölge çalışmalarının birbiri ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir.

- Floresans rezonans enerji transfer çalışmaları neticesinde, donör-akseptör çifti arasındaki uzaklıklar  $R_0$  (kritik uzaklık) ve  $r$  değerleri hesaplanmıştır. HZC-pepsin çifti için,  $R_0=2.83$  nm ve  $r= 3.67$  nm; HZC-HSA çifti için,  $R_0= 2.17$  nm ve  $r=2.19$  nm olarak bulunmuştur. Moleküller arası uzaklık  $r$  değerlerinin 10 nm'den küçük ve  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$  aralığında olması, pepsinden HZC'ye ve HSA'dan HZC'ye ışımaz enerji transferinin yüksek olasılıkla gerçekleştiğini ve Förster'in ışımaz enerji transferi teorisine uygun olduğunu göstermiştir. HZC-pepsin etkileşimine ait  $r$  değerinin,  $R_0$  değerinden büyük olması floresans sönümün, statik sönüm mekanizmasına göre gerçekleştiğini göstermiştir ve Stern-Volmer grafiğinden elde edilen sonucu da desteklemiştir.
- HZC-pepsin ve HZC-HSA arasındaki etkileşimi açıklamak için moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kenetlenme sonuçlarına göre, pepsinin Thr77, Gly109, Gly217, Asp32, Phe111 ve Gln121 amino asit uçları ile HZC'nin farklı hidrojen ve azot atomları ile altı hidrojen bağı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Hidrojen bağlarının yanı sıra pepsin enziminde mevcut olan Glu119, Phe111, Tyr75, Ile30, Ile120 ve Leu112 amino asit uçları HZC ile sekiz hidrofobik etkileşime sahip olduğu gözlemlenmiştir. HSA'nın ise, Lys199 amino asit ucu ile HZC'nin oksijen ve azot atomları arasında üç hidrojen bağının olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca HZC bileşiği, HSA'nın Trp214, His242, Ala291, Leu238, Ile290, Lys199 ve Leu198 aromatik uçları ile on altı hidrofobik etkileşime sahip olduğu görülmüştür. HSA, hidrofobik etkileşimlerini iki ilaç bağlanma bölgesinden biri olan IIA alt kısmının hidrofobik boşluğunda gerçekleştirmiştir.
- Bağlanma enerjileri HZC-pepsin için -9.140 kcal/mol ve HZC-HSA için -24.001 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu durum HZC'nin HSA'ya karşı daha yüksek bağlanma afinitesine (ilgisine) sahip olduğunu göstermiştir. Bağlanma türlerine ilişkin, moleküler kenetlenme çalışmalarından ve termodinamik çalışmalardan elde edilen sonuçların birbiri ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. HZC-pepsin ve HZC-HSA arasındaki etkileşimde hidrofobik kuvvetlerin esas olduğu, beraberinde hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetlerin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

- Tezde çalışılan deneysel koşullarda, pepsin varlığında HZC için gözlenebilme sınırı  $3.518 \times 10^{-6}$  M ve tayin sınırı  $1.173 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur. Ayrıca, çalışılan deneysel ortamda, HSA varlığında HZC için gözlenebilme sınırı  $3.814 \times 10^{-7}$  M ve tayin sınırı  $1.272 \times 10^{-6}$  M olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, sentezlenmiş kumarin-hidrazon temelli HZC molekülünün pepsin ve HSA ile bağlanma özellikleri spektroskopik ve moleküler kenetlenme çalışmaları ile incelenmiştir. Elde edilen nitel ve nicel veriler, kumarin ve hidrazon içeren türevlerin proteaz enzimleri ve albüminler ile bağlanma özelliklerinin aydınlatılması iyi bir model olması ve bu bileşiklerle ilaç tasarım çalışmalarına yön vereceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Abu-Dief, A.M., & Mohamed, İ.M.A., A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 119-133, **2015**.

Algar, W.S., & Krull, U.J., New opportunities in multiplexed optical bioanalyses using quantum dots and donor–acceptor interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 2439-2449, **2010**.

Al-Majedy, Y.K., Al-Amiery, A., Kadhum, A.A.H., Mohamad, A.B., Antioxidant Activity of Coumarins. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 24-30, **2016**.

An, J.M., Yang, Z.Y., Yan, M.H., Li, T.R., A novel off–on fluorescence chemosensor for Ca<sup>2+</sup> based on Rhodamine–Coumarin Schiff base derivative. *Journal of Luminescence*, 139, 79-83, **2013**.

Barnett, C.J. Exchange amination process for preparing 2- hydrozinobenzothiazoles. *United States Patent*, **1976**.

Best, R.B., Merchant, K.A., Gopich, I.V., Schuler, B., Bax, A., Eaton, W.A., Effect of flexibility and cis-residues in single-molecule FRET studies of polyproline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 104(48), 18964-18969, **2007**.

Bhattacharyya, B., Kapoor, S., Panda, D., Fluorescence spectroscopic methods to analyze drug–tubulin interactions. *Methods in Cell Biology*, 95, 301–329, **2010**.

