





**YENİ SENTEZLENMİŞ KATYONİK STİRİL BOYANIN  
BİYOMOLEKÜLLERLE ETKİLEŞİMİNİN  
SPEKTROSKOPİK VE MOLEKÜLER KENETLENME  
METOTLARI İLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF INTERACTION OF A NOVEL  
CATIONIC STYRYL DYE WITH BIOMOLECULES BY  
SPECTROSCOPIC AND MOLECULAR DOCKING  
METHODS**

**BENSU DOYURAN**

**PROF. DR. ELMAS GÖKOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.





*Aileme,*











## ÖZET

# YENİ SENTEZLENMİŞ KATYONİK STİRİL BOYANIN BİYOMOLEKÜLLERLE ETKİLEŞİMİNİN SPEKTROSKOPİK VE MOLEKÜLER KENETLENME METOTLARI İLE İNCELENMESİ

**Bensu DOYURAN**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU**

**Mayıs 2022, 66 sayfa**

Tez çalışmasında (E)-2-(4-(dibütilamino)stiril)-1,3,3-trimetil-3H-indol-1-yum iyodür (Ci5) olarak verilen yeni katyonik stiril boya sentezlenmiştir ve spektral özellikleri karakterize edilmiştir. Ci5 bileşiğinin, proteaz enzimleri olan tripsin ile pH 7.4, pepsin ile pH 2.0 tampon ortamında etkileşimleri çoklu spektroskopik (floresans, absorpsiyon, FTIR ve CD) ve moleküler kenetlenme yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca Ci5-DNA arasındaki etkileşim ise spektroskopik yöntemle incelenmiştir ve bağlanmanın, oluk türü bağlanma olduğu sonucuna varılmıştır. Florimetrik çalışmalarda, floresans sönümden elde edilen verilerden Ci5 bileşiği ile pepsin/tripsin etkileşiminin statik sönüm mekanizması ile gerçekleştiği ve bu etkileşimin kompleks oluşumuna dayandığı sonucuna varılmıştır. Bağlanma türleri ve özellikleri farklı sıcaklıklarda elde edilen termodinamik parametrelere ( $\Delta H$  ve  $\Delta S$ ) dayanarak açıklanmıştır. Pozitif  $\Delta S$  ve negatif  $\Delta H$  parametreleri, Ci5 ile pepsin etkileşiminde hem elektrostatik kuvvetlerin hem de hidrofobik etkileşimlerin rolü olduğu sonucunu göstermiştir. Negatif  $\Delta S$  ve negatif  $\Delta H$  değerleri, Ci5'in tripsin ile etkileşiminde van der Waals kuvvetlerinin ve hidrojen bağlarının varlığını göstermiştir. FTIR çalışmaları, pepsin/tripsinin amid bantlarında

oluşan kaymalar nedeniyle, boya ile enzimler arasında etkileşimin varlığına işaret etmiştir. Ayrıca CD sonuçları, Ci5 in pepsin/tripsine bağlanmasında, enzim heliks yapısının kararlılığının azalması ile sekonder yapıda konformasyonel değişiklik meydana geldiğini göstermiştir.

Förster teorisine göre, donör-akseptör molekül çiftleri arasındaki uzaklık ( $r$ ) Ci5-pepsin çiftinde 3.53 nm, Ci5-tripsin çiftinde ise 3.27 nm olarak bulunmuştur. Boya/enzim çiftleri arasında rezonans enerji aktarımının ışısız yolla oluştuğu sonucuna varılmıştır. Deneysel sonuçlar, moleküler kenetlenmeden elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır ve desteklenmiştir. Moleküler kenetlenme sonuçları, Ci5'in pepsin/tripsinin belli amino asit uçları ile ve DNA'nın nükleotitleri ile bağlandığını göstermiştir. Ayrıca bağlanma kuvvetleri ve bağ mesafeleri hesaplanmıştır.

Ci5'in pepsin ve tripsin varlığındaki tayini için elde edilen analitik verilere göre gözlenebilirlik sınırı (LOD); pepsin varlığında  $1.324 \times 10^{-5}$  M ve tripsin varlığında ise  $4.238 \times 10^{-6}$  M'dır. Tayin sınırı (LOQ) ise pepsin varlığında  $4.414 \times 10^{-5}$  M ve tripsin varlığında  $1.413 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Stiril boya, termodinamik parametreler, proteaz enzimi, moleküler kenetlenme, floresans sönüm, FRET, tripsin, pepsin.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF INTERACTION OF A NOVEL CATIONIC STYRYL DYE WITH BIOMOLECULES BY SPECTROSCOPIC AND MOLECULAR DOCKING METHODS**

**Bensu DOYURAN**

**Master of Science, Department of Chemistry**

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

**May 2022, 66 pages**

In this thesis, a novel cationic styryl dye given as (E)-2-(4-(dibütülamino)stiril)-1,3,3-trimetil-3H-indol-1-yum iyodür (Ci5) was synthesized and its spectral properties were characterized. The interactions of the Ci5 compound with the protease enzymes trypsin at pH 7.4 and pepsin at pH 2.0 in buffer solutions were studied by multiple spectroscopic (fluorescence, absorption, FTIR and CD) and molecular docking methods. In addition, the interaction between Ci5-DNA was analyzed in a spectroscopic methods and groove binding was observed. In fluorimetric studies, it was concluded from the data obtained from fluorescence quenching that the interaction of pepsin/trypsin with the Ci5 compound occurs by static quenching mechanism. It has shown that the interaction between the Ci5 compound and the enzymes is based on complex formation. The type of binding and its

properties are described based on the thermodynamic parameters ( $\Delta H$  ve  $\Delta S$ ) obtained at different temperatures. The positive  $\Delta S$  and negative  $\Delta H$  parameters indicated that both electrostatic forces and hydrophobic interactions also have a role in the interaction of Ci5 and pepsin. Negative  $\Delta S$  and negative  $\Delta H$  values indicated the presence of van der Waals forces and hydrogen bonds in the interaction of trypsin with Ci5. The shifts in the amide bands of pepsin/trypsin in FTIR studies indicated the presence of interaction between the dye and the enzyme. And also CD results indicated that the binding of Ci5 to pepsin/trypsin caused to secondary structure changes of enzymes, with the loss of helical stability.

According to Forster theory, the distance ( $r$ ) between donor-acceptor molecular pairs was found as 3.53 nm in the Ci5-pepsin pair and 3.27 nm in the Ci5-trypsin pair. It was concluded that resonance energy transfer between dye/enzyme pairs occurs in a non-radiation way. The obtained experimental data were supported and validated by molecular docking results. In view of on the molecular docking data, it was concluded that the pepsin/trypsin of Ci5 binds to certain amino acid residues and to the nucleotides of DNA. In addition, binding energy and bond distances were calculated.

The analytical data obtained for the determination of Ci5 in the presence of pepsin and trypsin, the limit of dedection (LOD) is  $1.324 \times 10^{-5}$  M in the presence of pepsin and  $4.238 \times 10^{-6}$  M in the presence of trypsin. The limit of quantification (LOQ) was calculated as  $4.414 \times 10^{-5}$  M in the presence of pepsin,  $1.413 \times 10^{-5}$  M in the presence of trypsin.

**Keywords:** Styryl dye, thermodynamic parameters, protease enzyme, moleculer docking, fluorescence quenching, FRET, trypsin, pepsin.

## TEŞEKKÜR

Lisans dönemim ve yüksek lisans tez çalıŐmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her daim desteğini ve ilgisini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Elmas GöKOğLU'na verdiği emekten dolayı sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İlgili ana madde sentezinde ve deneysel çalışmalar sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Zeynel SEFEROğLU'na teŐekkürlerimi sunarım. Moleküler kenetlenme çalışma sonuçları ve değerlendirmeleri için Doç. Dr. Tuğba TAŐKIN TOK'a teşekkür ederim. Tez çalıŐmamdaki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Erhan KARACA'ya teşekkür ederim.

Beni sonsuz emekleri ile bugünlere getiren, aldığım bütün kararlarda yanımda olan, bana her zaman destek olan ve hayatım boyunca beni koŐsulsuz seven sevgili babam Kemal DOYURAN'a, sevgili annem Süreyya DOYURAN'a, canım ablam Begüm CORA'ya ve eniŐtem Oğuz CORA'ya tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve desteğini hissettiren canım arkadaŐımlarım Gamze TAVLAŐOęLU ve Begüm DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

# 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 yöntemler.....	3
2.1.1. Floresan uçlar ve özellikler.....	5
2.1.2. Floresans sönüm yöntemi.....	6
2.1.3. Bağlanma türlerinin belirlenmesi.....	7
2.2. Floresans rezonans enerji transferi (FRET).....	8
2.3. Proteinler ve özellikleri.....	10
2.3.1. Protein-ligand etkileşim çalışmaları.....	12
2.4. Proteaz enzimleri.....	12
2.4.1. Pepsin ve özellikleri.....	13
2.4.2. Tripsin ve özellikleri.....	14
2.5. DNA ve özellikleri.....	14
2.6. Stiril boyalar.....	16
2.7. Moleküler kenetlenme analizi.....	18
2.8. FTIR Spektroskopisi .....	19
2.9. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi .....	20



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	22
3.1. Stiril indolyum boyanın (Ci5) elde edilmesi ve spektral özellikleri.....	22
3.2. Kullanılan kimyasallar.....	23
3.3. Kullanılan enstrümantal aletler.....	23
3.4. Floresans çalışmalar.....	23
3.5. Absorpsiyon çalışmaları.....	24
3.6. FTIR çalışmaları.....	24
3.7. CD çalışmaları.....	24
3.8. Moleküler kenetlenme çalışmaları.....	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	26
4.1. Ci5 ile enzim etkileşiminde florimetrik çalışmalar.....	26
4.1.1. Ci5-enzim etkileşimine ait bağlanma türlerinin bulunması .....	30
4.1.2. Ci5-pepsin ve Ci5-tripsin çiftlerinin FRET çalışmaları .....	32
4.1.3. FTIR çalışmaları .....	34
4.1.4. Dairesel dikroizm (CD) çalışmaları.....	36
4.1.5. Ci5 için pepsin/tripsin ortamında elde edilen analitik sonuçlar .....	38
4.1.6. Ci5-pepsin/tripsin etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları.....	39
4.1.7. Ci5-DNA etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları.....	41
4.1.8. Ci5-pepsin/tripsin/DNA moleküler kenetlenme çalışmaları.....	43
5. YORUM.....	47
KAYNAKLAR.....	50
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	66

# ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa

Şekil 2.1. Jablonski diyagramı (Lacowicz, 2006).....	4
Şekil 2.2. Uyarılmış donörden (D*) alıcıya (A) ışımaz olarak enerji aktarımını gösteren şema (Sahoo, 2011).....	8
Şekil 2.3. Moleküller arası enerji aktarımı .....	9
Şekil 2.4. Molekül içi enerji aktarımı.....	9
Şekil 2.5. Pepsin (a) ve tripsin (b) üç boyutlu yapısı.....	14
Şekil 2.6. DNA'nın üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 2.7. Bir molekülün DNA'ya oluk (a, b) ve interkelasyon (c) bağlanma şekilleri...	16
Şekil 2.8. İki moleküler kenetlenme modeli. (a) Bir kilit ve anahtar modeli, (b) indüklenen-fit modeli.....	19
Şekil 3.1. Ci5 bileşiğinin sentezlenme şeması.....	22
Şekil 4.1. (a) $2.5 \times 10^{-6}$ M pepsin (pH 2.0) ve (b) $5.0 \times 10^{-6}$ M tripsin (pH 7.4) çözeltileri üzerine artan derişimlerde Ci5 eklenerek elde edilen floresans spektrumları). $\lambda_{uy}=280$ nm ve oda sıcaklığı, Ci5 derişim aralığı: 0, 2.38, 4.75, 7.11, 9.46, 11.8, 14.1, 16.5, 18.8, 21.1, 23.4, 25.7, 28.0 ( $\times 10^{-6}$ M).....	27
Şekil 4.2. $2.5 \times 10^{-6}$ M pepsin (a) ve $5.0 \times 10^{-6}$ M tripsin (b) ile Ci5 etkileşiminde Stern-Volmer grafikleri.....	28
Şekil 4.3. (a) $2.5 \times 10^{-6}$ M pepsin ve (b) $5 \times 10^{-6}$ M tripsin ile Ci5 bağlanması için oluşturulan çift logaritma grafikleri.....	29
Şekil 4.4. (a) Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimine ait van't Hoff grafikleri ve (b) elde edilen termodinamik parametrelerin gösterimi.....	31
Şekil 4.5. (a) $2.5 \times 10^{-6}$ M pepsinin floresans spektrumu ile (b) $2.5 \times 10^{-6}$ M Ci5'in absorpsiyon spektrumunun örtüşmesi (pH 2.0, 298 K).....	33
Şekil 4.6. (a) $5.0 \times 10^{-6}$ M tripsinin floresans spektrumu ile (b) $5.0 \times 10^{-6}$ M Ci5'in absorpsiyon spektrumunun örtüşmesi (pH 7.4, 298 K) .....	34

<b>Şekil 4.7.</b> Ci5'in (a) pepsin ve (b) tripsin ile etkileşimini gösteren FTIR spektrumları....	35
<b>Şekil 4.8.</b> $2.08 \times 10^{-6}$ M pepsin ve pepsin-Ci5 (1:1) pH:2.0 (a); $2.08 \times 10^{-6}$ M tripsin ve tripsin-Ci5 (1:1) pH: 7.4'de (b) elde edilen CD spektrumları.....	37
<b>Şekil 4.9.</b> Ci5 ile pepsin etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları (1:1), (a) $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5, (b) $1.0 \times 10^{-5}$ M pepsin, (c) $1.0 \times 10^{-5}$ M - $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5-pepsin karışımı.....	40
<b>Şekil 4.10.</b> Ci-5 ile tripsin etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları (1:1), (a) $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5, (b) $1.0 \times 10^{-5}$ M tripsin, (c) $1.0 \times 10^{-5}$ M - $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5-tripsin karışımı.....	41
<b>Şekil 4.11.</b> $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5 (spektrum b) ile DNA etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen DNA derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 6.0; 12.0; 17.9; 23.8; 29.7 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a: $1.0 \times 10^{-5}$ M DNA).....	42
<b>Şekil 4.12.</b> $1.0 \times 10^{-5}$ M DNA (spektrum b) ile Ci5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen Ci5 derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 2.38; 4.75; 7.11; 9.46; 11.8 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a: $1.0 \times 10^{-5}$ M Ci5).....	42
<b>Şekil 4.13.</b> Ci5 bileşığının HOMO ve LUMO orbitalleri (sol tarafta), moleküler elektrostatik potansiyel yüzey (MEPS) haritasının (sağ tarafta) gösterimi....	44
<b>Şekil 4.14.</b> Pepsinin bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşığının (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.....	45
<b>Şekil 4.15.</b> Tripsinin bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşığının (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.....	45
<b>Şekil 4.16.</b> DNA'nın bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşığının (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 4.1.</b> Ci5/pepsin-tripsin etkileşiminden elde edilen Stern-Volmer parametreleri.....	29
<b>Çizelge 4.2.</b> Ci5/enzim etkileşiminden elde edilen çift logaritma eşitliği, $K_a$ ve n değerleri.....	30
<b>Çizelge 4.3.</b> Ci5'in pepsin ve tripsin etkileşiminden bulunan $\Delta H$ , $\Delta G$ ve $\Delta S$ değerleri.....	32
<b>Çizelge 4.4.</b> Ci5-pepsin/tripsin etkileşiminde Förster rezonans enerji transfer parametreleri.....	34
<b>Çizelge 4.5.</b> 208 nm de, Ci5 varlığında ve yokluğunda enzimlerin $\alpha$ -heliks içerikleri....	37
<b>Çizelge 4.6.</b> Enzim ortamında Ci5 tayini için bulunan analitik veriler.....	39
<b>Çizelge 4.7.</b> Ci5-pepsin/tripsin/DNA ile bağlanma enerjileri.....	46

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\Delta H$	Entalpi değişimi
$\Delta G$	Gibbs Serbest Enerji değişimi
$\Delta S$	Entropi değişimi
Ci5	( <i>E</i> )-2-(4-(dibütülamino)stiril)-1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-yum iyodür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
CD	Dairesel Dikroizm (Circular Dicroism)
UV	Ultraviyole
DNA	Deoksiribonükleik asit
$K_{sv}$	Stern-Volmer Sönüm Sabiti
$R_0$	% 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 organizmada yapı, oluşum, işlev gibi yaşamsal olayları düzenleyen yapıtaşlarıdır. Enzimler, kimyasal tepkimelerin hızını arttıran biyolojik katalizör olarak adlandırılan biyomoleküllerdir, hemen hemen tüm enzimler protein yapısındadır. Proteinler ise canlı organizmalardaki çok yönlü makromoleküller olup tüm biyolojik süreçlerde önemli fonksiyonlarda rol oynarlar ve hücrelerin hem içindeki hem de dışındaki hasarın ana hedefini oluştururlar. Sıcaklık, pH, çevresel kirleticiler (organik kirleticiler, ağır metaller, nano-materyaller, vb.) protein konformasyonunun değişmesine ve denatürasyonuna neden olan etkenlerdir (Liu et al. 2009). Örneğin, yeni ilaç dizaynı/gelişimi ve biyolojik sistem üzerine etkileri, hücresel süreçlerdeki mekanizmaların açıklanması gibi oldukça önemli bilgiler edinilmektedir. Bu etkileşimler, floresans spektroskopisi, UV-görünür absorpsiyon spektroskopisi, dairesel dikroizm, kütle spektroskopisi, küçük açılı X-ışını saçılması, floresans mikroskopu ve manyetik rezonans dahil olmak üzere çeşitli spektroskopik tekniklerle incelenmektedir. Elde edilen sonuçlardan; protein-ligand etkileşimindeki bağlanma, ayrışma, bağlanma nedeni ile proteinde oluşan konformasyonel değişiklikler, kinetik ve termodinamik parametrelerin elde edilmesi ile birçok konu açıklanabilmektedir (Rahman and Choudhary, 2020).

Floresans spektroskopisi, biyomolekül ile küçük ligand molekülleri arasındaki etkileşimlerin incelendiği önemli yöntemlerden biridir. Floresans sönüm (quenching) yöntemi kullanılarak, protein-ligand arasındaki etkileşim çalışmalarında, protein floresans şiddetinin azalması temeline dayalı olarak bağlanma özellikleri açıklanmaktadır. Böylece yeni sentezlenen türlerin floresan uç, boya, ilaç etken maddesi olarak dizayn edilmektedir. Özellikle ilaçların etki mekanizmaları, yan etkileri ve biyomoleküllerle bağlanma özellikleri son yıllarda detaylı bir şekilde çalışılmaktadır. Başta nükleik asitler ve protein olmak üzere literatürde biyokimyasal çalışmalar için elektrokimya, kromatografi, ışık saçılması, spektrofotometri ve kemiluminesans gibi yöntemler önerilmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda florimetrik yöntemlerle ve özellikle biyolojik etiketleme reaktifleri, boyalar ve ilaç etken maddeleri ile yapılan çalışmalarda büyük bir artış görülmektedir. Florimetrik yöntemle protein yapısındaki bir biyomolekülün çalışılabilmesi için, proteinin yapı taşı olan aminoasit uçların aromatik özellik göstermesi gerekir. Bunun yanında floresans özelliği oldukça az olan DNA'nın spektroskopik yöntemlerle direkt olarak bağlanma, etkileşim özelliklerinin incelemesi sınırlıdır. Son yıllarda DNA araştırmalarında; boyar maddeler, ilaç etken maddeleri,

metal iyonları ve metal komplekslerinin ligand olarak DNA ile bağlanma mekanizmaları incelenmiştir (Bi et al. 2008; Moradi et al. 2018). Floresans şiddette ve spektrumdaki değişiklikler izlenmektedir. Böylece DNA'nın bu yapılarla kovalent veya kovalent olmayan etkileşim türleri açıklanabilmektedir. Ayrıca protein/DNA çalışmalarından elde edilen sonuçlar moleküler kenetleme yöntemi ile teorik olarak desteklenmektedir (Geng et al. 2013).

Stiril boyaları,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-$  ile karakterize edilen polimetin boyaları grubuna ait olup asimetrik yapıya sahiptir; farklı fonksiyonel grupların yapıya bağlanması ile çözünürlükleri artabilir ve optik, termal, elektronik özellikleri değişebilir. Çeşitli stiril boyaların sentezi üzerine deneysel ve teorik özelliklerinin incelendiği çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bu boyaların fotoğrafçılıkta, optik ve floresan malzemelerde duyarlaştırıcı olarak uygulamaları ve diğer çeşitli alanlarda, örneğin boyaya duyarlı güneş pillerinde ve doğrusal olmayan optik özelliklere sahip boyalarda kullanımları önemini arttırmaktadır. Ayrıca biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir grubunu temsil ederler, ilaç endüstrisinde ve hücre biyolojisinde uygulanmaktadır (Vasilev et al. 2008). Stiril boyalar analitik kimyada, inorganik ve organik bileşiklerin belirlenmesinde reaktif olarak kullanılırlar. Ayrıca analitik kimyada amiloid sensörleri olarak veya  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  kationlarının belirlenmesinde kullanılırlar. N,N-dialkilamino-stiril boyalar, peroksidaz için spesifik ve yüksek oranda floresan substratlar olarak da kullanılabilirler, bu nedenle histokimya ve immünohistokimyada çeşitli uygulamalara sahiptirler (Leskova et al. 2013). Tez çalışması kapsamında sentezlenen ((E)-2-(4-(dibütilamino)stiril)-1,3,3-trimetil-3H-indol-1-iyodür) yeni bir katyonik stiril boyanın proteaz enzimleri olan pepsin/tripsin ve DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Enzim etkileşimleri için floresans, UV-görünür absorpsiyon, FTIR ve dairesel dikroizm (CD) spektroskopik yöntemler kullanılmıştır. Stern-Volmer eşitliğinden, bağlanma sabitleri, bağlanma sayıları ve sönüm sabitleri bulunmuştur. van't Hoff eşitliği kullanılarak farklı sıcaklıklarda termodinamik parametreler ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  ve  $\Delta G$ ) hesaplanmıştır. Enzim ve boya arasındaki uzaklıklar floresans rezonans enerji transferi (FRET) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir ve bu yapılar arasında ışımsız enerji aktarımının olduğu açıklanmıştır. DNA etkileşimleri absorpsiyon yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca C15'in pepsin/tripsin ve DNA ile olan bağlanma çalışmaları moleküler kenetlenme adı verilen hesaplamalı yöntem ile karşılaştırılmıştır ve desteklenmeye çalışılmıştır.