Bi, S., Song, D., Kan, Y., Xu, D., Tian, Y., Zhou, X., Zhang, H., Spectroscopic characterization of effective components anthraquinones in Chinese medicinal herbs binding with serum albumins. *Spectrochimica Acta Part A*, 62, 203-212, **2005**.

Bi, S., Song, D., Tian, Y., Zhou, X., Liu, Z., & Zhang, H., Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. *Spectrochimica Acta Part A*, 61(4), 629–636, **2005**.

Bhattar, S.L., Kolekar, G.B., Patil, S.R., Fluorescence resonance energy transfer between perylene and riboflavin in micellar solution and analytical application on determination of vitamin B2. *Journal of Luminescence*, 128(3), 306-310, **2008**.

Bogdan, M., Pirnau, A., Floare, C., Bugeac, C., Binding interaction of indomethacin with human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 981-984, **2008**.

Carter, D., & He, X., Structure of human serum albumin. *Science*, 249(4966), 302–303, **1990**.

Cheng, X., Liu, B.S., Zhang, H.C., Spectroscopic and molecular docking studies of the interaction between meloxicam and pepsin. *Spectroscopy Letters*, 53(1), 32-43, **2020**.

Cui, F.L., Wang, J.L., Cui, Y.R., Li, J.P., Fluorescent investigation of the interactions between N-(p-chlorophenyl)-N'-(1-naphthyl) thiourea and serum albumin: Synchronous fluorescence determination of serum albumin. *Analytica Chimica Acta*, 571(2), 175-183, **2006**.

Clapp, A.R., Medintz, I.L., Mauro, J.M., Fisher, B.R., Bawendi, M.G., Mattoussi, H., Fluorescence Resonance Energy Transfer Between QuantumDot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors. *JACS Article*, 126, 301-310, **2003**.

Dar, A.M., & Mir, S., Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 8(2), 1-3, **2017**.

Deniz, A.A., Dahan, M., Grunwell, J.R., Ha, T., Faulhaber, A.E., Chemla, D.S., Weiss, S., Schultz, P.G., Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 96(7), 3670-3675, **1999**.

Dias, R., & Azevedo, W.R.D, Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, 9, 1040-1047, **2008**.

Dockal, M., Chang, M., Carter, D.C., & Rüker, F., Five recombinant fragments of human serum albumin-tools for the characterization of the warfarin binding site. *Protein Science*, 9(8), 1455–1465, **2000**.

Dömötör, O., Tuccinardi, T., Karcz, D., Walsh, M., Creaven, B.S., Enyedy, E.A., Interaction of anticancer reduced Schiff base coumarin derivatives with human serum

albumin investigated by fluorescence quenching and molecular modeling. *Bioorganic Chemistry*, 52, 16-23, **2014**.

Dufour, C., & Dangles, O., Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1721, 164-173, **2005**.

Faridbod, F., Ganjali, M.R., Larijani, B., Riahi, S., Saboury, A.A., Hosseini, M., Norouzi, P., Pillip, C., Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A*, 78(1), 96-101, **2011**.

Fard, F.J., Khoshkhoo, Z.M., Mirtabatabaei, H., Housaindakt, M.R., Jalal, R., Hosseini, H.E., Bozorgmehr, M.R., Esmaeili, A.A., Khoshkholgh, M.J., Synthesis, characterization and interaction of N,N'-dipyridoxyl (1,4-butanediamine) Co(III) salen complex with DNA and HSA. *Spectrochimica Acta Part A*, 97, 74-82, **2012**.

Fang, Y., Xu, H., Shen, L., Huang, F., Yibulayin, S., Huang, S., Shengli, T., Hu, Z., He, Z., Li, F., Li, Y., & Zhou, K. Study on the mechanism of the interaction between acteoside and pepsin using spectroscopic techniques. *Luminescence*, 30(6), 859–866, **2015**.

Feng, S., Gao, Q., Gao, X., Yin, J., Jiao, Y., Fluorescent sensor for copper (II) ions based on coumarin derivative and its application in cell imaging. *Inorganic Chemistry Communications*, 102, 51-56, **2019**.

Fernandez-Suarez, M., Ting, A.Y., Fluorescent probes for super resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 929–943, **2008**.

Förster, T., Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 2, 55-75, **1948**.

Gadallah, M.H., Ali, H.R.H, Askal, H.F., Saleh, G.A., Towards understanding of the interaction of certain carbapenems with protein via combined experimental and theoretical approach. *Spectrochimica Acta Part A*, 246, **2021**.

Ge, F., Chen, C., Liu, D., Han, B., Xiong, X., Zhao, S., Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, 130(1), 168-173, **2010**.

Ge, S., Lu, J., Yan, M., Yu, F., Yu, J., Sun, X., Fluorescence resonance energy transfer sensor between quantum dot donors and neutral red acceptors and its detection of BSA in micelles. *Dye and Pigments*, 91, 304-308, **2011**.



Gonçalves, M.S.T., Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chemical Reviews*, 109(1), 190–212, **2009**.

Ghosh, S., Roy, N., Singh, T.S., Chattopadhyay, N., Photophysics of a coumarin based Schiff base in solvents of varying polarities. *Spectrochimica Acta Part A*, 188, 252-257, **2018**.

Gökoğlu, E., Yılmaz, E., Gökoğlu, E., Baran Uzgören, A., Study of Binding Properties Between Two New Ibuprofen and Naproxen Based Acyl Hydrazone Derivatives and Trypsin. *Journal of Fluorescence*, 26, 113-119, **2016**.

Gökoğlu, E., & Yılmaz, E., Fluorescence Interaction and Determination of Sulfathiazole with Trypsin. *Journal of Fluorescence*, 24(5), 1439–1445, **2014**.

Guo, L., Ma, X., Yan, J., Xu, K., Wang, Q., Li, H., Interaction behavior between niclosamide and pepsin determined by spectroscopic and docking methods. *Journal of Fluorescence*, 25, 1681-1693, **2015**.

Guedes, I.A., Magalhaes, C.S., Dardenne, L.E., Receptor-Ligand molecular docking, Biophysical reviews, 6, 75-87, **2014**.

Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W., Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1487–1499, **2008**.

Huang, Y., Yan, J., Liu, B., Yu, Z., Gao, X., Tang, Y., Zi, Y., Investigation on interaction of prulifloxacin with pepsin: A spectroscopic analysis. *Spectrochimica Acta Part A*, 75(3), 1024-1029, **2010**.

Jana, S., Dalapati, S., Ghosh, S., & Guchhait, N., Study of microheterogeneous environment of protein Human Serum Albumin by an extrinsic fluorescent reporter: A spectroscopic study in combination with Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 112, 48–58, **2012**.

Jung, D., Min, K., Jung, J., Jang, W., Kwon, Y., Chemical biology-based approaches on fluorescent labeling of proteins in live cells. *Molecular BioSystems*, 9(5), 862-872, **2013**.

Kabir, M.Z., Tee, W.V., Mohamad, S.B., Alias, Z., Tayyab, S. Interaction of an anticancer drug, gefitinib with human serum albumin: insights from fluorescence spectroscopy and computational modeling analysis. *Royal Society of Chemistry*, 6, 91756-91767, **2016**.

Kamacı, U.D., Kamacı, M., Peksel, A., Thermally stable schiff base and its metal complexes: Molecular docking and protein binding studies. *Journal of Fluorescence*, 27, 805–817, **2017**.

Lai, L., Lin, C., Xu, Z.Q., Han, X.L., Tian, F.F., Mei, P., Li, D.W., Ge, Y.S., Jiang, F.L., Zhang, Y.Z., Liu, Y., Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A*, 97, 366-376, **2012**.

Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, New York: Springer, **2006**.

Li, X., & Li, P., Study on the interaction of  $\beta$ -carotene and astaxanthin with trypsin and pepsin by spectroscopic techniques. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 31(3), 782–792, **2016**.

Li, X., Yang, Z., Dissection of the binding of l-ascorbic acid to trypsin and pepsin using isothermal titration calorimetry, equilibrium microdialysis and spectrofluorimetry. *RSC Advances*, 5(45), 35487–35496, **2015**.

Li, Z., Zhou, Y., Yin, K., Yu, Z., Li, Y., Ren, J., A new fluorescence “turn-on” type chemosensor for  $\text{Fe}^{+3}$  based on naphthalimide and coumarin. *Dyes and Pigments*, 105, 7-11, **2014**.

Li, Q., & Seeger, S., Multidonor Deep-UV FRET Study of ProteinLigand Binding and ItsPotential to Obtain Structure Information. *The Journal of Physical Chemistry*, 115, 13643-13649, **2011**.

Liu, R., Sun, F., Zhang, L., Zong, W., Zhao, X., Wang, L., Wu R., Hao, X., Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin. *Science of The Total Environment*, 407(13), 4184–4188, **2009**.

Liu, X., & Hamon, J.R., Recent developments in penta-, hexa- and heptadentate Schiff base ligands and their metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 389, 94-118, **2019**.

Ma, X., He, J., Huang, Y., Xiao, Y., Wang, Q., Li, H., Investigation and comparison of the binding between tolvaaptan and pepsin and trypsin: Multi-spectroscopic approaches and molecular docking. *Journal of Molecular Recognition*, 30, **2017**.

Ma, X., Gou, L., Wang, Q., He, J., Li, H., Spectroscopy and molecular modeling study on the interaction between mycophenolate mofetil and pepsin. *Journal of Fluorescence*, 26, 599-608, **2016**.

Marcolan, M., Martins, P.A., Pedrosa, V.A., Rodrigues, M.R., Oliveira, H.P.M., Codognoto, L., Spectrofluorimetric Determination of Coumarin in Commercial Tablets. *Journal of Fluorescence*, 21, 733-738, **2011**.

Matei, I., & Hillebrand, M., Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 768-773, **2010**.

McClements, D.J., Modulation of Globular Protein Functionality by Weakly Interacting Cosolvents, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 417-471, **2002**.

Medintz, I.L., Clapp, A.R., Brunel, F.M., Tiefenbrunn, T., Uyeda H.T., Chang, E.L., Deschamps, J.R., Dawson, P., & Mattoussi, H., Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates. *Nature Materials*, 5, 581-589, **2006**.