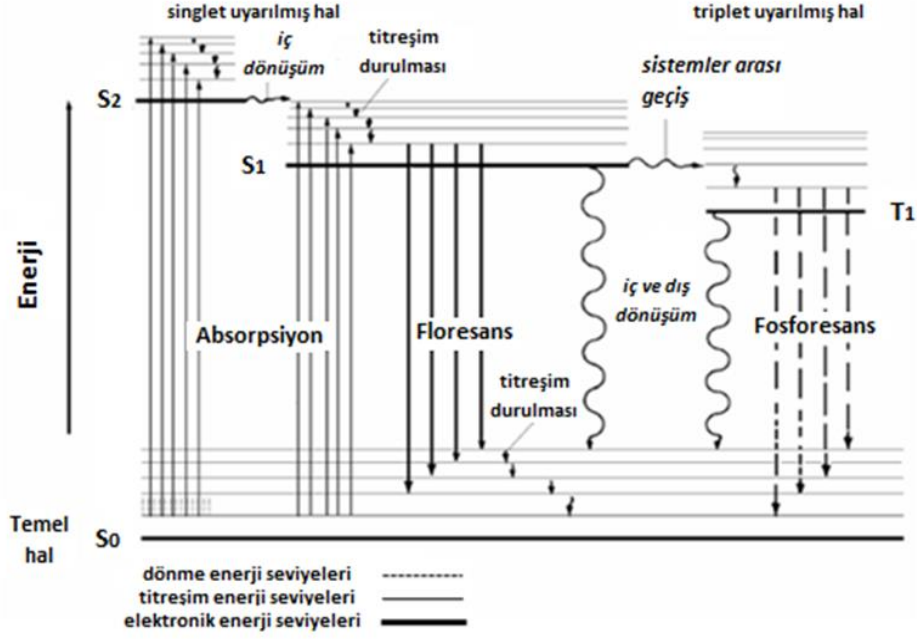
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Floresans yöntemler

Uyarılan atom veya molekül fazla enerjisini atarak temel hale döner. Fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık halinde yayar ve oluşan emisyonu *lüminesans* denir. İncelenen türün uyarılma şekline göre lüminesans yöntemlere farklı adlandırmalar yapılmaktadır. Fotolüminesans olarak bilinen floresans ve fosforesans, foton absorpsiyonu ile uyarılmaktadırlar. Singlet-triplet enerji farkları, moleküler oksijen etkisi, pH, çözücünün viskozitesi fotolüminesans olayları etkileyen faktörlerdir. Uyarılma enerjisi bir kimyasal reaksiyondan sağlanıyorsa izlenen emisyonu *kemilüminesans* denir. Kemilüminesans ve fotolüminesans yöntemlerde ışık şiddetinin ölçülmesi, eser miktardaki anorganik veya organik türlerin tayininin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Elektrolüminesans ve elektrokemilüminesans gibi kemilüminesans yöntemlerinde uyarılma için gerekli enerji bir elektrot tepkimesinden sağlanır. Fotolüminesans yöntemler, geniş doğrusal çalışma aralığına sahip olmaları, düşük gözlenebilme sınırları ile absorpsiyon spektroskopik yöntemlerden bin kat daha fazla üstünlüğe sahiptirler (Skoog et al. 2013). Termolüminesans, sistem ısıtılarak uyarıldığında gözlenen lüminesans olaydır. Ateş böcekleri, bazı deniz canlılarında görülen biyolüminesans ise canlı bir organizma içinde meydana gelen reaksiyon sonucu çıkan enerjinin, ışık şeklinde canlı tarafından yayılması olayıdır.

[Şekil 2.1](#) de Jablonski diyagramında gösterildiği gibi; *floresans*, uyarılmış  $S_1$  seviyesinin en düşük titreşim seviyesinden,  $S_0$  temel halin titreşim seviyelerinden herhangi birine ışık yayarak dönmesi olayıdır. *Fosforesans* ise sistemlerarası geçiş sonrası uyarılmış  $T_1$  seviyesinin en düşük titreşim seviyesinden,  $S_0$  temel halin titreşim seviyelerinden herhangi birine ışık yayarak dönmesi olayına denir. Fosforesans olayda gözlenen dalgaboyları floresansta gözlenen dalgaboyundan daha uzundur, enerjisi daha düşüktür. Fosforesansta elektronik enerji geçişlerinde elektron spini değiştiği için uyarılmış hallerin ömrü, daha uzun olup saniyeler, dakikalar mertebesinde olabilir, floresansta uyarılmış halin ömrü ( $< 10^{-5}$  s) daha kısadır. *Rezonans floresans*, molekül veya atomu uyaran ışığın dalga boyuna eşit dalga boyunda emisyon yapması olayına denir. *Stokes kayması*, moleküllerin uzun dalgaboylarına ve düşük enerjilere kayması durumudur (Skoog et al. 2013).





Şekil. 2.1. Jablonski diyagramı (Lacowicz, 2006).

Floresans yöntemler en önemli nicel analiz tekniklerindedir. Hassasiyeti ve seçiciliği nedeniyle normal fotometrik yöntemlerden tartışılmaz üstünlüğe sahiptir. Floresans ölçümlerdeki seçicilik iki ana nedenle açıklanabilir. Birincisi; her kimyasal yapı floresans göstermez. Ancak bu özellik analize bir avantaj getirir. Her floresan madde ışığı absorplar. Ancak her absorpsiyon gösteren madde floresan değildir. İkincisi ise, iki farklı dalga boyu ayarı yapılarak seçicilik artırılır. Eğer aynı uyarılma dalga boyunda floresans gösteren yapılar varsa emisyon dalga boyları arasında 10 nm kadar farklılık konarak yeterli seçicilik sağlanabilir. Sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi doğrudan çözeltiliye bağlı birçok parametre ölçülen floresansı değiştirebilir. Bir molekülde parçalanma, bozulma gibi benzer fotokimyasal reaksiyonlar floresansı etkiler. Bu nedenle çalışma çözeltileri karanlıkta saklanması gerekir. Ortamın viskozitesi artırılırsa moleküler çarpışmalar azalacağı için izlenen floresans bağlı olarak artar. Çözelti içinde çözülmüş oksijen molekülünün varlığı floresansta azalmaya neden olur. Bu nedenle ölçümlerde oksijenin etkisini azaltmak için ortamdaki azot gazı geçirilir. Derişik çözeltilerde çalışmak floresans yöntemlerinde iç filtre etkisi yaratmaktadır. Bu nedenle daha seyreltik ortamlarda çalışmak avantajlıdır. Molekülde veya bulunduğu ortamda ağır atom var ise (I, Br gibi) sistemlerarası geçişi arttıracığı için floresans verimi azalır, tersine fosforesans verimi artar (Lacowicz, 2006).

### 2.1.1. Floresan uçlar ve özellikleri

Floresan işaretleme (labeling) genellikle, bir floresan ucun biyomolekül ile etkileşimi veya bağlanması sonucu meydana gelir. *İşaretleme*, radyoaktif maddeler veya elektromanyetik spektrumun UV-yakın IR bölgesine kadar absorpsiyon veya floresans içeren bileşiklerle gerçekleştirilen en yaygın yöntemlerden biridir (Gonçalves, 2009). Proteinler, antikolar, amino asitler ve peptitler gibi biyomoleküllerin takibinde bir sensörle etiketlemeye ihtiyaç duyulur. Günümüzde, izotop işaretleyicileri, radyoaktif izleyiciler, kolorimetrik biyosensörler, fotokromik bileşikler, elektrokimyasal sensörler ve floresan uçların yer aldığı çeşitli işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır. Floresan işaretleme yöntemi ile düşük hacimde çalışılma, seyreltik çözeltilerin kullanılması, floresans yöntemin yüksek hassasiyeti, ayrıca incelenen biyomoleküle zarar vermemesi nedeniyle diğer yöntemlere göre üstünlük gösterir. Floresans işaretleme yöntemi ile çalışırken bazı özellikler göz önüne alınmalıdır. Örneğin;

- İşaretleme tepkimesi yüksek verimde ve hedef moleküle uyarlanabilir olmalıdır.
- Seçilen uçların kimyasal boyutları küçük ve kararlı olması gerekir.
- Floresan uçlar/ biyomolekül etkileşiminde minimum girişim olmalıdır.
- Floresan uçlar/ biyomolekül etkileşiminde kovalent bağ tercih edilir.

Yeni sentezlenen sentetik floresan maddeler işaretleme yönteminin özelliğine göre çeşitli fonksiyonel gruplarla türevlendirilebilmeleri nedeniyle farklı işlevlere ve özelliklere sahip olmaktadır. İyi fotostabiliteye ve yüksek floresan kuantum verimine sahip çok çeşitli uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip olsalar bile, bazı durumlarda bu sentetik uçlar hücre görüntüleme deneylerinde kullanılmamaktadır. Bunun nedeni floresan ucun hücrede toksik etki yapmasından kaynaklanmaktadır (Sahoo, 2012). Floresan işaretleme, yarı iletken nanokristaller, floresan proteinler veya organik moleküller kullanılarak geniş bir dalga boyu aralığına yayılabilir. Organik floroforlar, analiz edilecek numuneyle kovalent veya kovalent olmayan bağlar oluşturabilirler. İşaretleme için kullanılan floresan uçlar aşağıda verildiği şekilde yapısal olarak ikiye ayrılır:

*İntrinsik (doğal, iç) uçlar:* Yapısında bulunan ve kendiliğinden floresans özelliğe sahip olan doğal uçlardır. Protein içindeki aromatik amino asitler olan triptofan, tirozin ve fenilalanin yayılan floresans özellikten sorumludur. Bunlar arasında en yüksek floresans verime sahip olan triptofandır ve genellikle proteinlerin toplam floresansının %90 'ını

oluşturur (Sauer, Hofkens and Enderlein, 2011). İntrensik floroforların çoğu, genellikle canlı hücreler için tehlikeli olan kısa dalga boylu ışınlar ile uyarılır.

*Ekstrinsik (dış) uçlar:* Thioflavin T, floresein izosiyanat, rodamin, naftofuran, floresein, etidinyum bromür, akridin oranj ve floresan boyar maddeler olan kumarin ve türevleri gibi bileşikler bu gruba örnek olarak verilebilir. Bu yapılar floresans özellik göstermeyen veya az gösteren biyomoleküller etkileşerek/bağlanarak spektral özelliklerinin incelenmesine olanak sağlarlar. İşaretleme tekniği, biyolojik süreçleri gözlemlene gibi büyük avantajlara sahiptir. Kullanılan uçlar, işaretlemenin yerini belirlemede daha fazla esneklik ve çok sayıda teknik için gelişmiş floresans özelliklere sahiptirler (Toseland, 2013). Ekstrinsik floroforlar, in vivo etiketlemede dezavantajlara sahip olsalar da in vitro sistemlerde hedef biyomoleküllere kolayca bağlanır.

Verimli ve seçici olan floresan işaretleme, biyomoleküllerin dinamiklerini, kinetik ve fotofiziksel özelliklerini belirlemede kullanılır. Spesifik ve girişim etkisi olmayan iki yönlü floresan işaretleme, bir peptid veya protein molekülündeki, molekül içi mesafeler bakımından üç boyutlu yapılarının araştırılmasına izin verir. En etkili işaretleme yöntemlerinden biri olan konuma özgü floresan işaretleme, moleküller ve moleküller arası protein dinamiklerini ölçmek için geliştirilen bir yöntemdir.

### **2.1.2. Floresans sönüm yöntemi**

Floresans şiddetteki azalma sönüm (quenching) olarak adlandırılır ve örnekteki floresans yoğunluğunun azalması olarak da tanımlanabilir. Buna temel hal kompleksi oluşumu, çarpışma etkisi, radikal olmayan enerji transferi, uyarılmış hal reaksiyonları gibi çeşitli moleküller arası etkileşimler sebep olabilir. Floresans sönüm mekanizması genellikle dinamik sönüm ve statik sönüm olarak sınıflandırılabilir. Dinamik sönüm, proteinlerin ve söndürücülerin çarpışmalarından kaynaklanır ve yüksek sıcaklıkta gerçekleşen hızlı difüzyon ile ve floresans şiddette daha fazla azalmaya neden olur. Statik sönüm mekanizmasında ise, temel durumda floresan olmayan florofor-söndürücü kompleksinin oluşumuna dayanır. Sönüm sabitleri, statik sönüm için sıcaklığın artmasıyla azalır, çünkü sıcaklık artışı komplekslerin kararlılığını azaltır, dolayısıyla statik sönüm için hız sabitlerini düşürür. Buna karşılık, daha yüksek sıcaklıklar dinamik sönüm için daha büyük difüzyon katsayıları ile sonuçlanır, bu nedenle biyomoleküller sönüm sabitlerinin artan sıcaklıkla artması beklenir (Zhao et al. 2017). Floresans sönüm tekniği, biyokimyasal çalışmalarda kullanılır ve ilaç-protein bağlanma etkileşimleri, triptofan gibi

aromatik amino asit uçlarına bağlı floresans sönümünün ölçülmesi ile incelenebilir (Silva, Cortez and Louro, 2004). Floresans sönüm, aşağıda formülü verilen *Stern-Volmer* eşitliğine göre değerlendirilir (Lacowicz, 2006):

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

$F_0$  , floresans ucun sönüm yapan molekül yokken kaydedilen floresans şiddetidir.  $F$ , floresan uç ile söndürücü molekül ortamından alınan floresans şiddettir.  $K_{SV}$ , sönüm sabiti olarak adlandırılır.  $[Q]$ , sönüm yapan maddenin derişimidir.  $\tau_0$ , floresans molekülün söndürücü molekül yokken ortalama ömrünü gösterir.  $k_q$  ise biyomolekül sönüm hız sabitidir. Aşağıda verilen çift logaritma eşitliğine göre biyomolekül/floresan uç arasındaki etkileşimde bağlanma sabiti ve bağlanma kısım sayıları hesaplanabilir.

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

$\log(F_0 - F)/F$  değerlerine karşı  $\log[Q]$  grafiği çizilerek  $K$  ve  $n$  değerleri bulunur. Ayrıca protein-ligand etkileşiminde serbest ve bağlı moleküller arasındaki denge için aşağıda verilen eşitlik de kullanılmaktadır (Bi et al. 2005).

$$\log F_0 - F/F = n \log K - n \log \frac{1}{[Q] - \frac{(F_0 - F)[P]}{F_0}} \quad (3)$$

burada  $[P]$  proteinin toplam derişimini göstermektedir. Farklı sıcaklıklarda  $\log(F_0 - F)/F$ 'e karşı  $\log(1/([Q] - [P](F_0 - F)/F_0))$  grafiğe geçirildiğinde, doğrusal grafiğin eğiminden  $n$  değeri, daha sonra kesim noktasından  $K$  bağlanma sabiti hesaplanabilmektedir.

### 2.1.3. Bağlanma türlerinin belirlenmesi

Sıcaklığa bağlı olarak elde edilen termodinamik parametreler ( $\Delta S$ ,  $\Delta H$  ve  $\Delta G$ ) protein-ligand arasındaki kovalent olmayan etkileşimler hakkında bilgi vermektedir. Dört tür kovalent olmayan etkileşim tanımlanmaktadır. Bunlar hidrojen bağları, hidrofobik kuvvetler, van der Waals kuvvetler ile iyonik etkileşimleri içeren elektrostatik çekimler olarak sıralanabilir.  $\Delta H$  ve  $\Delta S$  parametrelerinin işareti ve büyüklüğü, etkileşim türlerinin ve bağlanma kuvvetlerinin belirlenmesinde kanıt olarak gösterilmektedir (Shuai et al. 2014). Ross ve Subramanian'ın (1981) çalışmalarına göre, pozitif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değeri hidrofobik etkileşim; negatif  $\Delta S$  ve negatif  $\Delta H$  değerleri, düşük dielektrik ortamında van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağı ile ilişkilidir. Oldukça düşük pozitif veya negatif

$\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değerleri elektrostatik etkileşimleri karakterize etmektedir (Zhang, Zhou and Wang 2010). Termodinamik parametreler aşağıda verilen *van't Hoff* eşitliğine göre hesaplanmaktadır.

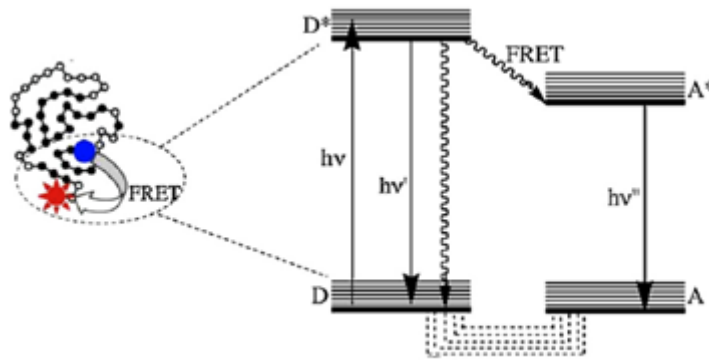
$$\log K = -\Delta H / 2.303RT + \Delta S / 2.303R \quad (4)$$

Farklı sıcaklıklardaki bağlanma sabitlerinin  $\log K - 1/T$  ye karşı çizilen grafiğin eğiminden  $\Delta H$  ve kesim noktasından  $\Delta S$  parametreleri bulunabilir.  $\Delta G$  (Gibbs serbest enerji) değerleri farklı sıcaklıklar için eşitlik 5'ten hesaplanabilir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (5)$$

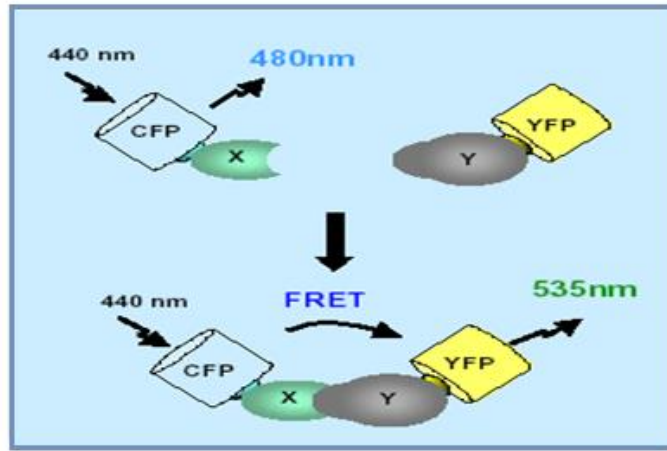
## 2.2. Floresans rezonans enerji transferi (FRET)

FRET yöntemi, uyarılmış bir floroforun (donör) enerjisi dipol-dipol etkileşimi yoluyla başka bir alıcı moleküle (akseptör) aktardığı ışısız enerji transfer işlemi içerir. [Şekil 2.2](#) de gösterildiği gibi, uyarılmış alıcı molekül, foton emisyonu (alıcının bir florofor olması durumunda), yani floresans yoluyla enerjisini kaybederek temel durumuna geri döner. Verici ve alıcı moleküller arasındaki mesafe  $\sim 1$  ila  $10$  nm aralığında olmalıdır. (Sahoo, 2011; Xiao et al. 2009). Förster (1948) teorisine göre FRET'in oluşumu, donör-akseptör mesafesine, iki geçiş dipolünün nispi yönelimine ve donör emisyonu ile alıcı absorpsiyonu arasındaki spektral örtüşmeye güçlü bir şekilde bağlıdır.

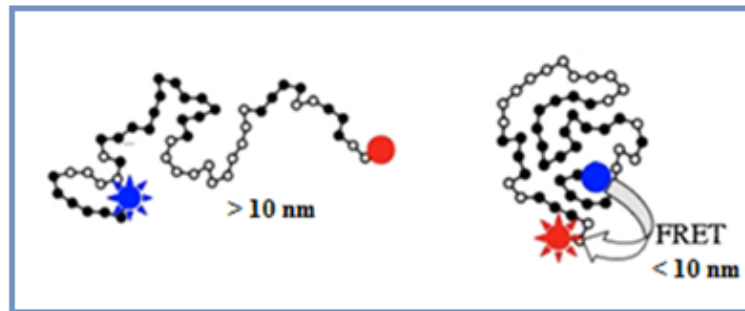


**Şekil 2.2.** Uyarılmış donörden ( $D^*$ ) alıcıya ( $A$ ) ışısız olarak enerji aktarımını gösteren şema. Enerji aktarımı alıcıyı  $A$ 'dan  $A^*$ 'a uyarır ve bunu floresans emisyonu izler. Düz ve dalgalı oklar sırasıyla ışıklı ve ışısız süreçleri göstermektedir. Donör ve akseptörün temel durumları arasındaki enerji bağlantısı noktalı çizgilerle gösterilmiştir (Sahoo, 2011).

Protein-protein etkileşim çalışmalarında proteinlerdeki *moleküller arası* (Şekil 2.3) ve *molekül içi* (Şekil 2.4) değişiklikler hakkında bilgi edinmek için genellikle FRET yöntemi tercih edilmektedir. FRET deneyleri, iki yaklaşım ile yapılmaktadır. Birincisi en kolay yaklaşım ile, sadece polarizörlerle donatılmış iyi bir florimetre gerektiren kararlı durum floresansı kullanmaktır. İkincisi ise; FRET verimliliği, iki farklı uyarma frekansında floresan spektrumları ölçülerek ve bir normalizasyon prosedürü uygulanarak elde edilebilir. Zaman veya frekans alanında gerçekleştirilebilen floresan ömürleri ölçülerek ek bilgiler elde edilebilir. Deneysel veriler, çoklu bozunma süreçleri açısından analiz edilebilir ve mesafelerin dağılımları hakkında bilgi elde edilebilir (Lilley and Wilson, 2000). FRET, bir proteinin büyüklüğü veya bir membranın kalınlığı olan 10 ila 100 Å arasındaki mesafelerdeki moleküler kompleksleri tespit etme yeteneği nedeniyle genellikle “spektroskopik cetvel” olarak adlandırılır ve bu da FRET’in çeşitli biyolojik makromoleküllerin incelenmesinde önemli bir yöntem olduğunu göstermiştir. Tıbbi teşhis, optik görüntüleme ve DNA analizi gibi birçok floresans uygulamalarında kullanılmaktadır (Li and Seeger, 2011).



Şekil 2.3. Moleküller arası enerji aktarımı.



Şekil 2.4. Molekül içi enerji aktarımı.

FRET tekniği, moleküler etkileşimlerin yanı sıra biyomoleküllerdeki konformasyonel ve dinamik değişiklikler, artan hassasiyet, nanosaniyede kısa gözlem süresi ölçeği, biyomoleküler işlemlerin çoğunun gerçekleştiği mesafelerin çalışma aralığı, deneyin basitliği ve seyreltik numune çözeltilerine kolaylıkla uygulanabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca hücre içi sinyaller gibi in vivo protein-protein etkileşimlerinin dinamik süreçlerini izlemek için FRET deneyleri kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; antioksidan, anti-bakteriyel, anti-inflamatuar, anti kanser gibi çok sayıda biyolojik etkilere sahip olduğunu bilinen acteoside ile pepsin etkileşimi (Fang et al. 2015), insanlar ve hayvanlar için toksik olan benzidinin tripsinle olan etkileşimi (Zhang, Wang and Zhou, 2010), polifenolik bileşiklerden biri olan gallik asit ile tripsin (Song et al. 2015) arasındaki  $R_0$  ve  $r$  değerleri FRET yöntemi ile hesaplanarak ışımaz enerji aktarımları açıklanmıştır.

### 2.3. Proteinler ve özellikleri

Amino asit polimerleri olan proteinler hemen hemen tüm biyolojik süreçlerde yer alırlar. Genellikle protein yapısında olan enzimler biyokimyasal tepkimeleri katalizler. Proteinler taşınım, depolama, koordineli hareket, mekanik dayanım ve çeşitli hastalıklarından korunma gibi birçok hayati olayları kolaylaştırırlar. İnsan vücudunda fizyolojik görevlere sahip yüz bin farklı protein bulunmaktadır. Canlı organizmalarda 20 çeşit amino asit bulunmaktadır. Amino asitler, bir molekülün amino grubunun diğerinin karboksil grubuyla reaksiyona girdiği bir *peptid bağının* oluşumu ile birleştirilir. Bu amino asit uçları farklı kombinasyonlarla birleşerek farklı özellikte ve farklı aktiviteye sahip proteinler meydana getirir.

Amino asit yapısının merkezinde hem amino grubuna hem de karboksil grubuna kovalent olarak bağlı olan tetrahedral  $\alpha$ -karbon bulunur ve bu alfa karbona bağlı bir hidrojen ve R grubu yer alır. R grupları; elektrik yükleri, sudaki çözünürlükleri ile yapı ve boyut olarak farklılık gösteren fonksiyonel gruplardır. Peptid ve protein oluşturan amino asitlerin en önemli özelliği, amino ( $-NH_2$ ) ve karboksil ( $COOH$ ) grupları içeren iki tanımlayıcı kimyasal grubun varlığıdır. Amino asitler; hidrofobik amino asitler veya polar olmayan, asidik amino asitler , nötr (yüksüz) polar amino asitler, ve bazik amino asitler (nötr pH de net pozitif yüke sahip) şeklinde sınıflandırılırlar (Garrett and Grisham, 1999). Proteinlerin dört farklı yapıları mevcuttur.