Meti, M.D., Xu, Y., Xie, J., Chen, Y., Wu, Z., Liu, J., Han, Q., He, Z., Hu, Z., Xu, H., Multi-spectroscopic studies on the interaction between traditional Chinese herb, helicid with pepsin. *Molecular Biology Reports*, 45, 1637-1646, **2018**.

Misra, G., Fluorescence spectroscopy. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, Academic Press, Chapter 3, 31-37, **2019**.

Morris, G.M., Lim-Wilby, M., Molecular Docking. *Molecular Modeling of Proteins. Methods Molecular Biology<sup>TM</sup>*, Kukol A. (Eds.), Vol 443, Humana Press, 365-382, **2008**.

Nan, G., Wang, P., Sun, J., Lv, J., Ding, M., Yang, L., Li, Y., Yang, G., Spectroscopy and molecular docking study on the interaction of daidzein and genistein with pepsin. *Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 31, 1524-1531, **2016**.

Nelson, D.L., Cox, M.M., *Principles of Biochemistry*, 4th Edition, Lehninger, Chapter 3, 75-125, **2004**.

Pathak, M, Sharma, D., Sharma, N., Sharma, M., Spectroscopic and thermodynamic studies of the binding mechanism of metformin to pepsin. *Journal of Molecular Structure*, 1166, 183-189, **2018**.

Piloto, A.M., Costa, S.P.G., Gonçalves, M.S.T., A naphtho[2,1- b]furan as a new fluorescent label: synthesis and spectral characterisation. *Tetrahedron Letters*, 46(28), 4757–4760, **2005**.

Pinto, M.R., and Schanze, K.S., Amplified fluorescence sensing of protease activity with conjugated polyelectrolytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 101(20), 7505-7510, **2004**.

Peters, T. Jr., All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, xii, **1995**.

Petrucci, R.H., Herring, F.G., Madura, J.D., Bissonette, C., *General Chemistry: Principles and Modern Applications*, 10<sup>th</sup> edition, Pearson Press, Chapter 19, 850, **2011**.

Raufman, J.P., Pepsin. *Encyclopedia of Gastroenterology*, 147-148, **2004**.

Ross, P.D. and Subramanian, S., Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability, *Biochemistry*, 20, 3096-3102, **1981**.

Sahoo, H., Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1), 20–30, **2011**.

Sahoo, H., Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback. *RSC Advances*, 2(18), 7017-7029, **2012**.

Sabolova, D., Kozurkova, M., Plichta, T., Ondrusova, Z., Hudecova, D., Simkovic, M., Paulikova, H., Valent, A., Interaction of a copper(II)–Schiff base complexes with calf thymus DNA and their antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(2), 319-325, **2011**.

Samari, F., Shamsipur, M., Hemmateenejad, B., Khayamian, T., Gharaghani, S., Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 255-263, **2012**.

Shi, X., Li, X., Gui, M., Zhou, H., Yang, R., Zhang, H., & Jin, Y., Studies on interaction between flavonoids and bovine serum albumin by spectral methods. *Journal of Luminescence*, 130(4), 637–644, **2010**.

Silva, D., Cortez, C.M., Cunha-Bastos, J., & Louro, S.R.W, Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters*, 147(1), 53–61, **2004**.

Silva, D., Cortez, C.M., & Louro, S.R.W., Chlorpromazine interactions to sera albumins. *Spectrochimica Acta Part A*, 60(5), 1215–1223, **2004**.

Skoog, D.A., Holler F.J., ve Nieman T.A., Enstrümental Analiz İlkeleri, 6. Baskı, (Çev: E. Kılıç, H. Yılmaz), Bilim Yayınları, Ankara, 399-409, **2013**.

Skoog, D.A., West, D., Holler, F.J., Crouch, S.R., Fundamentals of Analytical Chemistry, 8th edition, Chapter 15, 417-418, **2004**.

Skrť, M., Benedik, E., Podlipnik, C., Ulrih, N.P., Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chemistry*, 135(4), 2418-2424, **2012**.

Subramanian, A., Yesaiyan, M., Sankaralingam, A., Balakrishnan, G., Meenakshi Sundaram, K. K., Solomon, R. V., Venuvanalingam, P., Akbarsha, M.A., Muthuraman, S., Biomolecular interaction, anti-cancer and anti-angiogenic properties of cobalt(III) schiff base complexes. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 9(1), **2019**.

Spelzini, D., Peleteiro, J., Picó, G., & Farruggia, B., Polyethyleneglycol–pepsin interaction and its relationship with protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2), 151–156, **2008**.

Tang, J., Luan, F., Chen, X., Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(9), 3210-3217, **2006**.

Tayyab, S., Izzudin, M.M., Kabir, M.Z., Feroz, S.R., Tee, W.V., Mohamad, S.B., Alias, Z., Binding of an anticancer drug, axitinib to human serum albumin: Fluorescence quenching and molecular docking study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 386-394, **2016**.

Toseland, C.P., Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*, 6(3), 85–95, **2013**.

Wang, J., Chan, C., Huang, F.W., Xie, J.F., Xu, H., Ho, K.W., Zheng, S.G., Hu, Z.L., Lu, J., He, Z.D., Interaction mechanism of pepsin with a natural inhibitor gastrodin studied by spectroscopic methods and molecular docking. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 405-413, **2017**.

Wang, Y.Q., Zhang, H.M., Zhang, G.C., Zhou, Q.H., Fei, Z.H., Liu, Z.T., Li, Z.X., Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between benzidine and bovine hemoglobin. *Journal of Molecular Structure*, 886(1-3), 77-84, **2008**.

Wang, X., Yue, Y., Zhang Y., Wang, Z., Liu, J., Tang, Q., Probing the interaction of pepsin with imidacloprid via DFT calculation, spectroscopic approaches and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1197, 210-216, **2019**.

Warrier, S.B., & Kharkar, P.S., A coumarin based chemosensor for selective determination of Cu (II) ions based on fluorescence quenching. *Journal of Luminescence*, 199, 407-415, **2018**.

Weiss, S., Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Materials Sciences and Physical Biosciences Divisions*, 283, 1676-1683, **1999**.

Xiang, Y., & Wu, F., Study of the interaction between a new Schiff-base complex and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 77(2), 430-436, **2010**.

Xiao, Y.N., & Zhan, C.X., Studies on the interaction of DNA and water-soluble polymeric Schiff base-nickel complexes. *Journal of Applied Polymer Science*, 84, 887-893, **2002**.

Ying, M., Huang, F., Ye, H., Xu, H., Shen, L., Huan, T., Huang, S., Xie, J., Tian, S., Hu, Z., He, Z., Lu, J., Zhou, K., Study on interaction between curcumin and pepsin by spectroscopic and docking methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 201-208, **2015**.

Yue, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, Z., Lv, Q., & Liu, J., Binding of triclosan and triclocarban to pepsin: DFT, spectroscopic and dynamic simulation studies. *Chemosphere*, 214, 278-287, **2019**.

Yue, Y., Yang, Y., Wang, Z., Wang, K., Wang, Z., Liu, J., Binding interactions between pepsin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Spectroscopy Letters*, 53(3), 152-162, **2020**.

Zeng, H.J., You, J., Liang, H.L., Qi, T., Yang, R., Qu, L., Investigation on the binding interaction between silybin and pepsin by spectral and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 105-111, **2014**.

Zhang, H.M., Wang, Y.Q., Zhou, Q.H., Investigation of the Interactions of quercetin and morin with trypsin. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 24(5), 355–362, **2009**.

Zhang, G., Wang, L., Pan, J., Probing the Binding of the Flavonoid Diosmetin to Human Serum Albumin by Multispectroscopic Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2721-2729, **2012**.

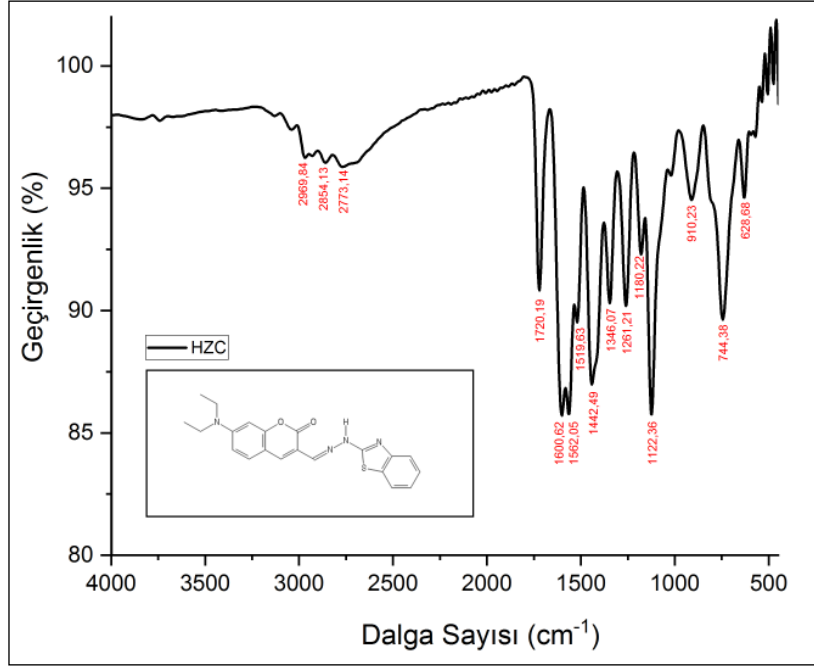
Zhang, H.M., Wang, Y.Q., Zhou, H.Q., Fluorimetric study of interaction of benzidine with trypsin. *Journal of Luminescence*, 130(5), 781-786, **2010**.

Zhang, G., Que, Q., Pan, J., Guo, J., Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 881, 132-138, **2008**.