- *Primer (birincil) yapı:* Bir polipeptit zincirindeki amino asit birimlerini birbirine bağlayan tüm kovalent bağların (esas olarak peptit bağları ve disülfür bağları) tanımını birincil yapısıdır. Birincil yapının en önemli özelliği amino asit birimlerinin dizisidir.
- *Sekonder (ikincil) yapı:* Tekrarlanan yapısal düzene yol açan amino asit birimlerinin, kararlı düzenlenmeleri ikincil yapıyı ifade eder.  $\alpha$  sarmal yapı, polipeptit zincirinde yer alan CO ve NH grupları arasındaki hidrojen bağlarının düzgün şekliyle kararlı hale gelen yapıdır.  $\beta$  tabaka ise polipeptit zincirinin paralel plakalar şeklinde oluşturduğu yapıdır.
- *Tersiyer (üçüncül) yapı:* Bir polipeptidin üç boyutlu katlanmasının tüm yönlerini tanımlar. Üçüncül yapıları sayesinde proteinler küresel bir şekil alırlar. Küresel konformasyon ise proteinin çevre ile etkileşimini en aza indirerek en düşük yüzey-hacim oranını verir.
- *Kuarterner (dördüncül) yapı:* Birçok protein birden fazla polipeptit zinciri içerir ve zincirler arasındaki etkileşim kuarterner yapıyı vurgulamaktadır (Nelson and Cox, 2004)

Proteinlerin yapıları göz önüne alındığında iki alt gruba ayrılmaktadır. *Globüler proteinlerde* polipeptit zinciri sık sık yön değiştirir, böylece genel bir küresel yapı oluşturur. Bu proteinlerin çoğu da suda çözünür, sitozolde veya çok hücreli organizma sıvılarında bulunur. Bazı fibröz proteinler lipide çözünür ve plazma zarının içinde veya (ökaryotlarda) hücre içi zarlarda bulunur. Sulu çözeltilerde çözünür ve kolayca difüze olurlar. *Fibröz proteinler*, polipeptit zinciri uzun, suda çözünmeyen bir formdadırlar. Buldukları yapıya güç ve/veya esneklik kazandırır (Kessel and Ben-Tal, 2011).

Bir aminoasit zayıf asit ve zayıf baz özelliği taşıyan fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu türlere *amfiyotik maddeler* adı verilir. Aminoasitler suda çözündüğünde kendi içinde asit-baz reaksiyonuna girerek pozitif ve negatif yük taşıyan *dipolar iyon (zwitter ion)* oluştururlar. Proteinler için net elektrik yükünün sıfır olduğu karakteristik pH'a *izoelektrik noktası (pI)* denir ve her protein için spesifik ve fiziksel bir değerdir (Skoog et al. 2004).



### **2.3.1. Protein-ligand etkileşim çalışmaları**

Proteinler ile ligandlar arasındaki etkileşimler birçok biyokimyasal ve biyofiziksel sürecin temelini oluştururlar. Ayrıca etkileşim çalışmaları ile biyolojik düzenlenme mekanizmalarını anlamak, yeni ilaç tasarımı ve keşfi gibi önemli araştırmalar yapılmaktadır (Fu, Zhao and Chen, 2018). Floresans spektroskopisi, bu tür etkileşimlerin verimli ve güvenilir bir şekilde incelenmesi için en uygun yöntemlerden biridir. Floresans tekniklerin yaygınlığı ve basitliğinin yanı sıra yüksek hassasiyet, birçok alanda kullanım kolaylığı sağlamasıdır. Protein-ligand kompleks oluşumunda çok düşük derişim aralığında çalışılması absorpsiyon spektroskopisinden bin kat daha yüksek hassasiyet sağlamaktadır. Yüksek hassasiyet yanında düşük gürültü gibi özellikler standart florometriden tek molekül floresans spektroskopisine kadar çeşitli deneysel düzenlemelerde moleküler etkileşimlerin analizine izin vermektedir. Ayrıca florometrik uygulamalarda, emisyon ve uyarma spektrumları, kuantum verimi, polarizasyon ve anizotropinin yanı sıra enerji transferi ve diğer elektronik olaylar gibi floresansın çeşitli özellikleri kullanılmaktadır (Williams and Daviter, 2013).

Florometrik yöntemler ile protein-ligand etkileşim çalışmaları son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir. Bu yöntemler üç boyutlu (3D) floresans, senkronize floresans, FRET vb. olarak sıralanabilir. Etkileşim türleri, bağlanma özellikleri, termodinamik parametreler, moleküller arası uzaklıklar hesaplanmaktadır. Ayrıca absorpsiyon, dairesel dikroizm spektroskopileri ile FTIR ve moleküler kenetlenme yöntemleri bu tür çalışmalarda bir arada kullanılmaktadır (Li and Li, 2016).

### **2.4. Proteaz enzimleri**

Proteazlar, etki alanlarına göre enzim aktif bölge yapısına ve spesifik reaksiyon mekanizmalarına göre sınıflandırılan geniş, çeşitli hidrolitik enzim grubudur. Proteindeki amino asit uçları arasındaki peptit bağımlı hidrolize eden yapılardır (Gupta and Gupta, 2020). Beslenme, büyüme, adaptasyon, düzenleme, hastalık gibi hücre ve organizma fonksiyonlarının birçok yönüne biyokimyasal ve/veya fizyolojik katılımı olan yapılardır. Proteazlar; farklılaşma, hareketlilik, bölünme, hücre ölümü gibi temel hücresel işlevler dahil olmak üzere insan vücudunda meydana gelen çoğu mekanizmayı da düzenlerler.

Başlıca proteaz uygulamaları arasında deterjanlar, gıda enzimleri, deri ve kumaş işleme, terapötik uygulamalar ve diğer çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır (Ward, 2011).

Proteazlar birçok proteinin yer değişimini ve aktivitesini düzenler, yeni biyoaktif moleküller oluşturur ve hücrel bilginin işlenmesine katkıda bulunur. Ayrıca bitkilerde kilit rol oynar ve çevresel koşullardaki değişikliklere yanıt olarak belirli protein gruplarının olgunlaşmasına veya yok edilmesine katkıda bulunur (Lopez-Otin and Bond, 2008). Proteaz ayrıca bazı bakteri ve virüsler de dahil olmak üzere kandaki istenmeyen kalıntıları sindirme yeteneğine sahiptir. Proteazların, protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, protein aktivasyonu, hücre düzenlenmesi ve sinyali, doku gelişimi, inflamasyon, tümör büyümesi, metastaz ve patogeneze gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynadıkları öne sürülmektedir (Pinto and Schanze, 2004).

#### **2.4.1. Pepsin ve özellikleri**

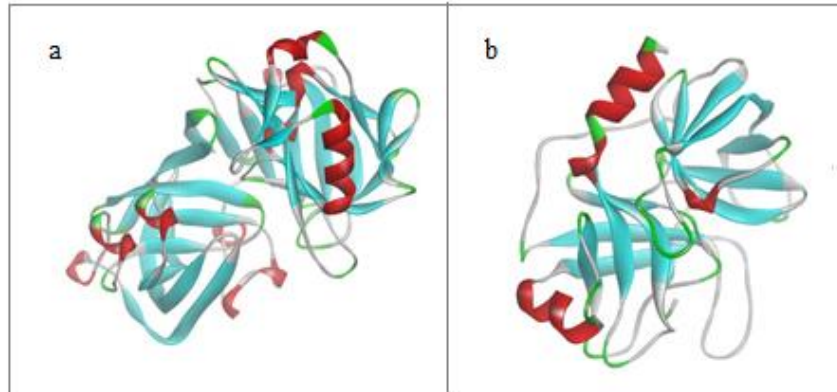
Pepsin, hidrofobik veya aromatik amino asit çevresinde, peptit bağlarının hidrolitik bölünmesini katalize eden bir endopeptidaz olup, midede gıda proteinlerini peptitlere parçalayan ana hücreler tarafından üretilir. Pepsin, gıda ve ilaç üretimi gibi farklı işlemlerde yaygın olarak kullanılır. [Şekil 2.5\(a\)](#) da üç boyutlu yapısı görülen pepsin, 326 amino asitten oluşan tek bir polipeptid enzimatik zincire ve 35 kDa moleküler kütleye sahiptir ve yapısı N-terminali (1-172 amino asit uçları) ve C-terminali (173-326 amino asit uçları) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Pepsinin aktif bağlanma bölgesi, beşinci domain ile iki aspartat amino asit uçları (Asp32 ve Asp215) arasındadır (Li and Geng, 2016). Pepsine floresans özellik kazandıran beş triptopan (Trp-39, 141, 181, 190, 300) ve on üç tirozin (Tyr-9, 14, 44, 75, 86, 113, 114, 175, 189, 268, 275, 310, 311) ve on üç fenilalanin (Phe) amino asit uç içermektedir (Meti et al. 2018; Shi et al. 2017).

Literatürde pepsin ile yapılan çalışmalarda, küçük moleküllerle pepsinin bağlanması, konformasyonel yapısında ve enzim aktivitesinde bazı değişikliklerine sebep olduğu vurgulanmıştır. Pepsin-ligand etkileşimini içeren daha birçok çalışma mevcuttur, örneğin; kinolon yapısına sahip antibakteriyel reaktif olan fleroksasin (Lian et al. 2013); antioksidan, antikanser, bağışıklık fonksiyonları, diyabet başlangıcının önlenmesi ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan daidzein ve genistein gibi ilaçların vücuttaki etkileri incelenmiştir (Nan et al. 2016). Anti-tümör, anti-trombosit, anti-trombotik etki, alerjiler gibi kapsamlı biyolojik aktif flavonoidler (Yu et al. 2021) gibi

moleküllerin pepsin ile olan bağlanma özellikleri çeşitli floresans yöntemler ile çalışılmıştır.

#### 2.4.2. Tripsin ve özellikleri

Tripsin, tüm omurgalıların pankreasında zimojen (tripsinojen) olarak bulunan bir serin proteazıdır, peptid bağlarını sadece arginin ve lizin karboksilik gruplarından ayırmakta etkilidir (Chai et al. 2013). Tripsin aktif bölgelerini, His 57, Asp 102 ve Ser 195'in üç katalitik amino asit uç tarafından oluşturur (Ma et al. 2017; Renet al. 2019). Gıda proteinlerinin sindirimi, yapı bozumunda ve hemostaz, sinyal iletimi, üreme ve immün yanıt gibi diğer fizyolojik proseslerde görev almaktadır. Tripsinin yapısında 223 amino asit uç bulunmaktadır; bunların dört tanesini triptofan (Trp-34, 121, 193, 215), on tanesini tirozin (Tyr-20, 29, 39, 59, 94, 151, 172, 184, 228, 234) amino asit uçları oluşturmaktadır ve molekül ağırlığı 23.3 kDa'dır (Shi et al. 2017; Li and Geng, 2016). Şekil 2.5(b) de üç boyutlu yapısı görülen tripsin molekülünde, mavi renkli sarmallar tirozin ve yeşil renkli sarmallar triptofan amino asit uçlarını göstermektedir. Hem pepsin hem de tripsin sindirim sürecinde, diyet proteinlerini bileşenlerine ayırmada etkili ve sindirim sistemindeki önemlerinden dolayı eksojen maddelerle bağlanma etkileşimlerini incelemek amacıyla sindirim proteazlarının önemli bir modeli olarak kullanılırlar (Wang et al. 2020).

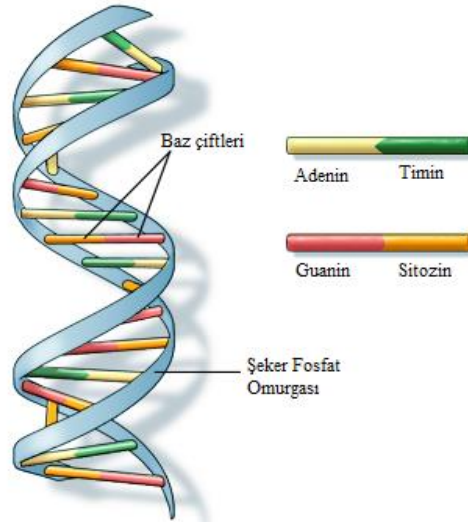


Şekil 2.5. Pepsin (a) ve tripsin (b) üç boyutlu yapısı. (Yeşil renk Trp amino asit uçları göstermektedir.)

#### 2.5. DNA ve özellikleri

Nükleik asitler, hücrelerin metabolik aktivitesini yönlendiren bilgileri taşıyan biyomoleküllerdir. Nükleik asitler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit

(RNA) olmak üzere iki grupta yer alır. DNA, bilinen tüm canlı organizmaların ve bazı virüslerin gelişiminde ve işleyişinde kullanılan genetik talimatları içerir. DNA moleküllerinin ana rolü, gen adı verilen yapılar ile genetik bilgiyi depolanmaktır. Diğer DNA dizilerinin yapısal amaçları, bu genetik bilginin kullanımının düzenlenmesinde rol oynamalarıdır. Hücreler içinde DNA, kromozom adı verilen yapılar halinde düzenlenirler. Kromozomlar, hücreler bölünmeden önce DNA replikasyonu adı verilen bir süreçte kopyalanır (Shahabadi and Hadidi, 2012). Kimyasal olarak DNA, ester bağlarıyla birleştirilen şekerler ve fosfat gruplarından oluşan bir omurgaya sahip, nükleotid adı verilen basit birimlerden oluşan uzun bir polimerdir. Her şekere baz adı verilen dört molekül türünden biri eklenir. DNA çift sarmalı, iki ipliğe bağlı bazlar arasındaki hidrojen bağları ile stabilize edilir. DNA'da bulunan dört baz, adenin (A), sitozin (C), guanin (G) ve timindir (T). Bu dört baz, tam nükleotidi oluşturmak için şeker/fosfata bağlanır (Şekil 2.6).

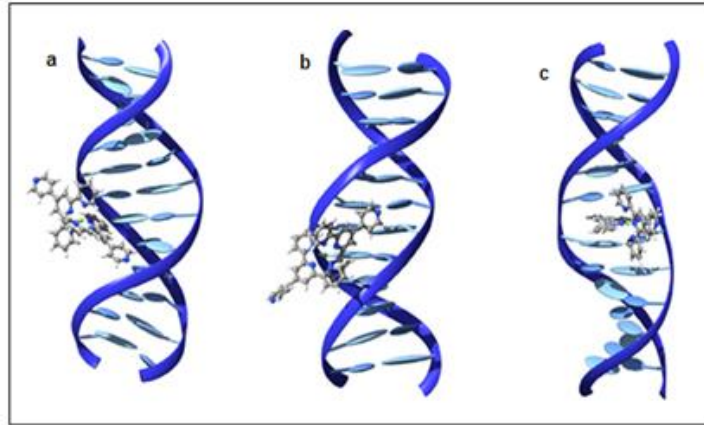


**Şekil 2.6.** DNA'nın üç boyutlu yapısı.

Nükleik asitlerin yaşam sürecinde önemli işlevleri nedeniyle, çoğu çalışmada biyolojik numunelerdeki diğer bileşenlerin ölçümleri için referans olarak kullanılmıştır. Yüksek duyarlılığa sahip olan floresans yöntemler sıklıkla nükleik asitlerin kantitatif analizi için tercih edilmektedir. Ancak, florimetrik tayinleri, yapıları ve dinamik çalışmalarını için nükleik asitlerin doğal floresan emisyon özelliklerinin doğrudan kullanımı, doğal DNA'nın düşük floresan kuantum verimi ( $\theta_f=4 \times 10^{-5}$ ) nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle, nükleik asitlerin yapı ve kütle bilgilerini araştırmak için nükleik asitlerle etkileşen/bağlanan bazı reaktiflerin kullanımına ihtiyaç duyulmuştur. Dolayısıyla yeni kimyasal yapılar ve türevleri tasarlanmaktadır. Bunlar ilaç etken maddesi, DNA için

boyar madde vs. olarak öngörülmektedir. Bu çalışmada kullanılan stiril indolyum boya, DNA boyar maddesi olarak önerilmesi amaçlanmıştır. Boyanın ctDNA ile etkileşimi absorpsiyon spektroskopisi ve moleküler kenetlenme yöntemi ile incelenerek etkileşim türü, bağlanma enerjileri gibi özellikleri açıklanmaya çalışılmıştır.

Kovalent olmayan iki tür DNA bağlayıcı madde interkalatörler ve oluk bağlayıcılar olarak tanımlanmıştır. DNA baz çiftleri arasına yerleşen interkalatör maddeler düzlemsel yapıya sahiptirler. Buna karşılık, oluk bağlayıcılar DNA yapısında çok az bozulmaya neden olan DNA minör oluğuna yerleşirler (Chaires, 1998). DNA'nın ilaçlar gibi küçük moleküllerle bağlanma çalışmaları, ilaç etkisinin moleküler mekanizmasını açıklamak ve yeni ilaçlar geliştirmek için oldukça önemlidir. İlacın DNA ile etkileşiminin araştırılmasında UV spektrofotometrisi, floresans ve dairesel dikroizm gibi moleküler spektroskopik yöntemler yanında X-ışını kırınımı gibi çeşitli teknikler, dinamik viskozite ölçümleri ve yüksek performanslı sıvı kromatografi teknikleri yer almaktadır.



Şekil 2.7. Bir molekülün DNA'ya oluk (a, b) ve interkalasyon (c) bağlanma şekilleri.

## 2.6. Stiril boyalar ve özellikleri

Stirenden türetilen tek değerlikli radikal,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-$  stiril olarak adlandırılır ve bu kısmı içeren boyalar da stiril boyalar olarak adlandırılırlar; yüklü veya yüksüz olabilirler. Stiril boyaları, elektron eksikliği olan bir N-alkillenmiş heterosiklik halka ve genişletilmiş  $\pi$ -konjuge bir sistem oluşturmak için bir çift bağ yoluyla birbirine bağlanan elektron bakımından zengin bir aromatik halkaya sahiptirler (Ditmangklo et al. 2019). Yaygın olarak kullanılan donör-akseptör (D-A) tipi floresan boya sınıfındandır; elektron alıcı ve donör grupları bir vinil grubu ile bağlanmıştır. Bu boyaların uyarılmış moleküler elektronik hallerinde, molekül içi yük donörden akseptöre aktarılır. Stiril türevleri,  $\pi$ -

elektron yoğunlukları, molekül içi yük transferleri, yüksek molar absorpsiyon katsayıları, ve fotokararlılık özelliklerine sahiptirler. UV bölgeden yakın IR bölgeye kadar olan geniş bir spektrumda yer alırlar. Stiril boyalar, fotoğraf endüstrisinde duyarlaştırıcı, esnek boyalar, lazer boyaları, katkı maddeleri olarak ve diğer çeşitli alanlarda optik duyarlaştırıcılar yanında biyo-etiketleme reaktifi olarak kullanılmaktadırlar (Deligeorgiev et al. 2010; Jachak et al. 2020).

Nötr ve katyonik stiril boyalar, nükleik asitlerle (DNA ve RNA) etkileşime girdiklerinde yüksek kuantum verimli floresan özellik gösterirler. Katyonik stiril boyalar DNA için iyi bir afinite ve bazı kanser hücrelerine karşı iyi bir sitotoksiste göstermektedir. DNA ile kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girerler ve oluk (groove) bağlayıcı veya interkalatör olarak görev yaparlar. DNA ile etkileşime giren boyanın floresansının yaklaşık yüz kat arttığı ve bu durumun da DNA görüntüleme için faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Botti et al. 2019; Udayan et al. 2018). Stiril boyalar küçük moleküler yapılara sahiptirler ve poliester gibi yoğun şekilde istiflenmiş hidrofobik substratların boyanması için idealdir. Ayrıca uyarılabilir hücrelerdeki membran potansiyel değişikliklerini haritalamak için kullanılan en yaygın problemler arasındadır. Bir başka özelliği de potansiyometrik olarak böylece lipidlerin, zarların ve dokuların duyarlılığının araştırılmasıdır. Heterosiklik uç içeren hidrokarbon sübstitüentine sahip stiril boyaları, hücre içi ortamda kolayca çözünür ve in vivo hücrelerde viskozite sensörleri olarak işlev görürler (Hunger, 2003; Volchkov et al. 2014; Yao and Funada, 2016).

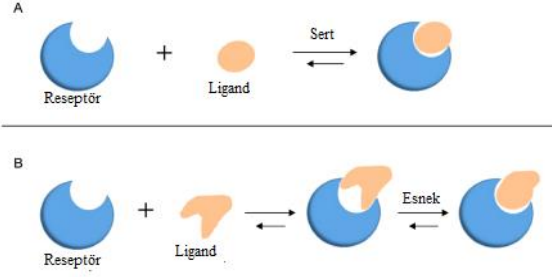
Bu tez çalışmasında yeni bir katyonik stiril indolyum boya (C15) sentezlenmiştir ve çeşitli spektroskopik yöntemlerle analiz edilmiştir. Boyanın proteaz enzimleri olan pepsin ve tripsin ile moleküler etkileşimi floresans, absorpsiyon, FTIR ve CD gibi spektroskopik yöntemlerle ve moleküler kenetlenme yöntemi ile incelenmiştir. Stiril indolyum bazlı boyalar, algılama ve görüntüleme yaygın olarak kullanılan önemli bir merosiyanin sınıfını oluşturur (Li et al. 2013). Stiril indolyum katyonları genişletilmiş  $\pi$ -konjugasyona sahiptir ve görünür absorpsiyon ve floresan emisyonu (Metsov et al. 1990) gösterir ve merkezi konjuge iminyum iyonu bir elektrofil olarak kabul edilir.  $\pi$  sistemine yapılan nükleofilik saldırı optik özelliklerini değiştirir. Bu yüzden stiril indolyum türleri nükleofilik analitler için kolorimetrik ve florimetrik reseptörler olarak kullanılır. Bu nedenle stirilindolyum çekirdeği, biyolojik ve çevresel açıdan önemli olan siyanür (Promchat, Rashatasakhon and Sukwattanasinitt, 2017), florür (Shiraishi, Itoh and

Hirai, 2011), sülfür (Perry and Miles, 2016), kükürt içeren amino asitler (Liu et al. 2014) gibi nükleofiller sensörler içindeki reaktif bileşen olarak kullanılmış ve bu yaklaşım canlı hücrelerde başarıyla doğrulanmıştır (Wu et al. 2017).

## 2.7. Moleküler kenetlenme analizi

Moleküler kenetlenme (molecular docking), moleküler etkileşimi taklit eden, reseptörler ve ligandlar arasındaki bağlanma modunu ve afiniteyi öngören yapıya dayalı bir ilaç tasarım yöntemidir. Son yıllarda, bu teknoloji ilaç tasarımı araştırma alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler kenetlenmenin bulgularda devrim yarattığı bazı alanlar vardır. Özellikle, küçük moleküller ve protein hedefi arasındaki etkileşim araştırmaları, enzimin aktivasyonunu veya inhibisyonunu öngörmektedir. Bu tür bilgiler, ilaç tasarımı için hammadde oluşturmaktadır. Moleküler kenetlenmenin temel amacı, tüm sistemin daha az serbest enerjisinin yanı sıra, etkileşime giren her iki molekülün optimize edilmiş bir konformerini elde etmektir. X ışını kristalleşmesi ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, biyomoleküler hedefler için üç boyutlu yapı verilerinin araştırılması ve oluşturulması için temel tekniklerdir (Agarwal and Mehrotra, 2016; Dar and Mir, 2017).