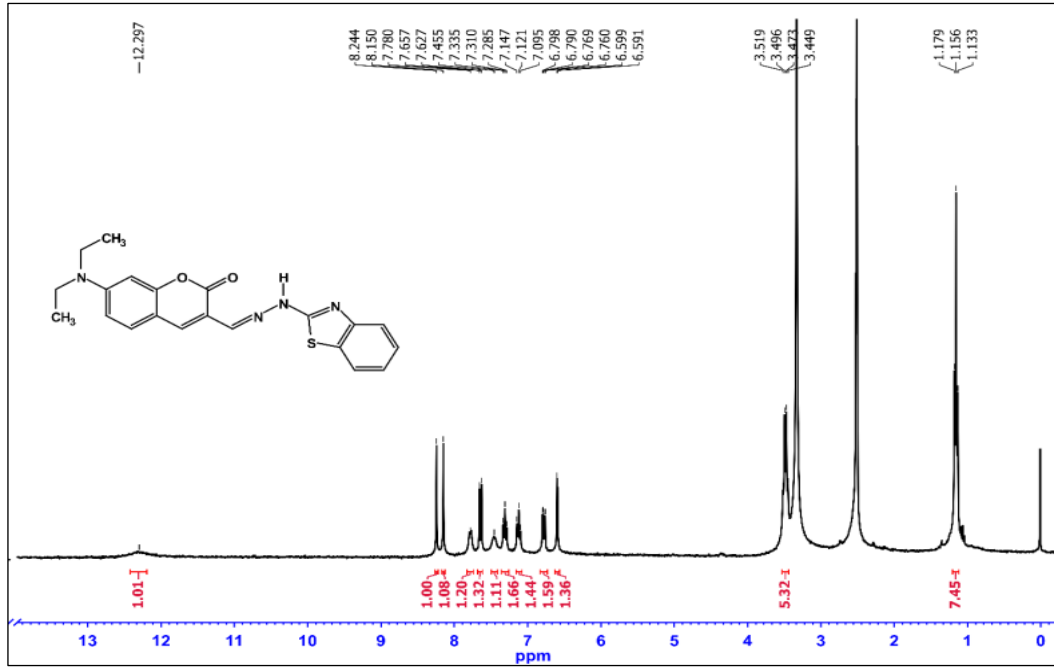
Zhu, C., Zheng, H., Li, D., Li, S., Xu, J., Fluorescence quenching method for the determination of sodium dodecyl sulphate with near-infrared hydrophobic dye in the presence of Triton X-100. *Spectrochimica Acta Part A*, 60(13), 3173-3179, **2004**.

## EKLER

### EK 1. HZC türevine ait spektrumlar

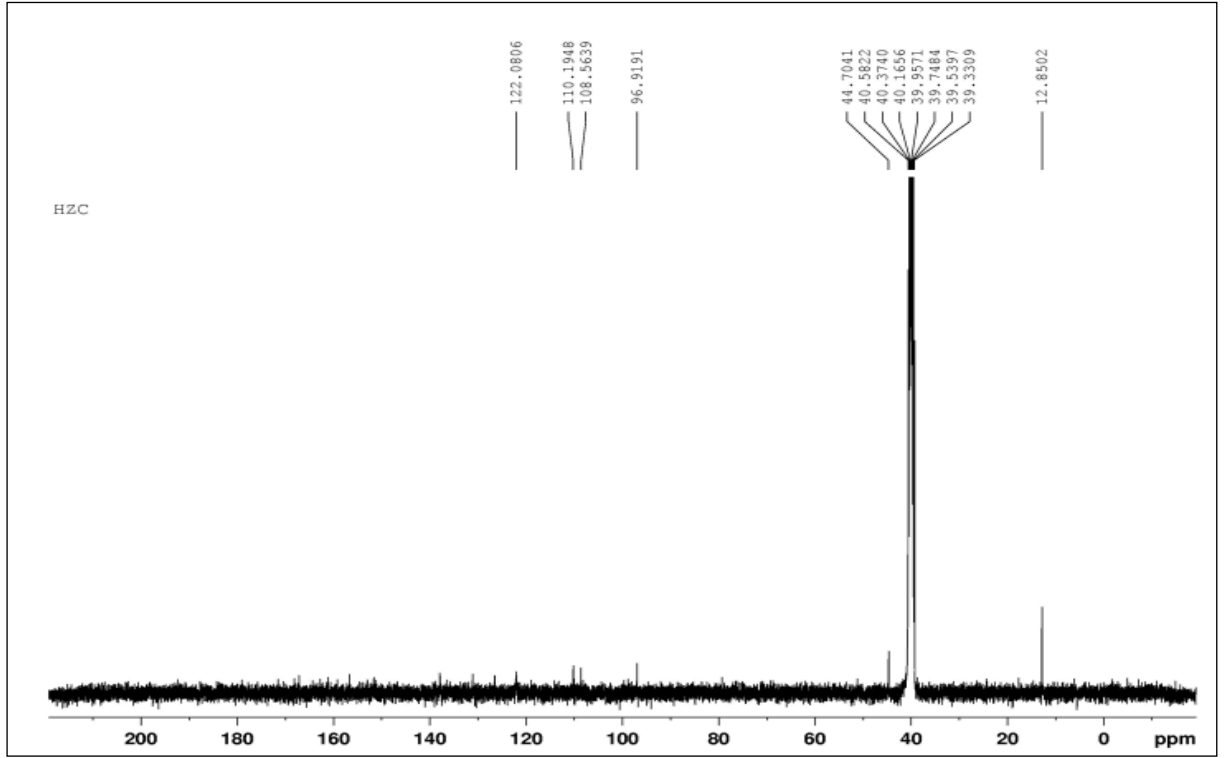


Şekil 1. HZC nin FTIR spektrumu.

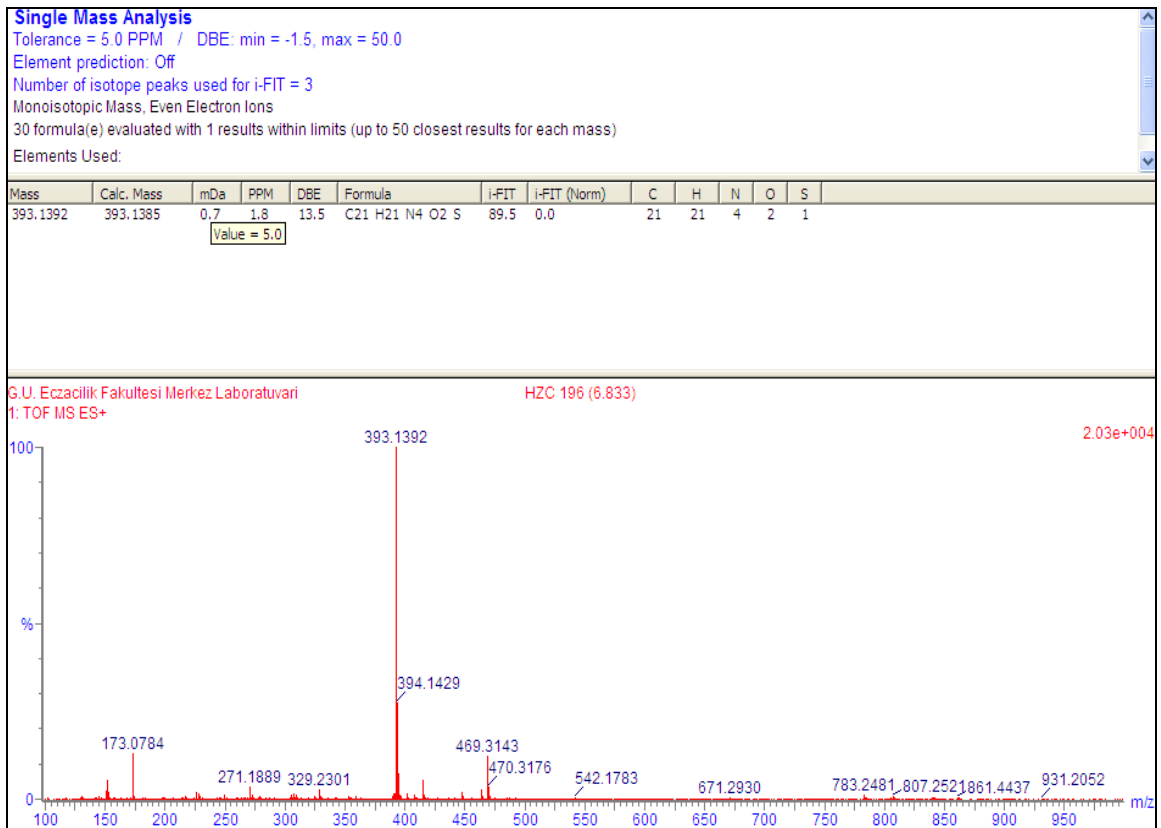


Şekil 2. HZC nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.

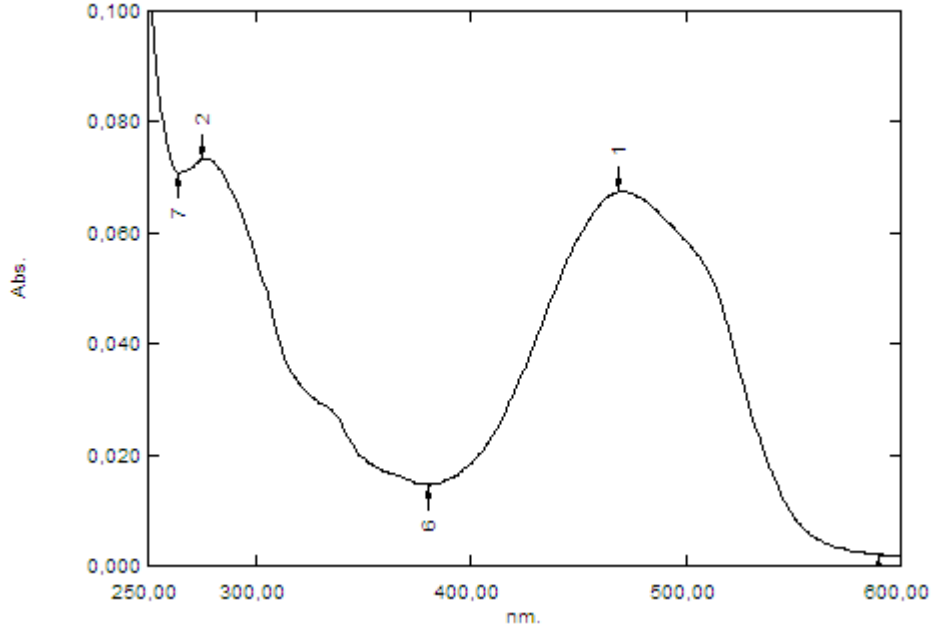




Şekil 3. HZC' nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.