Kenetlenme çalışmalarında bilgisayar program kullanılarak biyomolekül ile küçük molekül arasındaki etkileşiminde biyomolekül hedef kenetlenen molekül ise ligand olarak adlandırılır (Morris and Lim-Wilby, 2008). Hesaplamalı ilaç tasarımında, 1894'te Emil Fischer tarafından oluşturulan "kilit ve anahtar" modeli moleküler kenetlenme yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu çerçevede, moleküler tanıma, bir reseptör proteininin bağlanma bölgesi, tıpkı bir kilidin anahtarı gibi, ligand şekline tam olarak bağlandığında meydana gelir (Santos, Ferreira and Caffarena, 2019). Moleküler kenetlenme, ligand ve reseptör arasındaki bağlanma afinitesini ve etkileşim modunu öngörebilen ve elde edebilen tamamlayıcılık ve ön düzenlemeye göre optimum uyumu taklit etmektedir. Kilit ve anahtar modelinde, kilit için doğru yönlendirme reseptörlerin ve ligandların sert bir şekilde kenetlenmesi anlamına gelir (Şekil 2.7.a). Bu model geometrik tamamlayıcılığın önemini vurgular. Gerçek kenetlenme süreci o kadar esnek ki reseptörler ve ligandlar birbirlerine iyi uyacak şekilde yapılarını değiştirmek zorunda kalırlar. Böylece, "indüklenen-fit modeli" geliştirilmiştir (Fan, Fu and Zhang, 2019) (Şekil 2.7.b).



**Şekil 2.8.** İki moleküler kenetlenme modeli. **(a)** Bir kilit ve anahtar modeli, **(b)** indüklenen-fit modeli

Moleküler kenetleme yöntemleri, standart deneysel tekniklere nispeten hızlı ve ekonomik yollar sunar. Belirli reseptör hedeflerinin bağlanma bölgesi içindeki küçük moleküllerin deneyde kullanılan bağlanma modlarını ve ilgilerini tahmin etmeyi amaçlarlar. Moleküler kenetlenmede iki önemli amaç; birincisi doğru bağlanma duruşlarını bulmak ve ikincisi bağlanma ilgisini doğru bir şekilde tahmin etmektir. Moleküler kenetleme, optimizasyon arama yöntemi ve puanlama fonksiyonu olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Bir optimizasyon algoritması, temel olarak minimum bağlanma enerjileri ile kenetlenme biçimlerini algılamak; puanlama işlevi, aramadan elde edilen sonuçları değerlendirmek için kullanılır (Fu, Zhao and Chen, 2018).

Literatürde bazı moleküler kenetlenme çalışmaları incelendiğinde; örneğin bazı tümör hücrelerinin büyümesini engelleyebildiği bilinen Ligupurpuroside A'nın pepsin alanları arasındaki boşluklarda bulunduğunu göstermiştir (Shen et al. 2015). Flavonoid olmayan bir polifenol bileşiği olan resveratrol (RES)'in tripsine bağlandığını göstermiş ve tüm deneyler sonucu doğrulamıştır (Ren et al. 2019). Akciğer hastalığı ve astım tedavisinde kullanılan bir fenetanolamin  $\beta$ -agonisti olan payleanın (PL) DNA'nın küçük bir oluk bağlayıcısı olduğunu ve tercihen A-T açısından zengin bölgelere bağlandığını göstermiştir (Zhou et al. 2016).

## 2.8. FTIR Spektroskopisi

Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, küçük moleküllerin veya moleküler komplekslerin analizinden, hücre veya dokuların analizi gibi geniş uygulama alanına sahip bir spektroskopik yöntemdir (Berthomieu and Hienerwadel, 2009). Kimya, biyokimya, biyoloji, tıbbi kimya ve çevre bilimlerinde başta nitel analiz olmak üzere nicel analizlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. En önemli kullanım alanı organik



bileşiklerin, ilaçların ve kirleticilerin tanımlanması olmuştur. Günümüzde, FTIR spektroskopisi proteinlerin, DNA/RNA yapısal karakterizasyonlarının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Benzer şekilde, ligand, ilaç veya protein etkileşimleri ile uyarılmış DNA ve RNA konformasyonel geçişleri FTIR spektroskopisi ile incelenmektedir. Ek olarak, kütle spektrometrisi ile birlikte FTIR uygulamaları, UV absorpsiyon, NMR ve CD spektroskopileri, boya ve ilaç vb. gibi etkileşim gösteren biyomakromoleküllerin kimyasal yapı değişimlerini tanımlayan etkili yöntemleri oluştururlar (Tajmir-Riahi, N'soukpoe-Kossi and Joly, 2009).

FTIR spektroskopisinin biyolojik çalışmalar için en önemli avantajı, hemen hemen her biyolojik numunenin spektrumunun çok çeşitli ortamlarda elde edilebilmesidir. Protein spektrumları; sulu çözeltilerde, organik çözücülerde, deterjan misellerinde, lipid membranları gibi ortamlarda elde edilebilir. Bir peptit veya proteinin bulunduğu kimyasal ortam, yapısını ve kararlılığını etkiler. Tekniğin diğer avantajları: gerekli protein miktarı oldukça küçüktür (10 µg); proteinin boyutu önemli değildir; ışık saçılması veya floresans etkisi yoktur; kinetik ve zaman çözümlü çalışmalar mümkündür. X-ışını kırınımı, NMR, ESR ve CD spektroskopik cihazlarının maliyetine kıyasla ucuzdur (Haris and Severcan, 1999) kullanım kolaylığı ve sağlanan sonuçların güvenilirliği nedeniyle moleküler analiz için en yaygın kullanılan analitik yöntemlerden biridir (Ricci et al. 2015). FTIR, başlangıçta esas olarak küçük inorganik moleküllerin çalışmasına uygulanmış olsa da son 20 yılda biyolojik moleküllere, örneğin proteinin ikincil yapısının, enzimlerin, nükleik asitlerin, lipidlerin ve glikolipitlerin statik ve dinamik çalışmaları gibi alanlara genişletilmiştir (Gerwert and Kötting, 2010).

## **2.9. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi**

Sol ve sağ elle dairesel polarize ışığın diferansiyel absorpsiyon tekniğini kullanan dairesel dikroizm (circular dichroism, CD) moleküllerin konformasyonuna duyarlı spektroskopik bir yöntemdir. Biyomoleküllerin çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. CD genellikle, floresans ve absorpsiyon gibi diğer spektroskopik tekniklerden doğrudan elde edilemeyen biyomoleküllerin işlevi ve yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. CD çalışmalarında deneysel olarak ölçülen parametre, sol ve sağ elle dairesel polarize ışık için absorpsiyon,  $\Delta A (= A_L - A_R)$  farkı alınır (Martin and Schilstra, 2008). Başka bir tanımla CD, doğruluğu ve duyarlılığı nedeniyle genellikle proteinin konformasyonel değişikliklerinin izlenmesinde kullanılır. Karakteristik CD bantları,  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -tabaka,  $\beta$ -

katlanmış tabaka vs. gibi ikincil yapının içeriğini tanımlamak için önemli bilgiler verir (Chai et al. 2013). Genel olarak, proteinlerin CD ile incelenmesinde iki spektral bölge dikkat çekmektedir. Uzak-UV ( $\lambda = 175-250$  nm), polipeptit zincirinin katılımı ile genel olarak proteinin ikincil yapısını yansıtır. Tersine, birçok yan zincir kromoforu yakın-UV ( $\lambda = 240-320$  nm) bölgesinde CD sinyalleri gösterir ve bunlara aromatik amino asitler (Tyr, Trp ve Phe) ve disüflitler dahildir. Proteinlerin yakın-UV CD spektrumlarındaki değişiklikler genellikle üçüncül yapıda meydana gelen konformasyonel değişiklikleri göstermede kullanılır (Purdie and Brittain, 1994).

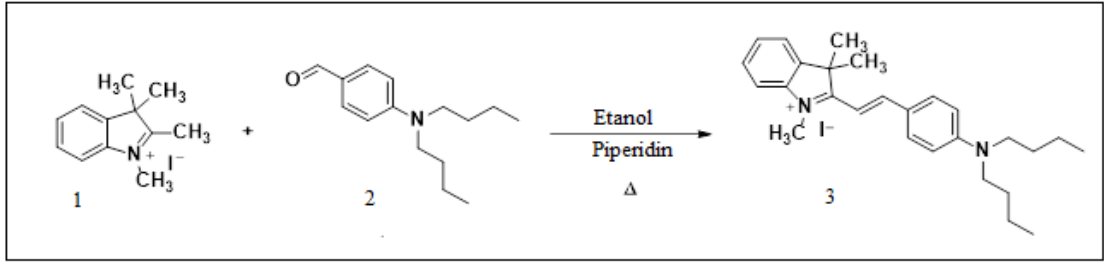
Proteinlere ve nükleik asitlere bağlanan birçok ligand kiral değildir ve dolayısıyla CD sinyali göstermezler. Ancak NADH bir dehidrojenaza veya etidinyum bromür DNA'ya bağlandığında, ligandlarla ilişkili absorpsiyon bantları güçlü CD özellik gösterirler. CD spektrumları denge sabitlerini belirlemek için kullanılabilir, proteinlerin ve nükleik asitlerin sekonder yapısı ve ligandların bu tip makromoleküllere bağlanması hakkında bilgi verir. Diğer spektroskopik tekniklere göre CD bazı avantaj ve dezavantajlar gösterir. Örneğin CD'nin protein-ligand etkileşimlerindeki başlıca avantajları, tekniğin çok çeşitli etkileşimleri incelemede kullanılabilmesidir. Çünkü proteinden veya ligandan gelen sinyaldeki değişikliklerin kompleks oluşumu nedeniyle meydana geldiği yorumlanır. Etkileşimler protein derişimi, pH, sıcaklık, iyonik kuvvet vb. gibi çeşitli deneysel koşullar altında incelenebilir. Zaman çözümlü CD kullanılarak kompleks oluşum hızlarını ölçmek mümkündür. CD'nin başlıca dezavantajı ise, özellikle yakın-UV ve görünür CD çalışmaları için (tipik olarak titrasyon başına  $\geq 1$  mg protein) gerekli olan nispeten büyük miktardaki madde ve iki protein türü arasındaki kompleks oluşumunun uzak-UV CD'sinde nispeten küçük değişikliklere yol açabildiği gösterilebilir (Kelly and Price, 2006). Biyomoleküllerin incelenmesinde CD spektroskopisinin başlıca uygulamaları:

- Uzak UV CD spektrumlarından protein ikincil yapı içeriğinin tahmin edilmesi,
- pH, tuz derişimi ve eklenen yardımcı çözücülerdeki (alkoller, tri-floroetanol vb.) değişikliklerin neden olduğu proteinler ve nükleik asitlerdeki konformasyonel değişikliklerin tespiti, rekombinant doğal proteinlerin ve mutantlarının yapısal analizlerinin incelenmesi,
- Sıcaklık değişiklikleri veya kimyasal denaturantların (üre ve guanidin hidroklorür gibi) eklenmesiyle ortaya çıkan protein veya nükleik asit derişimlerinin izlenmesi,
- Protein- protein, protein-ligand etkileşimlerinin (özellikle yavaş ayrışma süreçleri) kinetiğini ve protein katlanma tepkimelerinin kinetiğini incelemesidir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Stilil indolyum boyanın (Ci5) elde edilmesi ve spektral özellikleri:

Aşağıda sentezlenme şemasında görüldüğü gibi (Şekil 3.1.), 0.8 mmol 1,2,3,3-tetrametil-3*H*-indolyum iyodürün (bileşik 1) 20 mL EtOH içerisinde karıştırılırken üzerine katalitik miktarda piperidin eklenmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı üzerine 0.8 mmol 4-(dibütilamino) benzaldehit (bileşik 2) eklenmiştir. Karışım geri soğutucu altında yaklaşık 12 saat kaynatılmıştır. Reaksiyon ince tabaka kromatografisi ile izlenmiştir. Reaksiyon bittikten sonra etanol çektirilip yağimsı bir tabaka halinde koyu mor tabaka elde edilmiştir. Kolon kromatografisiyle metanol:DCM (1:5) çözücü çifti kullanılarak, koyu yeşil saf katı ürün olarak (E)-2-(4-(dibütilamino)stilil)-1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-iyum iyodür (bileşik 3, Ci5) elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Ci5 bileşiğinin sentezlenme şeması.

Ci5 bileşiği çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir ve kaydedilen FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HR-MS ve UV-görünür absorpsiyon spektrumları Ek.1 de verilmiştir. Sentez reaksiyonu ince tabaka kromatografisi (TLC) ile silika jel (MERCK, 60 F254, 0.25 mm) plakalar kullanılarak UV ışık altında izlenmiştir. Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR (ATR) spektrofotometresinden bileşiğin infrared spektrumları alınmıştır. <sup>13</sup>C NMR ve H-NMR spektrumları Bruker Avance 300 ve 400 MHz Ultra-Shield cihazında kaydedilmiştir. TMS iç standart ve DMSO-d<sub>6</sub> çözücü olarak kullanılmıştır. Elektron iyonizasyon içeren yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları (HRMS), (Waters-LCT-Premier-XE-LTOF) kütle spektrometrisinde kaydedilmiştir. Elektrotermal IA9200 cihazı ile bileşiğin erime noktası tayin edilmiştir.

**FTIR** (cm<sup>-1</sup>) 2955 (C-H Alifatik), 1612 (C=N), 1567 (C=C), 1508 (C=C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.28 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.94

(s, 3H), 3.49 (t,  $J = 7.7$  Hz, 4H), 1.74 (s, 6H), 1.55 (m, 4H), 1.36 (m, 4H), 0.94 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  179.7, 154.2, 153.3, 142.9, 142.5, 129.1, 127.8, 123.0, 122.4, 113.9, 112.5, 105.1, 51.2, 50.5, 33.5, 29.6, 26.7, 20.0, 14.3.

**HRMS** ( $m/z$ )(TOF ES<sup>+</sup>), (C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>IN<sub>2</sub>) [M+ H]<sup>+</sup> bileşigi için bulunan kütle 389.2951; hesaplanan kütle 389.0640.

Erime noktası:70-72°C; verim: % 89.

### 3.2.Kullanılan kimyasallar

Enzim çalışmaları için iki ayrı tampon çözelti çift destile suda hazırlanmıştır. pH 7.4 de PBS ( phosphate buffer solution) tampon çözeltisi kullanılmıştır (0.067 M potasyum fosfat, 0.067 M disodyum hidrojen fosfat). pH 2.0 de sitrik asit-sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır (0.1 M NaOH ,0.02 M sitrik asit). Pepsin (EC 3.4.23.1, MW: 35 kDa) ve tripsin (EC 3.4.21.4, MW: 23.8 kDa) Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. Stok pepsin çözeltisi ( $1.24 \times 10^{-4}$  M) pH 2.0 tampon çözeltisinde ve stok tripsin çözeltisi ( $1.44 \times 10^{-4}$  M) pH 7.4 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. Ci5 bileşiginin stok çözeltisi ( $1.19 \times 10^{-3}$  M) DMSO' da hazırlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup günlük çalışma çözeltileri, stok çözeltilerinden belli derişimlerde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler karanlıkta ve 4°C'de saklanmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan su, çift destillenmiştir.

### 3.3. Kullanılan enstrümantal aletler

Bütün floresans ölçümler Hitachi F-4500 spektroflorimetre cihazında FL Solutions 2.0 software bilgisayar programı kullanılarak kaydedilmiştir. Cihaz 150 W ksenon lamba, 2.5 nm/2.5 nm uyarılma/emisyon bant aralığı, 700 V PMT voltajına sahiptir. Ölçümler 1.0 cm floresans kuartz hücreler içinde alınmıştır. (Shimadzu) UV-1700 PharmaSpec spektrofotometre ile UV-görünür absorpsiyon spektrumları UV-Probe PC software bilgisayar programı kullanılarak kaydedilmiştir. Çalışma çözeltilerinin pH değerleri Mettler Toledo (FiveEasy Plus) marka dijital pH metrede ölçülmüştür.

### 3.4. Floresans çalışmalar

Florimetrik titrasyon yöntemi kullanılarak pepsin-Ci5 ve tripsin-Ci5 bağlanma özellikleri 25, 33 ve 37 derecelerde çalışılmıştır. Pepsin ve tripsin çalışmalarında sırasıyla  $2.5 \times 10^{-6}$

M ve  $5.0 \times 10^{-6}$  M çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltilere 5.0-60.0  $\mu$ L hacim aralığında Ci5 stok çözeltisinden eklenerek, enzimlerin emisyonları üzerindeki sönüm etkileri incelenmiştir. Her iki enzim çözeltisi de 280 nm'de uyarılmıştır ve 290-450 nm dalga boyu aralığında floresans spektrumları kaydedilerek floresans şiddetdeki değişiklikler ile dalga boyundaki kaymalar incelenmiştir. Floresans sönüm sonuçları için *Stern-Volmer* eşitliği kullanılmıştır. *van't Hoff* eşitliği kullanılarak farklı sıcaklıklardaki sonuçlar değerlendirilmiştir ve termodinamik parametreler bulunarak bağlanma türleri belirlenmiştir. FRET parametreleri olan  $J(\lambda)$ ,  $r$ ,  $R_0$  değerleri Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimi için Förster teorisine dayandırılarak hesaplanmıştır.

### 3.5. Absorpsiyon çalışmaları

Ci5 ile pepsin/tripsin arasındaki etkileşimler UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumlarıyla incelenmiştir. Ci5'in pepsin/tripsin ortamındaki UV absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir ve absorpsiyon bantlarındaki kaymalar değerlendirilmiştir.

### 3.6. FTIR çalışmaları

FTIR ölçümleri, Thermo Scientific Nicolet-iS5, İD5 ATR aksesuar içeren IR spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları,  $4 \text{ cm}^{-1}$  ayırıcılık ve 64 tarama hızı ile  $1700-1500 \text{ cm}^{-1}$  aralığında; Ci5'in varlığında ve yokluğunda pepsin/tripsin enzimlerinin FTIR spektrumları kaydedilmiştir. Örnek hazırlanma aşamasında önce, serbest haldeki pepsin ve tripsin çözeltileri ile enzim/boya karışımları kurutulmuştur. Sonrasında elde edilen katılar etanolda çözülmüştür ve ATR başlık üzerine damlatılarak spektrumlar kaydedilmiştir.

### 3.7. CD çalışmaları

CD spektrumları, Ci5'in varlığında ve yokluğunda pepsin/tripsin çözeltilerinden JASCO-810 spektropolarimetre ile 1.0 mm kuvarz küvet içerisinde kaydedildi. Ölçümler 205-260 nm dalga boyu aralığında,  $0.1 \text{ nm}$  ayırıcılık, ortalama 3 tarama ve  $50 \text{ nm/dk}$  hız kontrolü ile kaydedilmiştir.

### 3.8. Moleküler kenetlenme çalışmaları

Yeni sentezlenen Ci5 molekülüne karşı hedef moleküller olan pepsin (ID:1PSA), tripsin (ID:1AQ7) ve B-form DNA (ID:1BNA)'nın olası yönelim ve etkileşimleri moleküler kenetlenme simülasyon çalışmaları yapılmıştır. Hedef moleküllerin model yapıları RCSB

Protein Veri Bankasından indirilmiştir (Rose et al. 2021) ve Discovery Studio (DS) 3.5 (Accelrys Software Inc, San Diego, 2013) protokollerini kullanarak küçültülmüştür. Ci5'in ligand olarak yapısı çizilmiştir ve Gauss 09 (G09)'da belirlenen DFT/B3LYP/6-31+G (d,p) seviyesinde geometri optimizasyonu yapılmıştır (Frisch et al. 2009). Ci5 bileşiğinin yapısı hakkında bilgi elde etmek için moleküler elektrostatik potansiyel yüzey (MEPS) ve moleküler orbitaller (FMOs) oluşturulmuştur. Adı geçen hedef moleküllerin bağlanma yerleri, kenetlenme işlemi DS3.5'in alt protokolü ile tanımlanmıştır. Sonuçta, hazırlanan Ci5 ve hedef biyomoleküller, hesaplamalı görselleştirme tekniği, Auto Dock 4.2 (Morris et al. 2009) kullanılarak moleküler kenetlenme reaksiyonu gösterilmiştir. Her hedef için yüksek sıralamalı kenetlenme kompleksi, 200 konformasyonda bağlanma modunu ve bağlanma enerji değerini incelemek üzere seçilmiştir. Kenetlenme sonuçlarına dayanarak, her bir hedef için Ci5 bileşiğinin en iyi modları görselleştirilmiştir ve DS3.5 yardımıyla protein-ligand etkileşimlerinin potansiyeli değerlendirilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

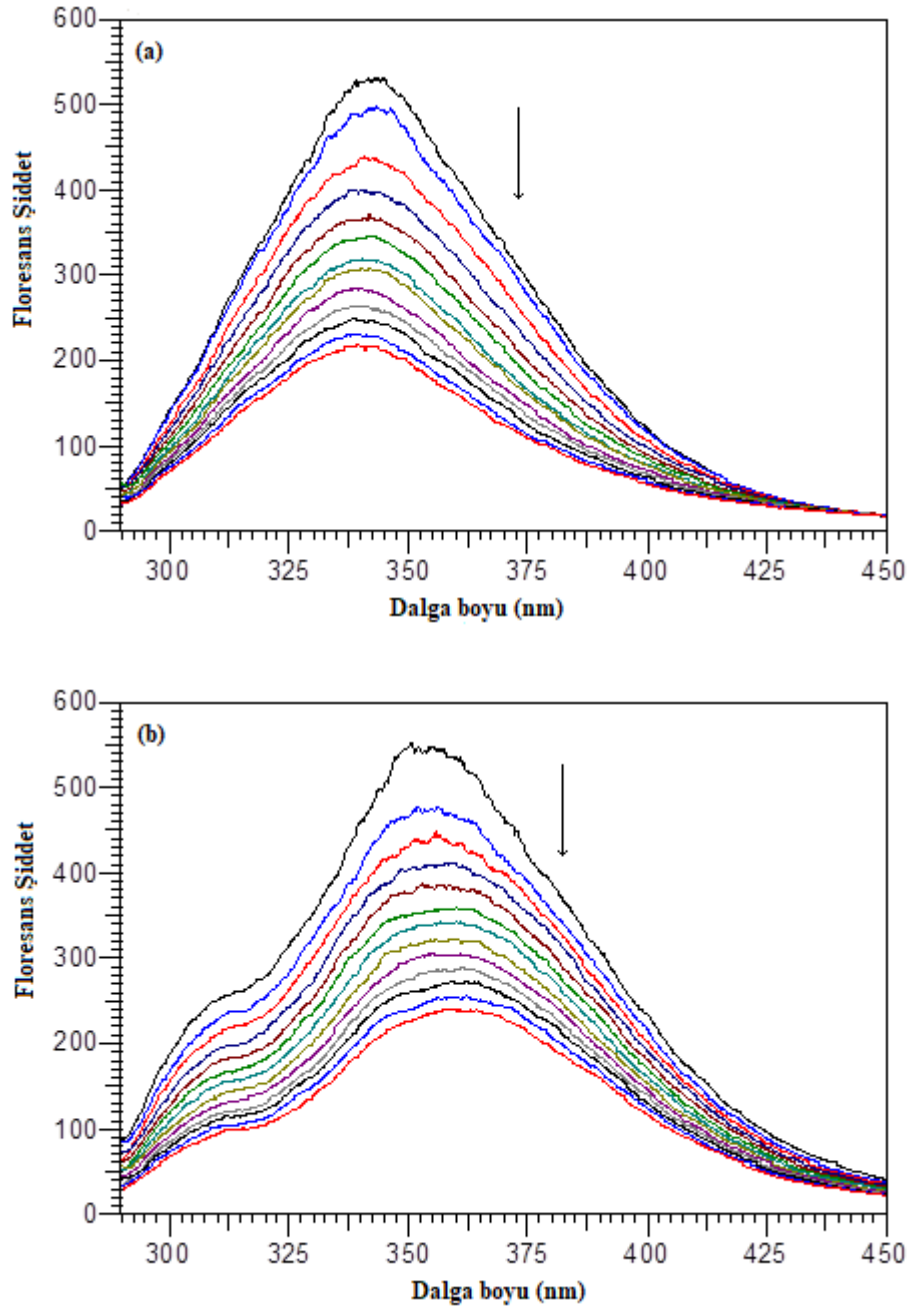
Tez çalışmasında, Ci5 kısaltması ile verilen; çıkış maddeleri 1,2,3,3-Tetrametil-3H-indolyum iyodür ve 4-(dibütülamino) benzaldehit kullanılarak yeni bir katyonik stiril boya sentezlenmiştir ve spektroskopik yöntemler ile karakterize edilmiştir. Ci5 bileşiğinin, proteaz enzimleri olan tripsin ile pH 7.4 PBS, pepsin ile pH 2.0 sitrik asit tampon ortamlarında etkileşimler floresans spektroskopisi yanında UV-vis absorpsiyon, CD ve FTIR gibi çoklu spektral yöntemlerle çalışılmıştır. Floresans sönüm sabitleri, bağlanma sabitleri ve termodinamik parametreler hesaplanarak boya-enzim arasındaki bağlanma türleri incelenmiştir. FRET yöntemi ile boya-enzim çiftleri arasındaki moleküller arası uzaklıklar hesaplanmıştır. Ayrıca DNA ile etkileşimler absorpsiyon yöntemi ile incelenmiştir. Ci5-enzim/DNA bağlanma özellikleri, hesaplamalı moleküler kenetlenme sonuçları ile desteklenmiştir.

### 4.1. Ci5 ile enzim etkileşiminde florimetrik çalışmalar

Bu bölümde yapılan çalışmalarda floresans titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Floresans kuvarz hücreye 2.5 mL  $2.5 \times 10^{-6}$  M pepsin çözeltisi ve  $5.0 \times 10^{-6}$  M tripsin çözeltisine beşer mikrolitre stok Ci5 çözeltisi ( $1.19 \times 10^{-3}$  M) eklenmiştir. Her iki enzim çözeltisi de 280 nm'de uyarılıp 290-450 nm dalga boyu aralığında kaydedilen spektrumlarında floresans şiddetlerindeki değişiklikler kaydedilmiştir ve çalışmalar üç sıcaklıkta (298, 303 ve 310 K) gerçekleştirilmiştir. [Şekil 4.1.\(a\)](#) pepsin çözeltileri ve [Şekil 4.1.\(b\)](#) tripsin çözeltileri üzerine artan derişimlerde Ci5 eklenmesiyle elde edilen floresans sönüm spektrumlarını göstermektedir. Enzimlerin içerdiği triptofan uçlardan meydana gelen floresans şiddetler artan boya derişimi ile birlikte düzenli olarak azalma göstermiştir. Pepsinin floresans piki 342 nm dalga boyundan 5 nm maviye, tripsinde ise 351 nm'den yaklaşık 10 nm kırmızıya kaydığı görülmektedir.

Deneysel olarak elde edilen titrasyon sonuçlarına göre Stern-Volmer eğrileri çizilmiştir. [Şekil 4.2.\(a\)](#) pepsin çözeltileri ve [Şekil 4.2.\(a\)](#) tripsin çözeltileri için üç sıcaklıkta elde edilen Stern-Volmer grafiklerini göstermektedir. Elde edilen grafiklerin iyi bir doğrusallık göstermesi, sönüm mekanizmasının *statik* veya *dinamik* sönüm olması gerektiği anlamına gelmektedir (Yu et al. 2021). [Çizelge 4.1](#), Stern-Volmer grafiklerden elde edilen floresans sönüm sabiti  $K_{sv}$  ve sönüm hız sabiti  $k_q$  değerlerini göstermektedir.

Bu verilere göre, sıcaklık arttıkça  $K_{sv}$  değerlerinin azalması, Ci5'in enzimler ile etkileşiminde *statik* sönm mekanizmasına işaret etmiştir.

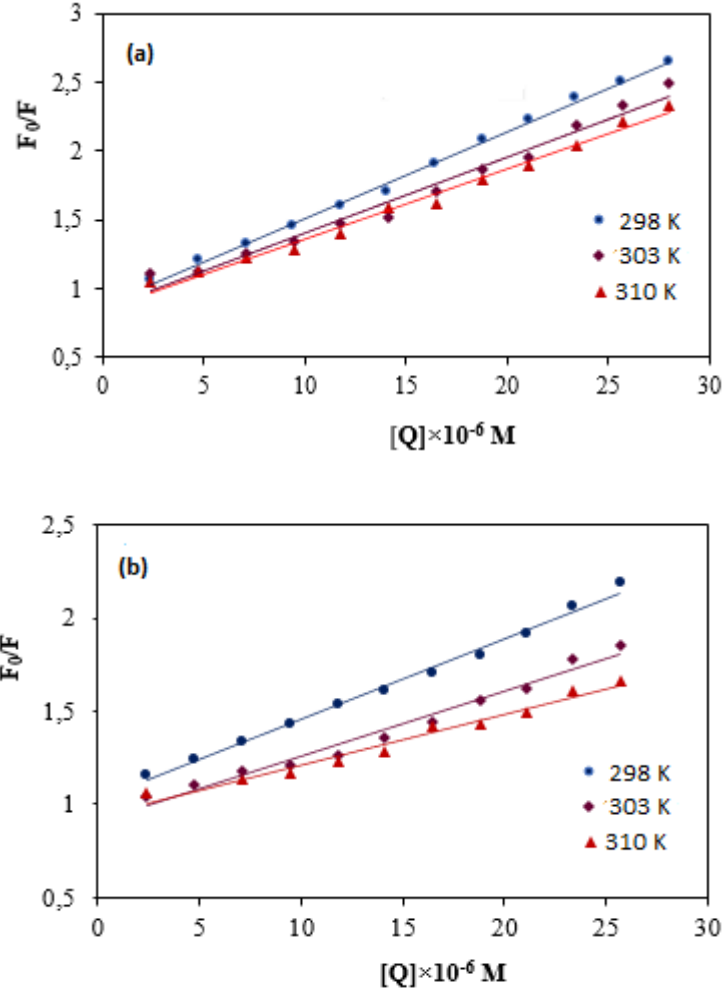


**Şekil 4.1.** (a)  $2.5 \times 10^{-6}$  M pepsin (pH 2.0) ve (b)  $5.0 \times 10^{-6}$  M tripsin (pH 7.4) çözeltileri üzerine artan derişimlerde Ci5 eklenerek elde edilen floresans spektrumları.  $\lambda_{uy}=280$  nm ve oda sıcaklığı, Ci5 derişimi: 0, 2.38, 4.75, 7.11, 9.46, 11.8, 14.1, 16.5, 18.8, 21.1, 23.4, 25.7, 28.0 ( $\times 10^{-6}$  M).

Biyomoleküler çeşitli söndürücülerin, maksimum difüzyon sönm hız sabiti  $2.0 \times 10^{10}$  L/mol.s dir ve çizelgedeki  $k_q$  değerlerinin, bu değerden çok daha büyük olması



*statik* sönüm mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu durum, Ci5 ile pepsin ve Ci5 ile tripsin arasında bir kompleks oluşumuna işaret etmektedir (Mohseni-Shahri, Moeinpour and Nosrati, 2018).

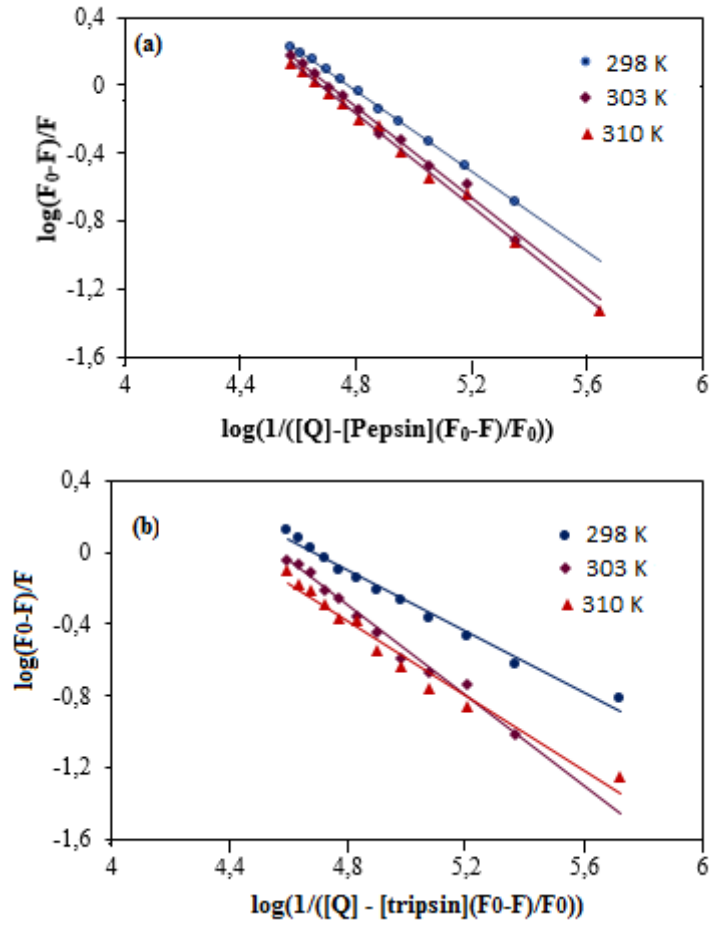


**Şekil 4.2.** 2.5x10<sup>-6</sup> M pepsin (a) ve 5.0x10<sup>-6</sup> M tripsin (b) ile Ci5 etkileşiminde, Stern-Volmer grafikleri.

Eşitlik 3 kullanılarak çizilen Ci5- enzim etkileşimine ait çift logaritma grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekle göre  $\log (F_0-F)/F$  değerlerine karşı  $\log(1/([Q]-[P](F_0-F)/F_0))$ 'ye göre çizilen grafikleri üç farklı sıcaklıkta elde edilmiştir (Li et al. 2021). Grafiklerden K<sub>a</sub>, bağlanma sabiti ve n, bağlanma kısım sayıları bulunmuştur ve yapılan hesaplamalara göre sonuçlar Çizelge 4.2 de listelenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Ci5/pepsin-tripsin etkileşiminden elde edilen Stern-Volmer parametreleri

	T (K)	Stern Volmer eşitliği	$K_{sv} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{12}$	$R^2$
Tripsin	298	$F_0/F = 1.0248 + 4.33 \times 10^4 [Q]$	4.33	4.33	0.9937
	303	$F_0/F = 0.9066 + 3.50 \times 10^4 [Q]$	3.50	3.50	0.9770
	310	$F_0/F = 0.9433 + 2.71 \times 10^4 [Q]$	2.71	2.71	0.9739
Pepsin	298	$F_0/F = 0.8762 + 6.32 \times 10^4 [Q]$	6.32	6.32	0.9976
	303	$F_0/F = 0.8496 + 5.56 \times 10^4 [Q]$	5.56	5.56	0.9794
	310	$F_0/F = 0.8511 + 5.11 \times 10^4 [Q]$	5.11	5.11	0.9882



**Şekil 4.3.** (a)  $2.5 \times 10^{-6}$  M pepsin ve (b)  $5 \times 10^{-6}$  M tripsin ile Ci5 bağlanması için oluşturulan çift logaritma grafikleri.

Bu sonuçlara göre [Çizelge 4.2](#) de görüldüğü gibi, pepsin ve tripsinin Ci5 ile bağlanma sabitleri sırasıyla Ci5-pepsin > Ci5-tripsin şeklindedir.  $K_a$  değerlerine göre, Ci5'in pepsin ile daha büyük bağlanma sabiti ile etkileştiği; yani Ci5, pepsini tripsinden daha sıkı şekilde tuttuğu ifade edilebilir. Sonuçlar Ci5-pepsin kompleksi için bağlanmanın, Ci5-tripsin kompleksinden daha güçlü olduğunu göstermektedir. İki sistemin stokiyometrik bağlanma sayısı olan  $n$ 'nin değerleri yaklaşık olarak 1'e eşittir, bu da Ci5 molekülünün bir pepsin/tripsin molekülü ile etkileştiğini göstermektedir. Sıcaklığın artmasıyla  $K_a$  değerlerinde azalma meydana gelmiştir. Bu durum, sıcaklığın artmasıyla komplekslerin kararlılıklarının azaldığını göstermektedir (Li and Geng, 2016).

**Çizelge 4.2.** Ci5/enzim etkileşiminden elde edilen çift logaritma eşitliği,  $K_a$  ve  $n$  değerleri.

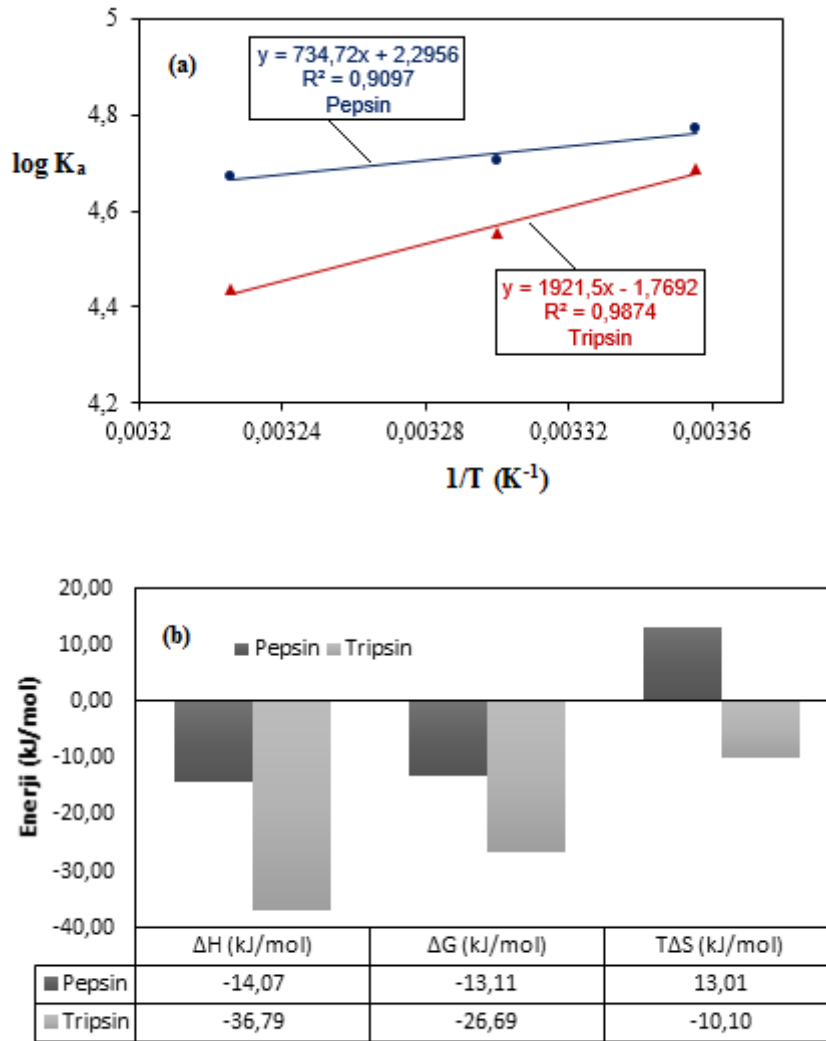
	T (K)	Doğrusal Eşitlik*	$K_a (M^{-1}) \times 10^4$	$n$	$R^2$
<b>Pepsin</b>	298	$y = 5.5784 - 1.1692 x$	5.904	1.1692	0.9988
	303	$y = 6.3794 - 1.3563 x$	5.053	1.3563	0.9918
	310	$y = 6.3556 - 1.3601 x$	4.708	1.3601	0.9973
<b>Tripsin</b>	298	$y = 3.8318 - 0.8173 x$	4.879	0.8173	0.9864
	303	$y = 5.7314 - 1.2579 x$	3.600	1.2579	0.9852
	310	$y = 4.817 - 1.0858 x$	2.731	1.0858	0.9707

\* Doğrusal eşitlik:  $\log (F_0 - F)/F = n \log K_a - n \log (1/([Q] - [P](F_0 - F)/F_0))$

#### 4.1.1. Ci5-enzim etkileşimine ait bağlanma türlerinin bulunması

Biyomoleküllerin küçük moleküller ile (floresan uç, metal kompleksi, ilaç, boya, ligand vb.) arasındaki etkileşimlerde hidrofobik etkileşim, elektrostatik etkileşim ve hidrojen bağları, van der Waals bağları olmak üzere dört tür kovalent olmayan bağlanma türünden söz edilmektedir. Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimlerinin farklı sıcaklıklardaki değişimi,

Çizelge 4.2. 'de verilen  $K_a$  bağlanma sabitlerinin log değerleri, Eşitlik 4' teki van't Hoff'a göre  $1/T$  'ye karşılık grafikleri çizilmiştir. Pepsin için  $\log K_a = 2.2956 + 734.72 / T$ ,  $R^2=0.9097$  ve tripsin için  $\log K_a = -1.7692+1921.5 / T$ ,  $R^2= 0.9874$  doğrusal grafikler elde edilmiştir. Bu grafiklerin eğimlerinden  $\Delta H$ , kesim noktalarından  $\Delta S$  parametreleri hesaplanmıştır. Ayrıca  $(\Delta G)$  Gibbs serbest enerji değişimi, Eşitlik 5 kullanılarak elde edilerek bulunmuştur. Şekil 4.4 (a) pepsin ve tripsine ait çizilen van't Hoff grafiklerini, Şekil 4.4 (b) ise 298 K'de termodinamik parametrelerin histogram grafiklerini göstermektedir.



Şekil 4.4. (a) Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimine ait van't Hoff grafikleri ve (b) elde edilen termodinamik parametrelerin gösterimi.

Çizelge 4.3 de, hesaplanan termodinamik parametreler listelenmiştir.  $\Delta G$  nin negatif olması, Ci5'in pepsin/tripsin ile bağlanma mekanizmasının kendiliğinden ve  $\Delta H$ ' nin

negatif olması ise bağlanmanın ekzotermik olduğunu göstermektedir. Ci5-pepsin etkileşiminde, negatif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değerleri, *elektrostatik* kuvvetlerin etkin rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, pozitif  $\Delta S$  değeri genellikle hidrofobik etkileşimin kanıtıdır, çünkü ligand ve protein etrafında düzenli bir şekilde dağılmış su molekülleri, *hidrofobik* etkileşimin bir sonucu olarak rastgele bir dizilimin elde edilmesine neden olmaktadır (Zeng et al. 2016). Ci5 ile tripsin etkileşiminde ise negatif  $\Delta S$  ve negatif  $\Delta H$  değerleri, *van der Waals kuvvetleri* ve *hidrojen bağlarının* bağlanmada önemli rol oynadığını göstermektedir.

**Çizelge 4.3.** Ci5'in pepsin ve tripsin etkileşiminden bulunan  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  ve  $\Delta S$  değerleri.

	T (K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)
<b>Tripsin</b>	298	-36.79	-26.69	-33.87
	303		-26.53	
	310		-26.29	
<b>Pepsin</b>	298	-14.07	-13.11	-43.95
	303		-13.33	
	310		-13.64	

#### 4.1.2. Ci5-pepsin ve Ci5-tripsin çiftlerinin FRET çalışmaları

Förster teorisine göre Ci5/pepsin ve Ci5/tripsin molekül çiftleri arasındaki enerji aktarım parametreleri olan % 50 enerji aktarımına karşılık gelen ve kritik uzaklık olarak adlandırılan  $R_0$  ile donör olarak davranan pepsin/tripsin ve akseptör olan Ci5 çiftleri arasındaki mesafe olan  $r$  değerleri ve enerji transfer verimliliği (E) deneysel verilerden, aşağıdaki verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad \text{ve} \quad (6)$$

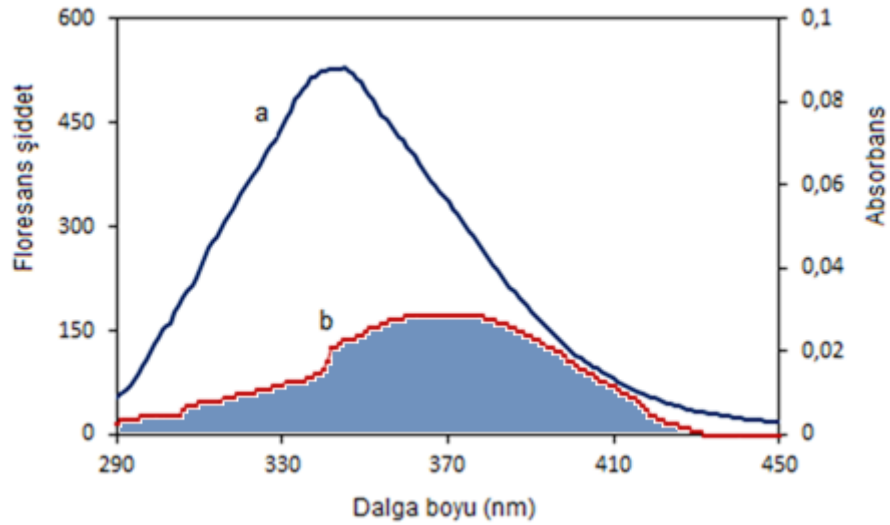
$$E = 1 - F / F_0 \quad (7)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} (k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)) \quad (8)$$

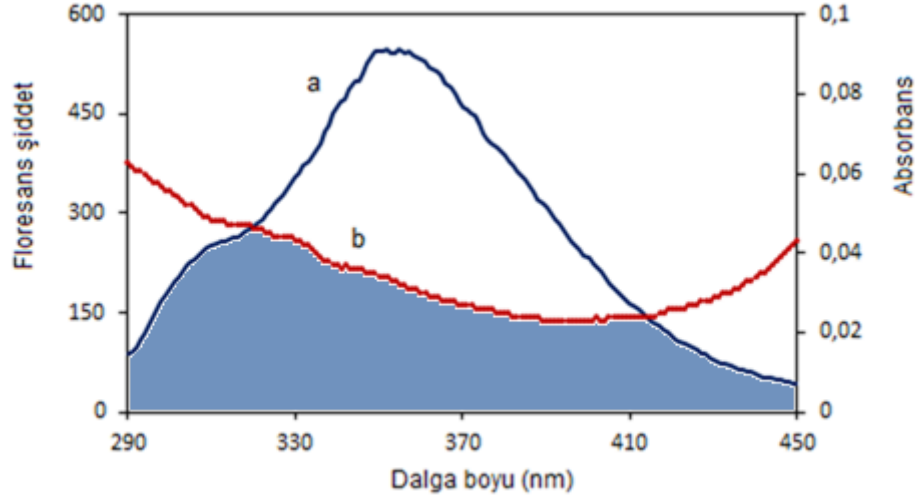
Burada  $n$ , ortamın kırılma indisi;  $k^2$ , yönelme faktörü;  $J$  ise örtüşme integrali olarak adlandırılır.  $J$  değerini bulmak için enzimin floresans spektrumu ile boyanın absorpsiyon spektrumu karşılaştırılarak bulunur.  $Q_D$ , donörün kuantum verimidir.  $J$  değeri aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir:

$$J(\lambda) = \frac{\sum F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F_D(\lambda)} \quad (9)$$

eşitlikte  $F_D(\lambda)$  normalize edilmiş donör emisyon spektrumu ( $\lambda$  ve  $\lambda+\Delta\lambda$  dalgaboyları arasındaki eğri altında kalan alan);  $\epsilon_A(\lambda)$ ,  $\lambda$  dalgaboyunda akseptör molar ekstinksiyon katsayısıdır. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 da gösterildiği gibi, eşit derişimdeki Ci5 bileşiminin absorpsiyon spektrumu ile pepsin ve tripsinin floresans spektrumlarının spektral olarak örtüşmeleri kaydedilmiştir. Enzim-Ci5 molekülleri arasındaki mesafe olan  $r$ , Eşitlik 6;  $R_0$  ise Eşitlik 8 den bulunmuştur. Eşitlikteki  $k^2=2/3$ ;  $n = 1.336$ ;  $Q_D$  değerleri pepsin için 0.150 (Lian et al. 2013) ve tripsin için 0.146 (Zhang, Zhou and Wang, 2010 ) olarak alınmıştır. Her iki molekül çiftine ait  $J$ , spektral örtüşme integral değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.4' de elde edilen parametreler gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** (a)  $2.5 \times 10^{-6}$  M pepsinin floresans spektrumu (b)  $2.5 \times 10^{-6}$  M Ci5'in absorpsiyon spektrumunun örtüşmesi (pH 2.0, 298 K).