Şekil 4. HZC nin HR-MS spektrumu



Şekil 5.  $2 \times 10^{-6}$  M HZC nin UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumu

## EK 2 - Moleküler kenetlenme verileri ve sonuçları

Çizelge 1. HZC'nin pepsin ile oluşturduğu kompleksinde etkileşim türleri ve uzaklıkları.

HZC-Pepsin Etkileşimleri	Mesafe (Å)	Bağ	Bağ Türü	Pepsin'in Bağlanma Bölgesi	HZC'nin Bağlanma Bölgesi
:HZC:H34-A:THR77:O	2.1900	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:THR77:O	:HZC:H34
A:GLY109:HA1-:HZC:N20	2.4800	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:GLY109:HA1	:HZC:N20
:HZC:H7- A:GLY217:O	2.9000	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:GLY217:O	:HZC:H7
:HZC:H12- A:ASP32:OD2	2.51279	Hidrojen bağı	Karbon-Hidrojen Bağı	A:ASP32:OD2	:HZC:H12
A:PHE111:HN- :HZC	2.68534	Hidrojen bağı	Pi-Donor Hidrojen bağı	A:PHE111:HN	:HZC
B:GLN121:HN- :HZC	3.01485	Hidrojen bağı	Pi-Donor Hidrojen bağı	B:GLN121:HN	:HZC
B:GLU119:HA- :HZC	2.28369	Hidrofofik	Pi-Sigma	B:GLU119:HA	:HZC
A:PHE111- :HZC	5.73875	Hidrofofik	Pi-Pi istiflenmiş	A:PHE111	:HZC
:HZC- A:PHE111	4.97518	Hidrofofik	Pi-Pi istiflenmiş	A:PHE111	:HZC
A:TYR75 - :HZC	5.29627	Hidrofofik	Pi-Pi T-şeklinde	A:TYR75	:HZC
:HZC:C27- A:ILE30	3.42628	Hidrofofik	Alkil	A:ILE30	:HZC:C27
:HZC:C27-A:ILE120	3.29268	Hidrofofik	Alkil	A:ILE120	:HZC:C27
:HZC- A:ILE120	5.43361	Hidrofofik	Pi-Alkil	A:ILE120	:HZC
:HZC-A:LEU112	5.01470	Hidrofofik	Pi-Alkil	A:LEU112	:HZC

**Çizge 2.** HZC'nin HSA ile oluşturduğu kompleksinde etkileşim türleri ve uzaklıkları.

Etkileşimler	Mesafe (Å)	Bağ	Bağ türü	HSA'nın Bağlanma bölgesi	HZC'nin bağlanma bölgesi
A:LYS199:HZ1-HZC:O11	1.91733	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:LYS199:HZ1	HZC:O11
A:LYS199:HE2-HZC:O11	2.67131	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:LYS199:HE2	HZC:O11
A:LYS199:HE2-HZC:N20	2.95395	Hidrojen bağı	Hidrojen Bağı	A:LYS199:HE2	HZC:N20
HZC:S17 - A:TRP214	3.90915	Diğer bağlar	Pi-Sülfür	A:TRP214	HZC:S17
HZC:S17 - A:TRP214	4.09029	Diğer bağlar	Pi-Sülfür	A:TRP214	HZC:S17
A:TRP214 - HZC	3.89246	Hidrofobik	Pi-Pi istiflenmiş	A:TRP214	HZC
A:TRP214 - HZC	4.49831	Hidrofobik	Pi-Pi istiflenmiş	A:TRP214	HZC
A:TRP214 - HZC	4.4805	Hidrofobik	Pi-Pi istiflenmiş	A:TRP214	HZC
HZC - A:TRP214	3.47168	Hidrofobik	Pi-Pi istiflenmiş	A:TRP214	HZC
A:HIS242 - HZC	4.28253	Hidrofobik	Pi-Pi T-şeklinde	A:HIS242	HZC
A:ALA291 - HZC:C25	4.14166	Hidrofobik	Alkil	A:ALA291	HZC:C25
A:ALA291 - HZC:C26	4.03941	Hidrofobik	Alkil	A:ALA291	HZC:C26
HZC:C25 - A:LEU238	5.46866	Hidrofobik	Alkil	A:LEU238	HZC:C25
HZC:C26 - A:ILE290	4.40906	Hidrofobik	Alkil	A:ILE290	HZC:C26
HZC - A:LEU238	4.3996	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:LEU238	HZC
HZC - A:ALA291	4.1363	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:ALA291	HZC
HZC - A:LEU238	5.46479	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:LEU238	HZC
HZC - A:ALA291	5.27613	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:ALA291	HZC
HZC - A:LYS199	4.0545	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:LYS199	HZC
HZC - A:LEU198	4.95505	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:LEU198	HZC
HZC - A:LYS199	4.84377	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:LYS199	HZC