**Şekil 4.6.** (a)  $5.0 \times 10^{-6}$  M tripsinin floresans spektrumu (b)  $5.0 \times 10^{-6}$  M Ci5'in absorpsiyon spektrumunun örtüşmesi (pH 7.4, 298 K).

**Çizelge 4.4.** Ci5-pepsin/tripsin etkileşiminde Förster rezonans enerji transfer parametreleri.

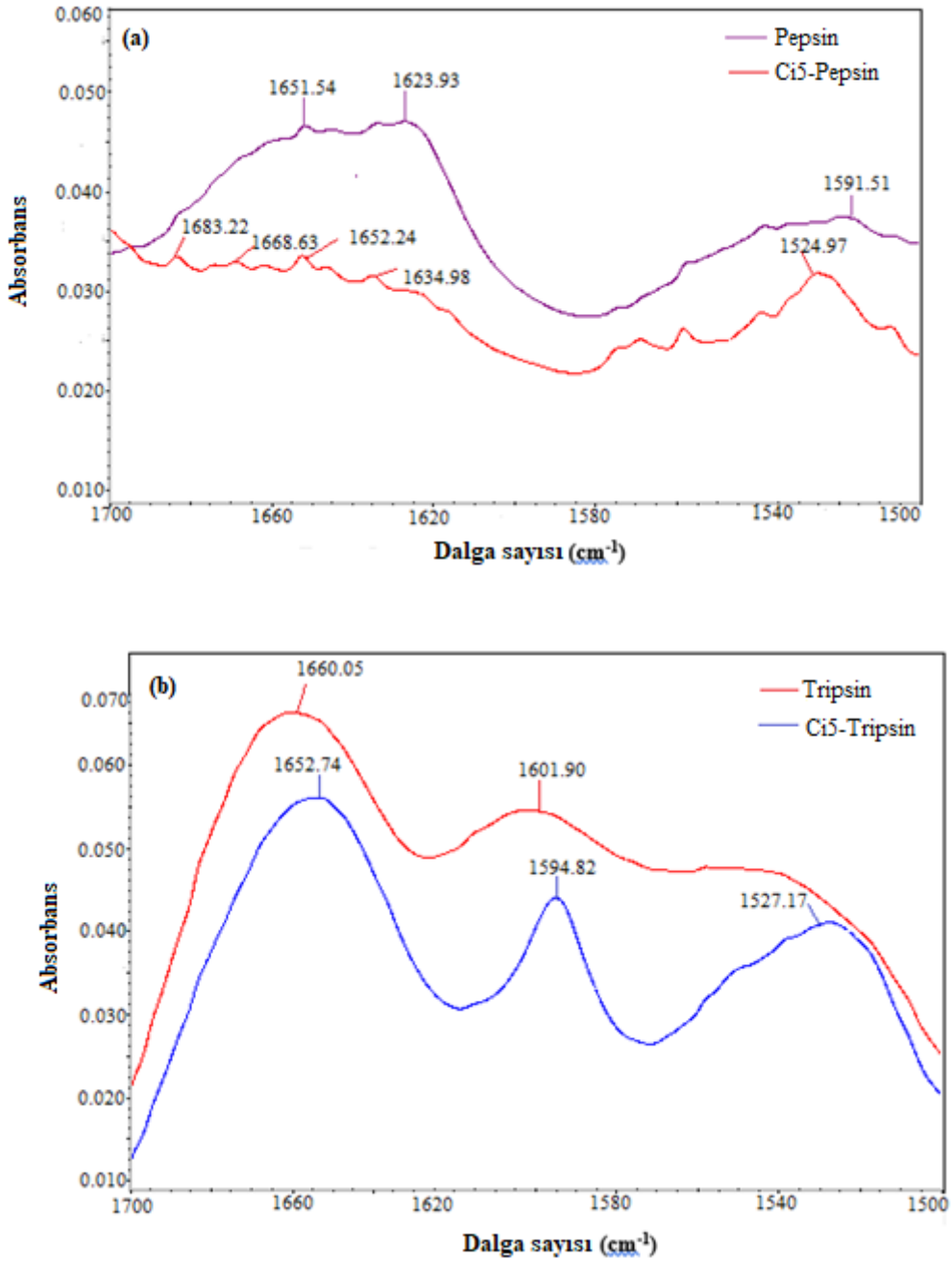
Molekül çifti	Spektral örtüşme, $J \times 10^{-14} (\text{cm}^3 \text{M}^{-1})$	$R_0$ (nm)	Enerji transfer verimi, E (%)	r (nm)
Pepsin/Ci5	1.231	2.64	14.9	3.53
Tripsin/Ci5	1.090	2.58	19.2	3.27

Çizelge 4.4' de verilen sonuçlara göre; Förster teorisi göz önüne alındığında, molekül çiftleri arasındaki mesafe olan r değerlerinin 10 nm den küçük olması, Ci5 ve enzim molekül çiftleri arasında ışısız enerji transferinin gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca r değerlerinin  $R_0$  dan büyük olması, floresans sönüm mekanizmasının *statik* olduğunu, molekül çiftleri arasında kompleks yapı oluşumunu desteklemektedir.

#### 4.1.3. FTIR çalışmaları

FTIR, proteinlerin ikincil yapısını incelemek için kullanılan yöntemlerden biridir. Temeli, IR bölgede ışığı absorbe ederek temel durumdaki bir molekülün titreşim seviyeleri arasındaki geçişleri ve proteinin ikincil yapısındaki değişiklikleri liganda

bağlandıktan sonra incelemektir. Amid bağları, bu IR spektrumlarından kaynaklanan peptid bantlarında geçici titreşimlere neden olmaktadır (Moradi et al. 2021). Amid bantları olan amid I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) esas olarak C=O gerilme bandıdır ve amid II ( $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ ) ise en yaygın kullanılan titreşim bantları olan N-H bükülmesi ile C-N gerilmesi şeklinde ortaya çıkar. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi Ci5’in eklenmesi ile pepsin ve tripsinin amid bantlarının absorpsiyon pik konumlarını değiştirmiştir.



Şekil 4.7. Ci5'in (a) pepsin ve (b) tripsin ile etkileşimini gösteren FTIR spektrumları.



Pepsin için amid I ve amid II bandındaki pik kaymaları sırasıyla 1651.54 cm<sup>-1</sup>'den 1652.24 cm<sup>-1</sup>'e ve 1519.51 cm<sup>-1</sup> den 1524.97 cm<sup>-1</sup>'e kaymıştır. Tripsin için amid I ve amid II bandındaki kaymalarda sırasıyla 1660.05 cm<sup>-1</sup>'den 1652.74 cm<sup>-1</sup>'e ve 1601.90 cm<sup>-1</sup>'den 1594.82 cm<sup>-1</sup>'e kayma göstermiştir (Zhu et al. 2021).

#### 4.1.4. Dairesel dikroizm (CD) çalışmaları

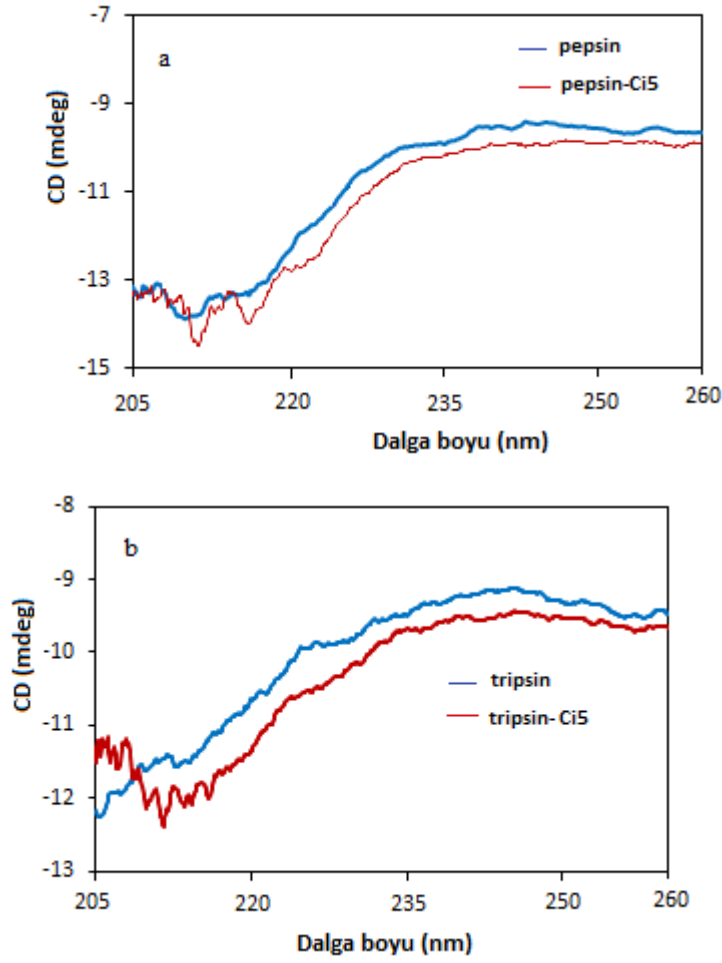
Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi, küçük moleküllerle etkileşimleri sonucunda proteinlerin ikincil yapısında meydana gelen değişikliklerin izlenmesinde kullanılan duyarlı bir analitik tekniktir. Bir proteinin sekonder yapısını belirlemek için uzak-UV CD spektrumları (200-260 nm) kullanılır. Şekil 4.8 de kaydedilen spektrumlara dayanılarak, pepsin ve tripsinin ikincil yapısındaki değişiklikler, Ci5'in yokluğunda ve varlığında incelenmiştir. CD spektrumları, proteinin tipik  $\alpha$ -heliks yapısının karakteristiği olan 208 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) ve 222 nm dalga boyunda ( $n \rightarrow \pi^*$ ) elde edilen iki negatif bant göstermektedir (Siddiqui et al. 2019). 222 nm'deki güçlü negatif eliptiklik bantları, enzimlerin sahip olduğu  $\alpha$ -heliks yapısına işaret etmektedir. CD spektrum verileri, aşağıda verilen eşitlik ile MRE (real residual ellipticity) (degcm<sup>2</sup>/mol) ifadesine dönüştürülmüştür.

$$MRE = \frac{\theta_{obs} (mdeg)}{C \times n \times l \times 10} \quad (9)$$

eşitlikteki n, proteinde bulunan amino asit uçların sayısı;  $\theta_{obs}$ , gözlenen eliptisite; C, proteinin molar derişimi ve l, cm cinsinden kuartz hücrenin uzunluğudur (Syed et al. 2019). Çalışmada n değeri pepsin için 326, tripsin için 223 alınmıştır. l, 0.1 cm olan kuvarz küvet kullanılmıştır. Enzim derişimi 2.083x10<sup>-6</sup> M olarak belirlenmiştir.  $\alpha$ -heliks içerikleri enzim ve enzim/boya kompleksleri (1:1 mol oranı) için aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\alpha\text{-helix (\%)} = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33,000 - 4000} \times 100 \quad (10)$$

Eşitlikte MRE, 208 nm'deki molar eliptisite; 4000 sayısı,  $\beta$ -kıvrımın MRE değeri ve 33000 sayısı, 208 nm'de saf  $\alpha$ -heliks MRE değerini göstermektedir (Liu et al. 2019). Elde edilen CD verileri Çizelge 4.5 de görülmektedir.



**Şekil 4.8.**  $2.08 \times 10^{-6}$  M pepsin ve pepsin-Ci5 (1:1) pH:2.0 (a);  $2.08 \times 10^{-6}$  M tripsin ve tripsin-Ci5 (1:1) pH:7.4'de (b) elde edilen CD spektrumları.

**Çizelge 4.5.** 208 nm de, Ci5 varlığında ve yokluğunda enzimlerin  $\alpha$ -heliks içerikleri.

	gözlenen CD (mdeg)	$\alpha$ -helix (%)
Pepsin	-13.26	53.55
Pepsin - Ci5	-13.01	52.29
Tripsin	-11.81	73.90
Tripsin - Ci5	-11.29	70.05

Şekil 4.8 de, iki enzim için CD bantları, Ci5 eklenmesiyle azaldığı görülmektedir. Proteinin ikincil yapısında değişiklik olduğu ve  $\alpha$ -heliks içeriğinde azalma meydana geldiğini göstermektedir. Eşitlik 10 kullanılarak yapılan hesaplamada pepsinde  $\alpha$ -heliks yüzdesi % 53.55 den Ci5 eklenmesiyle % 52.29'a, tripsinde ise, % 73.90 dan % 70.05'e inmiştir. Böylece  $\alpha$ -heliks pepsin için % 1.26 ve tripsin için % 3.85 azalma gösterdiği enzim heliks yapısının kararlılığının azalması ile sekonder yapıda konformasyonel değişiklik olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.1.5. Ci5 için pepsin/tripsin ortamında elde edilen analitik sonuçlar

Ci5 bileşiğinin deneysel ortamdaki nicel tayininde; oda sıcaklığında pepsin/tripsin ile etkileşiminden elde edilen ve aşağıda doğrusal eşitlikleri verilen Stern-Volmer grafikleri kalibrasyon grafiği olarak kullanılmıştır.

$$\text{Tripsin-Ci5} \quad F_0/F = 1.0077 + 4.33 \times 10^4 [Q] \quad (R^2=0.9937)$$

$$\text{Pepsin-Ci5} \quad F_0/F = 0.8762 + 6.32 \times 10^4 [Q] \quad (R^2=0.9976)$$

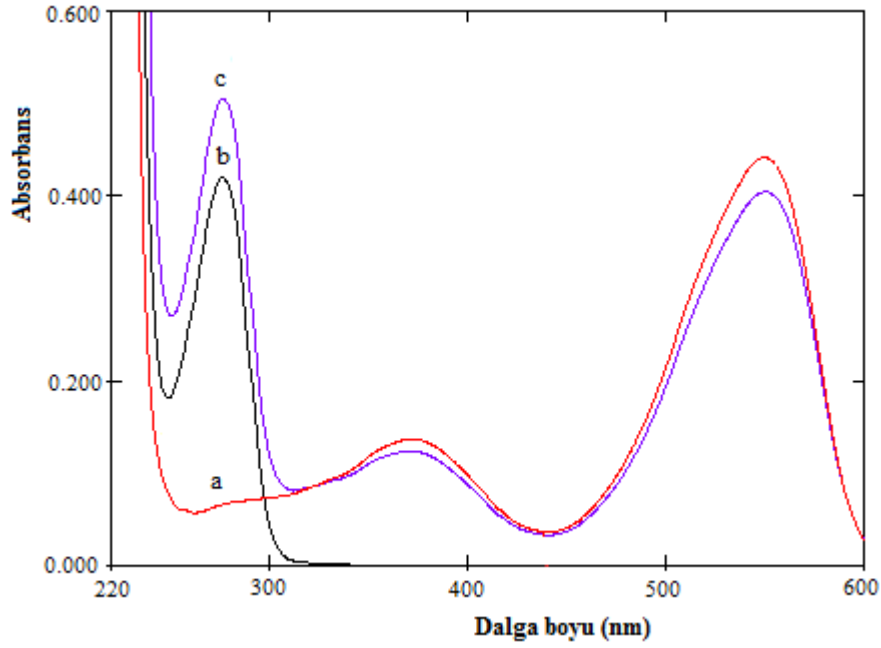
Oda sıcaklığında elde edilen bu grafiklere göre hesaplanan analitik veriler Çizelge 4.6 da gösterilmiştir. Ci5 için gözlenebilir sınırları (detection limit, LOD) =  $3Sb/m$  ve tayin sınırı (quantification limit, LOQ) =  $10Sb/m$  olarak hesaplanmıştır.  $Sb$ , kalibrasyon grafiği kesim noktasının standart sapması ve  $m$ , kalibrasyon grafiğinin eğimidir.  $n$  ise tekrarlanan deney sayısıdır (Zhu et al. 2004). Yöntemin kesinliği için, pepsin ve tripsin ile yapılan deneylerde  $1.18 \times 10^{-5}$  M Ci5 için tekrarlanan sonuçlardan ( $n=4$ ) elde edilen bağıl standart sapma (BSS), pepsin için % 3.98 ve tripsin için % 3.83 olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.6.** Enzim ortamında Ci5 tayini için bulunan analitik veriler.

	<b>Tripsin</b>	<b>Pepsin</b>
Ci5 doğrusal çalışma aralığı (M)	2.38 – 28.0 x10 <sup>-6</sup>	2.38 – 28.0x10 <sup>-6</sup>
Kesim noktası standart sapması (Sb)	0.0612	0.2790
Kalibrasyon grafiğinin eğimi (m)	4.33x10 <sup>4</sup>	6.32x104
Deney sayısı (n)	6	8
Gözlenebilme sınırı (LOD) (M)	4.238x10 <sup>-6</sup>	1.324x10 <sup>-5</sup>
Tayin sınırı (LOQ) (M)	1.413x10 <sup>-5</sup>	4.414x10 <sup>-5</sup>
BSS (%)	3.83	3.98

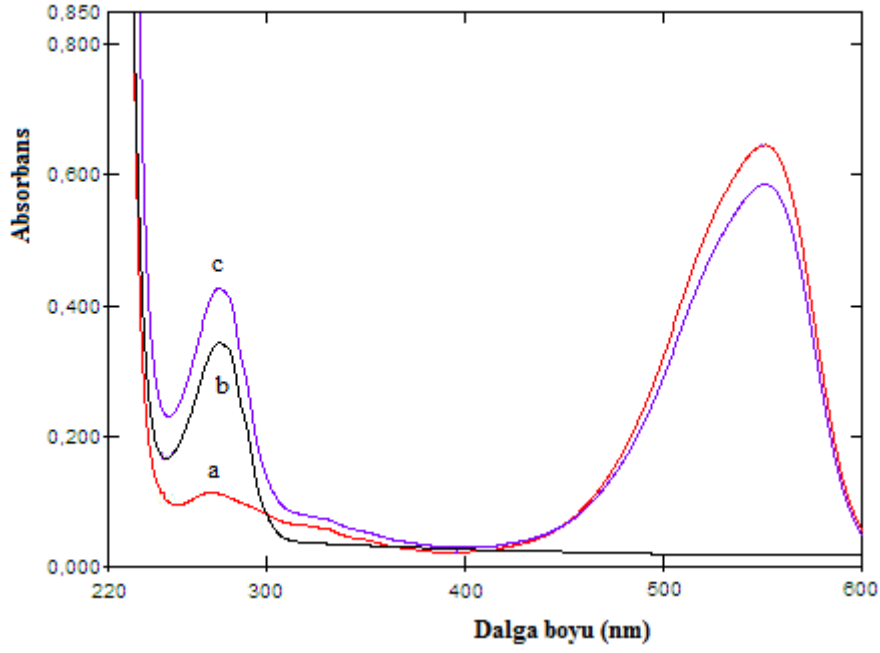
#### **4.1.6. Ci5 -pepsin/tripsin etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları**

Protein-ligand etkileşiminde meydana gelen kompleks oluşumu UV-görünür bölge absorpsiyon yönteminde ve proteinin yapısındaki konformasyonel değişiklikleri incelemesinde kullanılır (Li and Li, 2016). Ci5-pepsin/tripsin etkileşiminden elde edilen absorpsiyon spektrumları [Şekil 4.9](#) ve [Şekil 4.10](#) da gösterilmektedir. pH 2.0' de kaydedilen serbest haldeki 1.0x10<sup>-5</sup> M pepsin, 1.0x10<sup>-5</sup> M Ci5 ve bu derişimlerin 1:1 olduğu absorpsiyon spektrumları [Şekil 4.9.](#) da görülmektedir. 552 nm ve 371 nm'de izlenen Ci5 'e ait olan iki absorpsiyon piklerinde azalma izlenmiştir. Ci5-pepsin karışım spektrumu incelendiğinde pepsine ait 275 nm'deki pikin absorpsiyonunda artış gözlenmiştir. 1.0x10<sup>-5</sup> M pepsin içeren çözeltiye artan derişimlerde Ci5 eklenmesiyle elde edilen spektrumlar [Ek-2](#) de verilmiştir ve 275 nm'de absorpsiyonda artış görülmüştür.



**Şekil 4.9.** Ci5 ile pepsin etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları (1:1),  
**(a)**  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5,  
**(b)**  $1.0 \times 10^{-5}$  M pepsin,  
**(c)**  $1.0 \times 10^{-5}$  M -  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5-pepsin karışımı.

Şekil 4.10 de, pH 7.4' de kaydedilen serbest haldeki  $1.0 \times 10^{-5}$  M tripsin,  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5 ve bu derişimlerin 1:1 olduğu absorpsiyon spektrumları görölmektedir. 552 nm ve 273 nm'de Ci5'in iki absorpsiyon piki bulunmaktadır. Ci5-tripsin karışım spektrumuna bakıldığında, Ci5'e ait 552 nm'de absorpsiyon şiddetinde azalma görölmüştür. Tripsinin 273 nm'deki absorpsiyon pikinin Ci5 varlığında arttığı görölmektedir.  $1.0 \times 10^{-5}$  M tripsin içeren çözeltiye artan derişimlerde Ci5 eklenmesiyle elde edilen spektrum Ek-2 de görölmektedir ve 273 nm'deki pikin arttığı görölmektedir. Absorbans değerlerinde meydana gelen değişiklikler Ci5-pepsin/tripsin arasında etkileşim olduğu ve temel seviyede bir kompleks oluşumunu (Ma et al. 2017) göstermektedir.

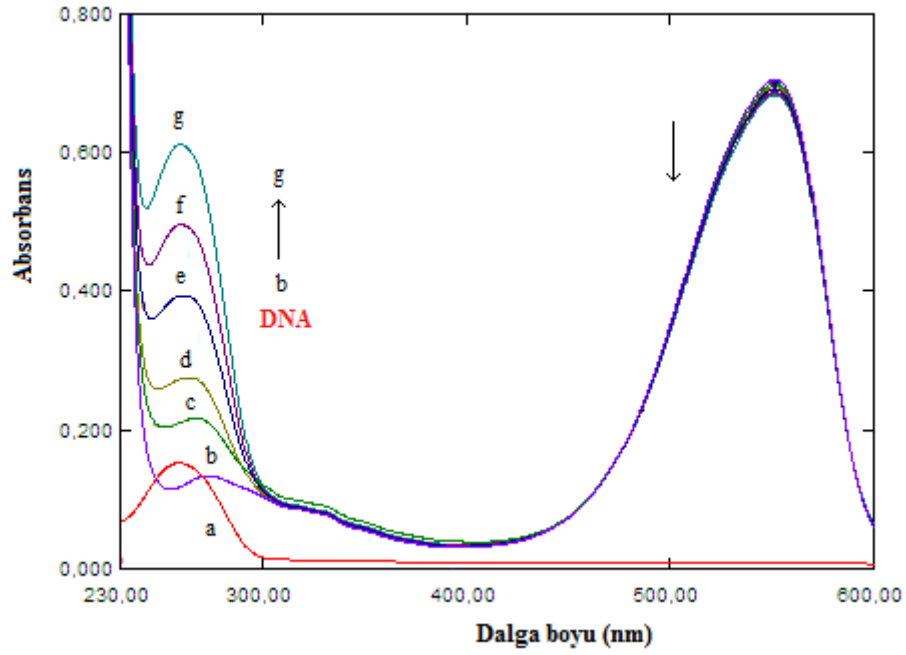


**Şekil 4.10.** Ci5 ile tripsin etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları (1:1),  
 (a)  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5,  
 (b)  $1.0 \times 10^{-5}$  M tripsin,  
 (c)  $1.0 \times 10^{-5}$  M- $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5-tripsin karışımı.

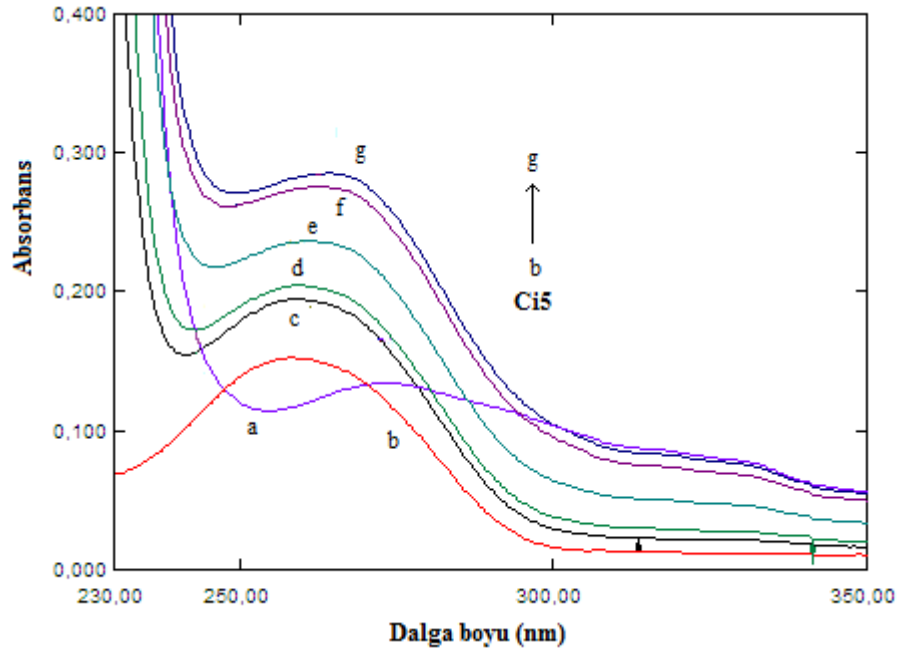
#### 4.1.7. Ci5 -DNA etkileşiminin absorpsiyon çalışmaları

UV-vis absorpsiyonu, proteinlerde olduğu gibi DNA ile küçük bir molekül arasında bir kompleks oluştuğunda absorpsiyon ve pik konumundaki değişiklikleri gösteren etkili bir yöntemdir. Bu durumda DNA'nın absorpsiyon spektrumu, çift sarmal yapısıyla ilişkili hiperkromik ve hipokromik etkiler gösterir. Absorpsiyonun hiperkromizm ve maviye kayması, elektrostatik, oluk bağlanması vb. kovalent olmayan etkileşimler nedeniyle DNA dubleks sekonder yapısının hasar gördüğüne işaret eder. Öte yandan, hipokromizm ve absorpsiyonun kırmızı kayması, sarmal eksenindeki DNA büzülmesini ve DNA üzerindeki konformasyonel değişimi ile interkalasyon bağlanmayı ifade eder (Shahabadi, Falsafi and Maghsudi, 2017). Şekil 4.11,  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5 bileşiğinin, 298 K ve pH 7.4, PBS içinde, ctDNA'nın varlığında ve yokluğunda kaydedilen absorpsiyon spektrumlarını göstermektedir. Ci5'in, 275 nm dalgaboyundaki absorpsiyon pikinin ctDNA'nın artan miktarlarda eklenmesiyle ( $0-2.97 \times 10^{-5}$  M derişim aralığı), maviye kaydığı (~10 nm) görülmektedir. Bu durum DNA ile Ci5 bileşiği arasında, oluk bağlama türü bir etkileşimin varlığını göstermektedir. Şekil 4.12,  $1.0 \times 10^{-5}$  M DNA üzerine artan derişimde Ci5 çözeltisi eklendiğinde elde edilen absorpsiyon spektrumlarını göstermektedir.

DNA'nın 260 nm dalgaboyundaki absorpsiyon pikinin Ci5'in artan miktarlarda eklenmesiyle, absorpsiyon şiddetinde artış izlenmektedir.



**Şekil 4.11.**  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5 (spektrum b) ile DNA etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen DNA derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 6.0; 12.0; 17.9; 23.8; 29.7 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a:  $1.0 \times 10^{-5}$  M DNA).



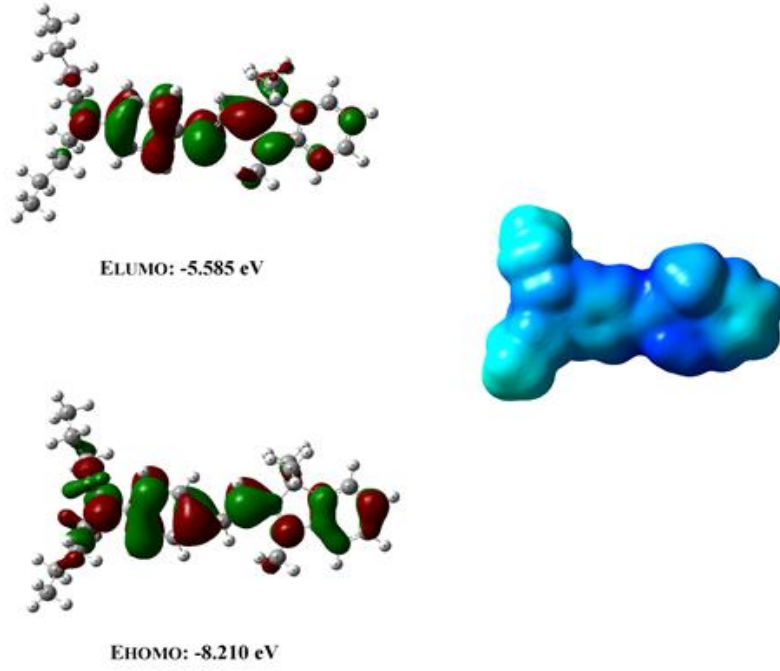
**Şekil 4.12.**  $1.0 \times 10^{-5}$  M DNA (spektrum b) ile Ci5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen Ci5 derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 2.38; 4.75; 7.11; 9.46; 11.8 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a:  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5).

#### 4.1.8. Ci5-pepsin/tripsin/DNA moleküler kenetlenme çalışmaları

Ci5 bileşiği, DFT / B3LYP/ 6-31+G (d, p) seviyesinde optimize edilmiştir. Aynı seviyede, bileşiğin sınır (frontier) moleküler orbitalleri olan HOMO ve LUMO ile moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyi (MEPS) haritası Şekil 4.13 'de gösterilmiştir. En yüksek dolu moleküler orbitale HOMO ve en düşük boş moleküler orbitale LUMO denir ve enerjileri kimyasal tepkime için önemlidir. HOMO enerjisi ve LUMO enerjisi sırasıyla elektron verme ve elektron alma eğilimindedir. HOMO'nun enerjisi iyonlaşma potansiyeli (I), LUMO enerjisi elektron ilgisi (A) ile ilişkilidir. Aynı zamanda  $\pi$ -elektron sistemlerinde reaktif konumu tahmin etmek için sınır elektron yoğunluğu tarafından kullanılır ve konjuge sistemdeki çeşitli reaksiyon türlerini açıklar (Mary et al. 2015(a)). Her ikisinde, bileşikteki elektriksel özellikler ve kimyasal aktivitelerde önemli rol oynar (Shafieyoon, Mehdipour and Mary, 2019). HOMO ve LUMO orbitali arasındaki enerji farkı, elektron iletkenliğinin bir ölçüsüdür. Bu yüzden moleküler ve elektriksel taşıma özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan parametredir. HOMO ve LUMO enerji değerleri ile maddeye ait kimyasal potansiyel, elektronegatiflik, elektrofilik indeks, sertlik ve yumuşaklık (Soudani et al. 2021) gibi özellikler hesaplanabilir. HOMO ve LUMO orbitallerinin enerjisi, bileşiklerin kararlı olmasından ve elementlerine kendiliğinden ayrılmadığı için negatiftir. Kimyasal yumuşaklık ve sertlik, kimyasal sistemlerin davranışını tahmin etmede ve kimyasal sistemin kararlılığını belirlemede kullanılır. Aynı zamanda kimyasal yumuşaklık, düşük kimyasal reaktivite ile ilgilidir. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi HOMO ve LUMO arasındaki enerji farkı 2.625 eV 'tur. HOMO ve LUMO'nun yörünge enerjileri kullanılarak iyonlaşma enerjisi,  $I = -E_{\text{HOMO}} = 8.210 \text{ eV}$  ve elektron ilgisi  $A = -E_{\text{LUMO}} = 5.585 \text{ eV}$ 'tur. Sertlik,  $\eta = (I - A)/2 = 1.313$ ; kimyasal potansiyeli,  $\mu = -(I + A)/2 = -6.898$ ; elektrofilik indeksi  $\omega = \mu^2/2\eta = 18.12 \text{ eV}$  ve yumuşaklık  $\zeta = 1/2\eta = 0.38 \text{ eV}$  olarak bulunmuştur.

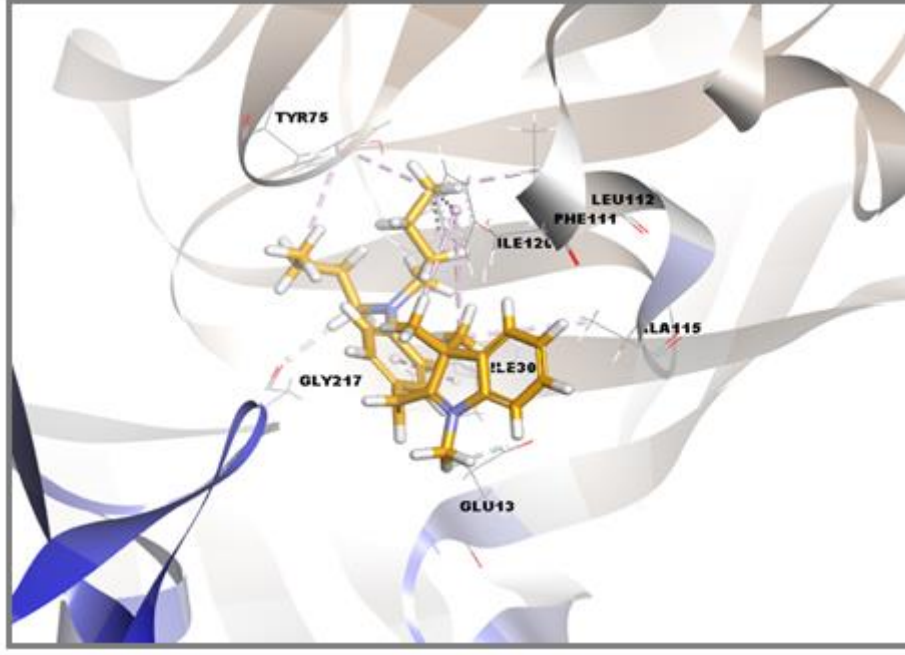
Moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyi (MEPS), bir moleküler sistemin çevresiyle etkileşimini, elektrofilik ve nükleofilik tepkimelerde kimyasal sistemlerin reaktivitesini, biyolojik tanıma çalışmalarında ve hidrojen bağı etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılır. İzoelektron yoğunluk yüzeyi haritalama yöntemi olan MEPS ,yüzeyi ve bağıl polariteyi anlamak için kullanılan görsel bir yöntemdir (Mary et al. 2015(b)). Şekil 4.13'de gösterildiği gibi Ci5 bileşiğinin negatiften pozitif yükleri kırmızıdan maviye tanımlanır. Mevcut bileşiğe, ana yapıdaki azot atomlarından kaynaklanan mavi tonları tamamen hakimdir.



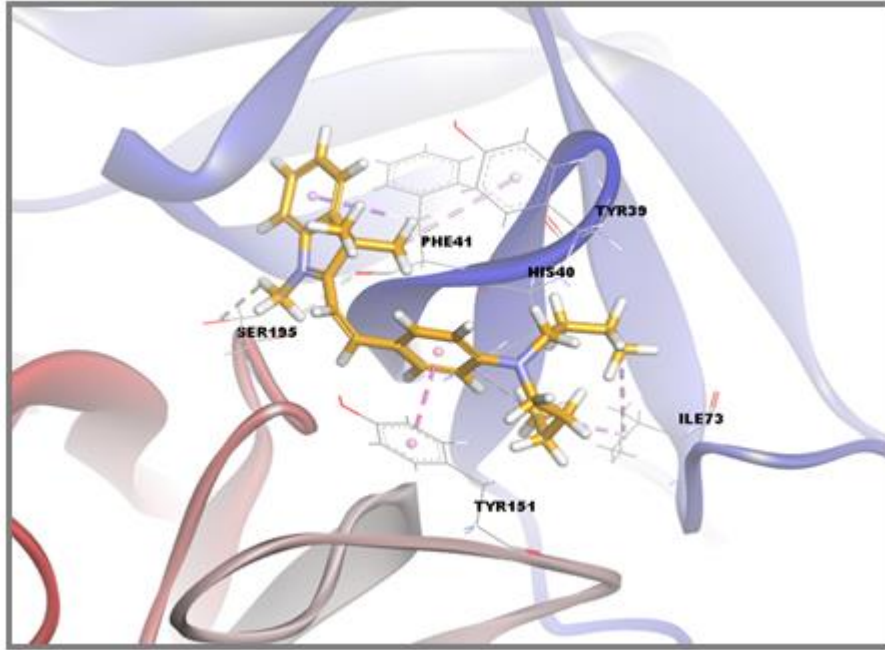


**Şekil 4.13.** Ci5 bileşiğinin HOMO ve LUMO orbitalleri (sol tarafta), moleküler elektrostatik potansiyel yüzey (MEPS) haritasının (sağ tarafta) gösterimi.

Şekil 4.14 de Ci5 bileşiğinin, hedef molekül olan pepsinle etkileşimi incelendiğinde, pepsinin Glu13 ve Gly217 uçları ile iki zayıf karbon H bağı ve Ala115, Leu112, Ile120, Tyr75, Phe111 ve Ile30 uçları ile dokuz hidrofobik etkileşime girdiği gözlenmiştir. Diğer hedef molekül olan tripsinin, Ci5 bileşiği ile etkileşimine ait 3D görünümü Şekil 4.15’de verilmiştir. Tripsinin Ser195, Phe41 uçları ile iki zayıf karbon H bağına ve Phe41, Tyr151, Ile73, Tyr39 ve His40 uçları ile altı hidrofobik etkileşime girdiği gözlenmiştir.

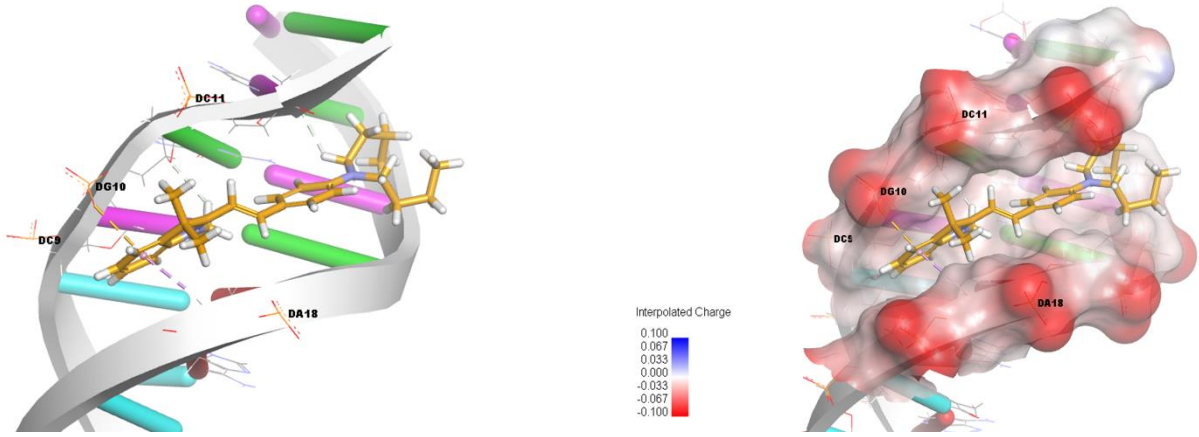


Şekil 4.14. Pepsinin bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşiğinin (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.



Şekil 4.15. Tripsinin bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşiğinin (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.

Ci5'in kenetlenme çalışmaları DNA ile etkileşiminin 3D görünümü Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Ci5 bileşiği, DNA'nın A:DG10 nükleotiti ile elektrostatik etkileşim; DNA'nın A: DC9, A: DG10 ve A: DC11 nükleotitleri ile zayıf karbon H bağ ve B: DA18 nükleotiti ile hidrofobik etkileşim göstermiştir. Kenetlenme analizi sonuçları ve detayları Ek-3'te Çizelge E1'de verilmiştir.



Şekil 4.16. DNA'nın bağlanma bölgesindeki Ci5 bileşiğinin (turuncu, çubuk model) kenetlenme etkileşimlerinin 3D görünümü.

Moleküler kenetlenme çalışmalarından elde edilen bağlanma enerjileri Çizelge 4.7 de verilmiştir. Ci5-pepsinin bağlanma enerjisinin (-7.50 kcal/mol) en düşük değerde olması Ci5'in pepsin için en iyi bağlanma afinitesine sahip olduğunu göstermektedir. Ci5'in tripsin ile ikinci, DNA ile üçüncü iyi bağlanma afinitesine (-6.90 ve -6.80 kcal/mol) sahip olduğunu göstermektedir. Termodinamik çalışmalardan elde edilen parametreler ve deneysel kısımda kompleks oluşumların etkileşim türleri moleküler kenetlenme sonuçları ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.7. Ci5-pepsin/tripsin/DNA ile bağlanma enerjileri.

	İnhibisyon Sabiti, Ki (nM)	Bağlanma Enerjisi (kcal mol <sup>-1</sup> )	RMSD
Ci5-Pepsin	114.93	-7.50	0.0002
Ci5-Tripsin	399.21	-6.90	0.0940
Ci5- DNA	13979	-6.80	0.4260

## 5. YORUM

Bu tez çalışmasında, Ci5 kısaltmasıyla verilen katyonik stiril indolyum boya sentezlenmiştir ve spektral özellikleri karakterize edilmiştir. Ci5'in pepsin/tripsinle etkileşimi absorpsiyon, florimetrik titrasyon, moleküler kenetlenme, FTIR ve CD yöntemleri ile incelenmiştir ve sonuçlar aşağıda verilmiştir:

- Florimetrik titrasyon çalışmalarında , tripsin ve pepsin üç farklı sıcaklıkta (298, 303 ve 310 K) incelenmiştir. Ci5 ile pepsin/tripsin floresans sönümünden elde edilen verilerle Stern-Volmer grafikleri çizilerek sıcaklık artışı ile  $K_{sv}$  (sönüm sabiti) değerlerinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Bundan dolayı Ci5 bileşiği ile pepsin/tripsin etkileşiminin statik sönüm mekanizması ile gerçekleştiği ve kompleks oluşumuna dayalı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Ci5 bileşiğinin pepsin/tripsin ile farklı sıcaklıklardaki  $K_a$  (bağlanma sabiti) ve  $n$  (bağlanma kısım sayısı) değerleri çift logaritma grafiği çizilerek hesaplanmıştır. Sıcaklığın artmasıyla  $K_a$  değerlerinde azalma meydana gelmesi komplekslerin kararlılıklarının azaldığını göstermiştir.
- Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen, Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimindeki bağlanma türleri van't Hoff eşitliği kullanılarak termodinamik parametrelerden bulunmuştur.  $\Delta G$ 'nin negatif olması, Ci5'in pepsin/tripsin ile bağlanma mekanizmasının kendiliğinden ve  $\Delta H$ 'nin negatif olması ise bağlanmanın ekzotermik olduğunu göstermiştir. Ci5-pepsin etkileşiminde, negatif  $\Delta H$  ve pozitif  $\Delta S$  değerleri, hidrofobik etkileşimin yanında elektrostatik kuvvetlerin de rol aldığı gözlenmiştir. Ci5 ile tripsin etkileşiminde ise negatif  $\Delta S$  ve negatif  $\Delta H$  değerleri, van der Waals kuvvetlerinin ve hidrojen bağlarının bağlanmada önemli rol oynadığını göstermiştir.
- Ci5 ile pepsin/tripsin etkileşimi UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları ile incelenmiştir. Her iki enzimedeki, artan miktarlarda Ci5 ilave edildiğinde, 275 nm ve 273 nm dalga boylarında absorbans pik şiddetlerinde artış olduğu gözlenmiştir. Absorbans pik şiddetlerindeki artış Ci5 ile pepsin/tripsin arasında bir etkileşim olduğunu, UV-görünür bölge çalışmaları ile floresans çalışmalarının birbiri ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir.
- Ci5'in 273 nm'sinde absorpsiyon pikinin ctDNA'nın artan miktarlarda eklenmesiyle (0'dan  $2.97 \times 10^{-5}$  M derişime), maviye kaydığı (~10 nm)

görülmüştür. Bu, oluk (groove) bağlama türü ile DNA sarmalına bağlanan Ci5 bileşiği arasında etkileşim olduğunu göstermiştir.

- FTIR çalışmalarına göre Ci5'in pepsin/tripsine bağlanması sonucu enzimlerin amid bandlarının absorpsiyon piklerinde kayma gözlenmiştir.
- CD çalışmaları sonucunda, enzimlere Ci5 bağlanması sonucu proteinin ikincil yapısında değişiklik meydana geldiği ve  $\alpha$ -heliks içeriğinin azaldığı gözlenmiştir. Pepsinde  $\alpha$ -heliks yüzdesi % 53.55 den Ci5 bağlanmasıyla % 52.29'a, tripsinde ise, %73.90 dan %70.05'e inmiştir. Böylece  $\alpha$ -heliks pepsin için % 1.26 ve tripsin için %3.85 azalma meydana gelmiştir.
- FRET çalışmaları sonucunda, molekül çiftleri arasındaki kritik uzaklıklar  $R_0$  ve moleküller arası uzaklık olan  $r$  değerleri hesaplanmıştır. Ci5- pepsin için,  $R_0=2.64$  nm ve  $r= 3.53$  nm; Ci5-tripsin için,  $R_0= 2.58$  nm ve  $r= 3.27$  nm olarak bulunmuştur. Förster teorisine göre, Ci5 bileşiğinin pepsin ve tripsinle etkileşimi için bulunan  $r$  değerlerinin 10 nm den küçük olması Ci5/pepsin ve Ci5/tripsin çiftleri arasında ışısız enerji aktarımı olduğu göstermiştir. Ci5-pepsin/tripsin etkileşimine ait  $r$  değerlerinin, %50 enerji transferindeki kritik uzaklık olan  $R_0$  değerinden büyük olması floresans sönümün, statik sönüm mekanizmasına göre gerçekleştiğini göstermiştir.
- Moleküler kenetlenme çalışmalarıyla Ci5 ile pepsin/tripsin arasındaki etkileşimler incelendiğinde; hedef molekül olan pepsinin etkileşimi incelendiğinde, pepsinin Glu13 ve Gly217 uçları ile iki zayıf karbon H bağı ve Ala115, Leu112, Ile120, Tyr75, Phe111 ve Ile30 uçları ile dokuz hidrofobik etkileşime girdiği gözlenmiştir. Diğer hedef molekül olan tripsinin, Ser195 ve Phe41 uçları ile iki zayıf karbon hidrojen bağı; Phe41, Tyr151, Ile73, Tyr39 ve His40 uçları ile altı hidrofobik etkileşime girdiği gözlenmiştir. Ci5 bileşiği , DNA'nın A:DG10 nükleotiti ile bir elektrostatik etkileşim; DNA'nın A: DC9, A: DG10 ve A: DC11 nükleotitleri ile üç zayıf karbon H bağı ve B:DA18 nükleotiti ile bir hidrofobik etkileşim göstermiştir.
- Bağlanma enerjileri; Ci5-pepsin için -7.50 kcal/mol; Ci5-tripsin için -6.90 kcal/mol ve Ci5-DNA için -6.80 kcal/mol'dür. Bu durum Ci5'in pepsin için en iyi afiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Ci5'in, tripsin ile ikinci ve DNA ile üçüncü iyi bağlanma afinitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Etkileşim türlerinin açıklanmasında, moleküler kenetlenme çalışmaları ve termodinamik parametrelerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Ci5-pepsin etkileşiminde elektrostatik kuvvet ve hidrofobik etkileşimin yanında hidrojen bağının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ci5-tripsin etkileşiminde hidrofobik etkileşimlerin rol oynadığı görülmüştür. Ci5-DNA etkileşiminde ise elektrostatik kuvvet ve hidrofobik etkileşimin yanında hidrojen bağının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

- Deneysel çalışmalarda Ci5'in pepsin ve tripsin varlığındaki tayini için elde edilen analitik verilere göre gözlenebilirlik sınırı (LOD);pepsin varlığında  $1.324 \times 10^{-5}$  M ve tripsin varlığında ise  $4.238 \times 10^{-6}$  M'dır. Tayin sınırı (LOQ); pepsin varlığında  $4.414 \times 10^{-5}$  M ve tripsin varlığında  $1.413 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak tez kapsamında yeni sentezlenmiş stiril indolyum türevi boyanın DNA/enzim bağlanma özellikleri, moleküler kenetlenme çalışmaları ve çoklu spektroskopik yöntemler ile incelenmiştir. Hem spektral hem de teorik sonuçlar katyonik stiril boya türevleri ile benzer biyomolekül yapılarının etkileşimlerinin açıklanmasında ve yeni sentezlenen bileşiklerin özelliklerinin belirlenmesi ve tasarlanması konularında yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Accelrys Software Inc. Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5 Accelrys Software Inc, San Diego, **2013**.

Agarwal S., Mehrotra R., An overview of Molecular Docking. *JSM Chemistry*, 4, 1024, **2016**.

Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101, 157-170, **2009**.

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*, 61 629-636, **2005**.

Bi, S., Zhang, H., Qiao, C., Sun, Y., Liu, C., Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A*, 69, 123-129, **2008**.

Botti, V., Cesaretti, A., Ban, Z., Crnolatac, I., Consiglio, G., Elisei, F., Piantanida, I., Fine structural tuning of styryl-based dyes for fluorescence and CD-based sensing of various ds-DNA/RNA sequences. *Organic Biomolecular Chemistry*, 17, 8243, **2019**.

Chai, J., Xu, Q., Dai, J., Liu, R., Investigation on potential enzyme toxicity of clenbuterol to trypsin. *Spectrochimica Acta Part A*, 105, 200-206, **2013**.

Chaires J.B., Drug-DNA interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 314-320, **1998**.

Dar, A.M., Mir, S., Molecular docking: Approaches, types, applications and basic challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 8(2), 1-3, **2017**.

Deligeorgiev, T., Vasilev, A., Kaloyanova, S., Vaquero, J.J. Styryl dyes-synthesis and applications during the last 15 years. *Society of Dyers and Colourists, Coloration Technology*, 126, 55-80, **2010**.

Ditmangklo, B., Taechalertpaisarn, J., Siriwong, K., Tirayut Vilaivan, T., Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidiny PNA probes for the detection of base mutations in DNA. *Organic Biomolecular Chemistry*, 17, 9712, **2019**.

Fan, J., Fu, A., Zhang L., Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89, **2019**.

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**.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., et al., Gaussian09, RevisionE.01, Gaussian, Inc. Wallingford, CT, USA, **2009**.

Förster, T., Intermolecular energy migration and fluorescence, *Annals of Physics*, 2, 55-75, **1948**.

Fu Y., Zhao J., Chen Z., Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: A case of oligopeptide binding protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, Article ID 3502514, **2018**

Garrett, R.H., Grisham, C.M., Biochemistry, Second Edition, Cengage, **1999**.

Geng, S., Liu, G., Li, W., Cui, F., Molecular interaction of ctDNA and HSA with sulfadiazine sodium by multispectroscopic methods and molecular modeling. *Luminescence*, 28, 785-792, **2013**.

Gerwert, K., Kötting, C., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2010**.

Gonçalves, S. T., Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes, *American Chemical Society*, 109, 190-212, **2009**.

Gupta, S.P., Gupta, S.D., Cancer-Leading Proteases Structures, Functions, and Inhibition. Elsevier, Chapter 1, India, **2020**.

Haris, P.I., Severcan, F., FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 207-221, **1999**.

Hunger, K., Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications, Wiley, Germany, **2003**.

Jachak, M., Khopkar, S., Chaturvedi, A., Joglekar, A., Shankarling, G., Synthesis of novel viscosity sensitive pyrrolo-quinaldine based styryl dyes: Photophysical properties, electrochemical and DFT study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 397, 112557, **2020**.

Kelly, S.M., Price N.C., Circular Dichroism to Study Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*, 20.10.1-20.10.18, **2006**.



Kessel, A., Ben-Tal, N., Introduction to Proteins Structure, Function, and Motion. *CHAPMAN & HALL/CRC Mathematical and Computational Biology Series*, **2011**.

Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3<sup>rd</sup> Edn. Springer, New York, **2006**.

Leskova, M., Bazel, Y.R., Torok, M., Studenyak, Y., Structure and properties of 2-[(E)-2-(4-dipropylaminophenyl)-1-ethenyl]-1,3,3-trimethyl-3-indolium chloride. *Chemical Papers*, 67, 415-422, **2013**.

Li, Q., Seeger, S., Multidonor deep-UV FRET study of protein-ligand binding and its potential to obtain structure information. *Journal of Physical Chemistry, B* 115, 13643-13649, **2011**.

Li, X., Geng, M., Probing the binding of procyanidin B3 to trypsin and pepsin: A multi-technique approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 168-178, **2016**.

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

Li, X., Liu, H., Wu, X., Xu, R., Mad, X., Zhang, C., Song, Z., Peng, Y., Ni, T., Xu, Y., Exploring the interactions of naringenin and naringin with trypsin and pepsin: Experimental and computational modeling approaches. *Spectrochimica Acta Part A*, 258, 119859, **2021**.

Li, Y., Wei, F., Lu, Y., He, S., Zhao, L., Zeng X., Novel mercury sensor based on water soluble styrylindolium dye, *Dyes and Pigments*, 96, 424-429, **2013**.

Lian, S., Wang, G., Zhou, L., Yanga, D., Fluorescence spectroscopic analysis on interaction of fleroxacin with pepsin. *Luminescence*, 28, 967-972, **2013**.

Lilley, D.M., Wilson, T.J., Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 507-517, **2000**.

Liu, J., Sun, Y-Q., Huo, Y., Zhang, H., Wang, L., Zhang, P., Song, D., Shi Y., Guo W., Simultaneous fluorescence sensing of Cys and GSH from different emission channels, *Journal of the American Chemical Society*, 136, 574-577, **2014**.

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, B.-S., Cheng, X., Zhang, H.-C., Ma, L.-H., Wang, C.-D., Spectroscopic study and application of the interaction mechanism of meloxicam with trypsin. *Spectroscopy Letters*, 52, 321-329, **2019**.

Lopez-Otin, C., Bond, J.S., Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 30433-30437, **2008**.

Ma, X., He, J., Huang, Y., Xiao Y., Wang Q., Li H., Investigation and comparison of the binding between tolvaptan and pepsin and trypsin: Multi-spectroscopic approaches and molecular docking. *Journal of Molecular Recognition*, 30:e2598, **2017**.

Martin S. R., Schilstra M. J., Circular Dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods in Cell Biology*, 84, 263-293, **2008**.

Mary, Y.S., Varghese, H.T., Panicker, C.Y., Girisha, M., Sagar, B. K., Yathirajan, H.S., Al-Saadi, A.A., Alsenoy, C.V., Vibrational spectra, HOMO, LUMO, NBO, MEP analysis and molecular docking study of 2,2-diphenyl-4-(piperidin-1-yl)butanamide. *Spectrochimica Acta Part A*, 150, 543-556, **2015(a)**.

Mary, Y.S., Varghese, H.T., Panicker, C.Y., Thiemann, T., Al-Saadi, A. A., Popoola, S.A., Alsenoy, C.V., Jasem, Y.A., Molecular conformational analysis, vibrational spectra, NBO, NLO, HOMO-LUMO and molecular docking studies of ethyl 3-(E)-(anthracen-9-yl)prop-2-enoate based on density functional theory calculations. *Spectrochimica Acta Part A*, 150, 533-542, **2015(b)**.

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**.

Metsov, S., Simov, D., Stoyanov, S., Nikolov, P., Photophysical characteristics of some 2-styrylindolium dyes, *Dyes and Pigments*, 13, 11-19, **1990**.

Mohseni-Shahri, F.S., Moeinpour, F., Nosrati, M., Spectroscopy and molecular dynamics simulation study on the interaction of sunset yellow food additive with pepsin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 273-280, **2018**.

Moradi, S., Ahmadi, P., Karami, C., Farhadian, N., Balaei, F., Ansari, M., Shahlaei, M., Evaluation of the effects of isoniazid and rifampin on the structure and activity of pepsin enzyme by multi spectroscopy and molecular modeling methods. *Spectrochimica Acta Part A*, 253, 119523, **2021**.

Moradi, S.Z., Nowroozi, A., Sdarjavadi, K., Moradi, S., Mansori, K., Hosseinzadeh, L., Shahlaei, M., Direct evidences for the groove binding of clomifene to double stranded DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 40-53, **2018**.

Morris, G.M., Lim-Wilby, M., Molecular Docking, *Molecular Modeling of Proteins*, 443, 365-382, **2008**.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791, **2009**.

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. *Luminescence*, 31, 1524-1531, **2016**.

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

Perry, A., Miles, D., An off-the-shelf sensor for colourimetric detection of sulfide. *Tetrahedron Letters*, 57, 5788-5793, **2016**.

Pinto, M.R., 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**.

Promchat, A., Rashatasakhon, P., Sukwattanasinitt, M., A novel indolium salt as a highly sensitive and selective fluorescent sensor for cyanide detection in water, *Journal of Hazardous Materials*, 329, 255-261, **2017**.

Purdie N., Brittain H.G., Analytical Applications of Circular Dichroism, Chapter 6, *Elsevier*, Amsterdam - London - New York - Tokyo, **1994**.

Rahman A-U., Choudhary M.I., Applications of NMR Spectroscopy, Chapter 6 ,Vol.8, 121-140, **2020**.

Ren G., Sun H., Guo J., Fan J., Li G., Xu S., Molecular mechanism of the interaction between resveratrol and trypsin via spectroscopy and molecular docking. *Food Function*, 10, 3291-3302, **2019**.

Ricci, A., Olejar, K.J., Parpinello, G.P., Kilmartin, P.A., Versari, A., Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50, 407-442, **2015**.

Rose Y., Duarte J.M., Lowe R., et al., RCSB protein data bank: architectural advances towards integrated searching and efficient access to macromolecular structure data from the PDB archive, *Journal of Molecular Biology*, 433 (11) Article ID 166704, **2021**.

Ross, P.D., 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, 20-30, **2011**.

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

Santos, L.H.S., Ferreira, R.S., Caffarena, E.R., Docking screens for drug discovery. *Methods in Molecular Biology*, vol. 2053, Springer, New York, Chapter 2, **2019**.

Sauer, M., Hofkens, J., Enderlein, J., Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *Wiley-WCH*, Germany, **2011**.

Shafieyoon, P., Mehdipour, E., Mary, Y.S., Synthesis, characterization and biological investigation of glycine based sulfonamide derivative and its complex: Vibration assignment, HOMO-LUMO analysis, MEP and molecular docking. *Journal of Molecular Structure* 1181, 244-252, **2019**.

Shahabadi, N., Falsafi, M., Maghsudi, M., DNA-binding study of anticancer drug cytarabine by spectroscopic and molecular docking techniques. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 36, 49-65, **2017**.

Shahabadi, N., Hadidi, S., Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 96, 278-283, **2012**.

Shen, L., Xu, H., Huang, F., Li Y., Xiao, H., Yang, Z., Hu, Z., He, Z., Zeng, Z., Li, Y., Investigation on interaction between Ligupurpuroside A and pepsin by spectroscopic and docking methods. *Spectrochimica Acta Part A*, 135, 256-263, **2015**.

Shi, W., Wang, Y., Zhang, H., Liu, Z., Fei, Z., Probing deep into the binding mechanisms of folic acid with  $\alpha$ -amylase, pepsin and trypsin: An experimental and computational study. *Food Chemistry*, 226, 128-134, **2017**.

Shiraishi, Y., Itoh, M., Hirai, T., Colorimetric response of spiropyran derivative for anions in aqueous or organic media. *Tetrahedron*, 67, 891-897, **2011**.

Shuai, L., Chen, Z., Fei, P., Wang Q., Yang T., Spectroscopic analysis on the interaction of ferulic acid and tetramethylpyrazine with trypsin. *Luminescence*, 29, 79-86, **2014**.

Siddiqui M.F., Khan, M.S., Husain F.M. and Bano B., Deciphering the binding of carbendazim (fungicide) with human serum albumin: A multi-spectroscopic and molecular modelling studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37, 2230-2241, **2019**.

Silva, D., Cortez, C.M., Louro, S.R.W., Chlorpromazine interactions to sera albumins: A study by the quenching of fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A* 60, 1215-1223, **2004**.

Skoog, D.A., Holler, F.J., 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**.

Song, H., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., Liu, D., Shi, D., Zhang, T., Interaction of gallic acid with trypsin analyzed by spectroscopy. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 234-242, **2015**.

Soudani, S., Kaabi, K., Jelsch, C., Mi, J.X., Lefebvre, F., Nasr, C.B., Synthesis, X-ray characterisation, hirshfeld surface and theoretical studies of a novel Cd(II) coordination compound bearing 2,3- pyridinedicarboxylic acid. *Research Square*, pages 1-22, 2021.

Syed, M.M., Doshi, P.J., Kulkarni, M.V., Dhavale, D.D., Kadam N.S., Kate S.L., Doshic, J.B., Sharma, N., Uppuladinne, M., Sonavane, U., Joshi, R., Doshi, S.J., Bhattacharya N., Alizarin interaction with sickle hemoglobin: elucidation of their anti-sickling properties by multi-spectroscopic and molecular modeling techniques. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37, 4614-4631, **2019**.

Tajmir-Riahi, H.A., N'soukpoé-Kossi, C.N., Joly, D., Structural analysis of protein-DNA and protein-RNA interactions by FTIR, UV-visible and CD spectroscopic methods. *Spectroscopy*, 23, 81-101, **2009**.

Toseland, C.P., Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*, 6, 85-95, **2013**.

Udayan, S., Sebastian, M., Vijesh, K.R., Nampoore, V.P.N., Thomas, S., Thermal diffusivity and lifetime studies of styryl 7 dye on DNA-CTMA complex . *Journal of Luminescence*, 194, 428-432, **2018**.

Vasilev, A., Deligeorgiev, T., Gadjev N., Kaloyanova S., Vaquero J.J., Alvarez-Builla J., Baeza A.G., Novel environmentally benign procedures for the synthesis of styryl dyes. *Dyes and Pigments*, 77, 550-555, **2008**.

Volchkov, V.V., Khimich, M.N., Uzhinova, L.D., Uzhinov, B.M., Melnikov M.Y., Gromov, S.P., Vedernikov, A.I., Sazonov, S.K., Alfimov, M.V., Molecular rotors based on styryl dyes. Viscosity dependence of rotation of molecular fragments. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 63, No. 8, 1728-1733, **2014**.

Wang, Y., Han, Q., Zhang, G., Zhang, H., Evaluation of the binding mechanism of iodine with trypsin and pepsin: A spectroscopic and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A*, 230,118036, **2020**.

Ward, O.P., University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada Elsevier, page 571, **2011**.

Williams, M.A., Daviter T., Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications, Mark, A. Williams, Gabor, Mocz and Justin A. Ross, Second Edition, *Methods in Molecular Biology* Cilt 1008, London, United Kingdom, Chapter 1 and 7 , **2013**.

Wu, W-L, Ma, H-L., Huang, M-F., Miao, J-Y., Zhao, B-X., Mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probe based on FRET for bisulfite, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 239-244, **2017**.

Xiao, J., Wei, X., Wang, Y., Liu, C., Fluorescence resonance energy-transfer affects the determination of the affinity between ligand and proteins obtained by fluorescence quenching method. *Spectrochimica Acta Part A*, 74, 977-982, **2009**.

Yao, H., Funada, T., Organic nanoparticles of an extended p-conjugated styryl dye: Modulation of fluorescence peak energy and intensity in the near-infrared (NIR) region. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 330, 140-149, **2016**.

Yu, J., Li, X., Liu, H., Peng, Y., Wang, X., Xu, Y., Interaction behavior between five flavonoids and pepsin: Spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1223, 128978, **2021**.

Zeng, H-j., Yang, D., Hu, G-z., Yang, R., Qu, L-b., Studies on the binding of pepsin with three pyrethroid insecticides by multi-spectroscopic approaches and molecular docking. *Journal of Molecular Recognition*, 29, 476-484, **2016**.

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

Zhang, H-M., Zhou, Q-H., Wang, Y-Q., Studies on the interactions of 2, 4-dinitrophenol and 2, 4-dichlorophenol with trypsin. *Journal of Fluorescence*, 20, 507-516, **2010**.

Zhao, L., Guo, R., Sun, Q., Lan, J., Li, H., Interaction between azo dye Acid Red 14 and pepsin by multispectral methods and docking studies. *Luminescence*, 32, 1123-1130, **2017**.

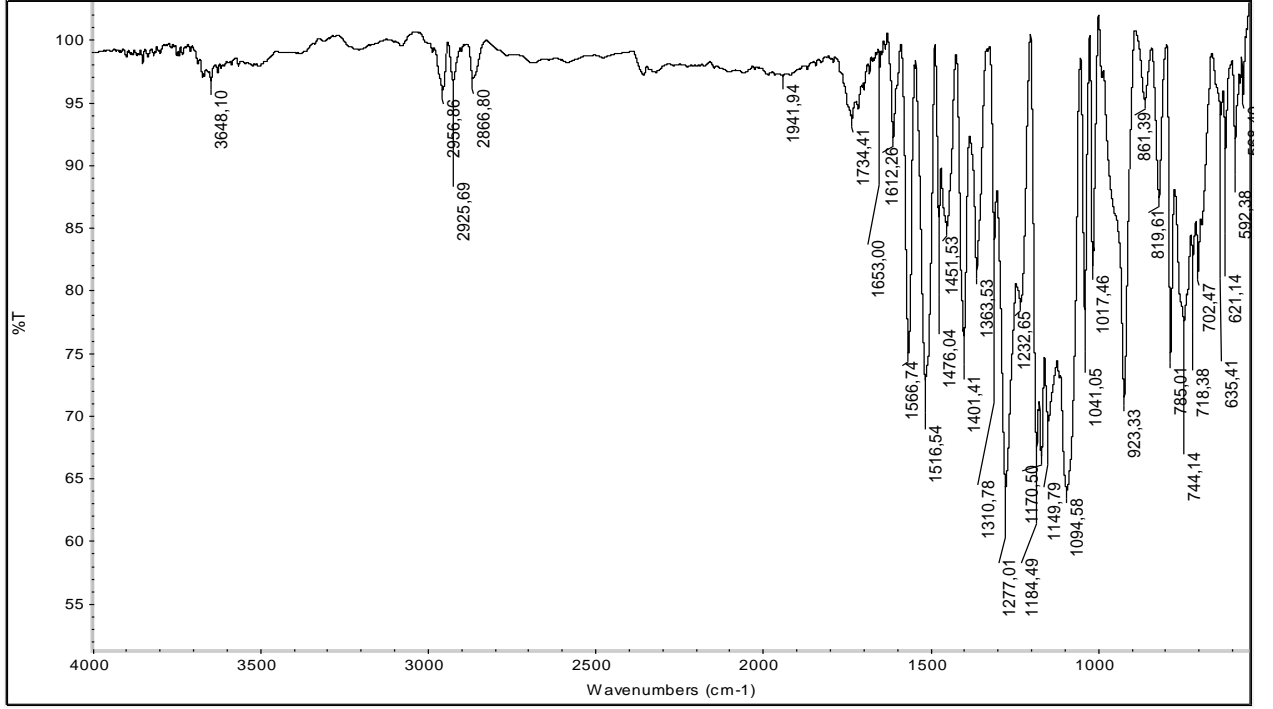
Zhou, H., Bi, S., Wang, Y. and Zhao, T., Characterization of the binding of paylean and DNA by fluorescence, UV spectroscopy and molecular docking techniques. *Luminescence*, 31, 1013-1019, **2016**.

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, 3173-3179, **2004**.

Zhu, S., Bai, X., Zhu, J., Li, W., Wang, B., Multi-spectral techniques and molecular docking to investigation of the interaction between ferulic acid and pepsin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 251 ,119442, **2021**.

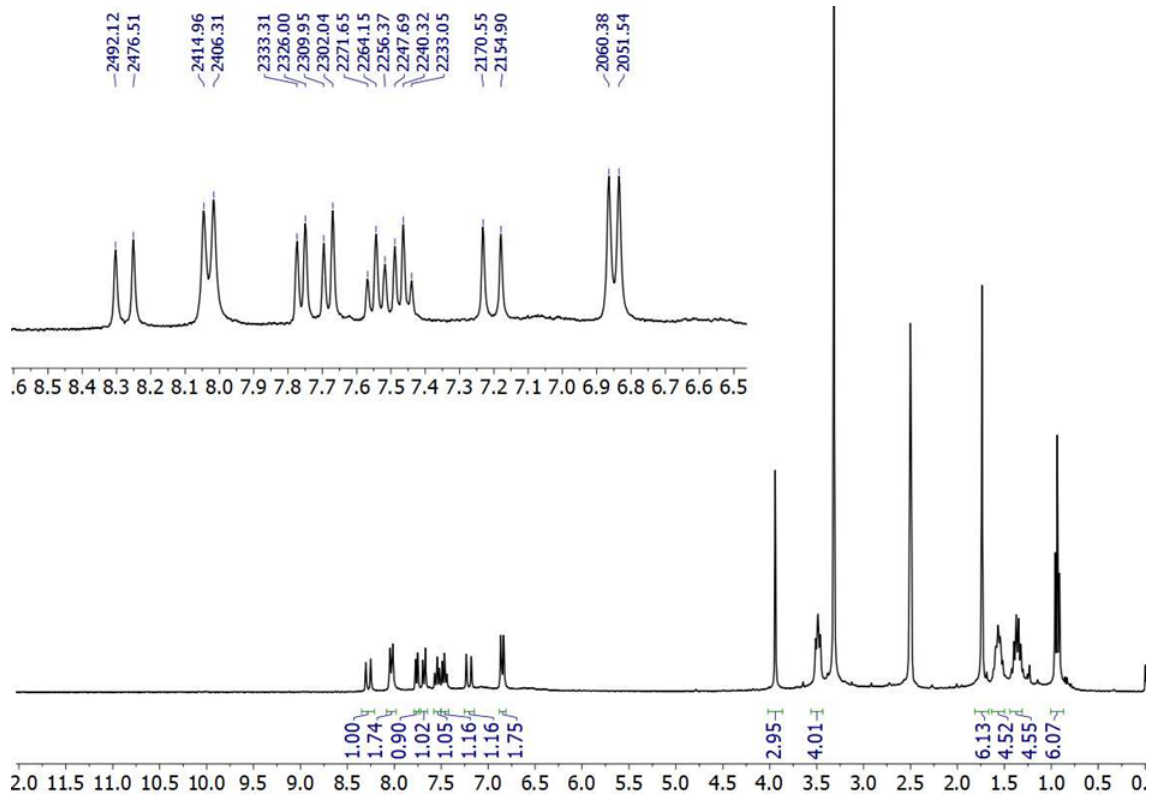
## EKLER

### EK 1. Ci5 bileşğine ait spektrumlar:

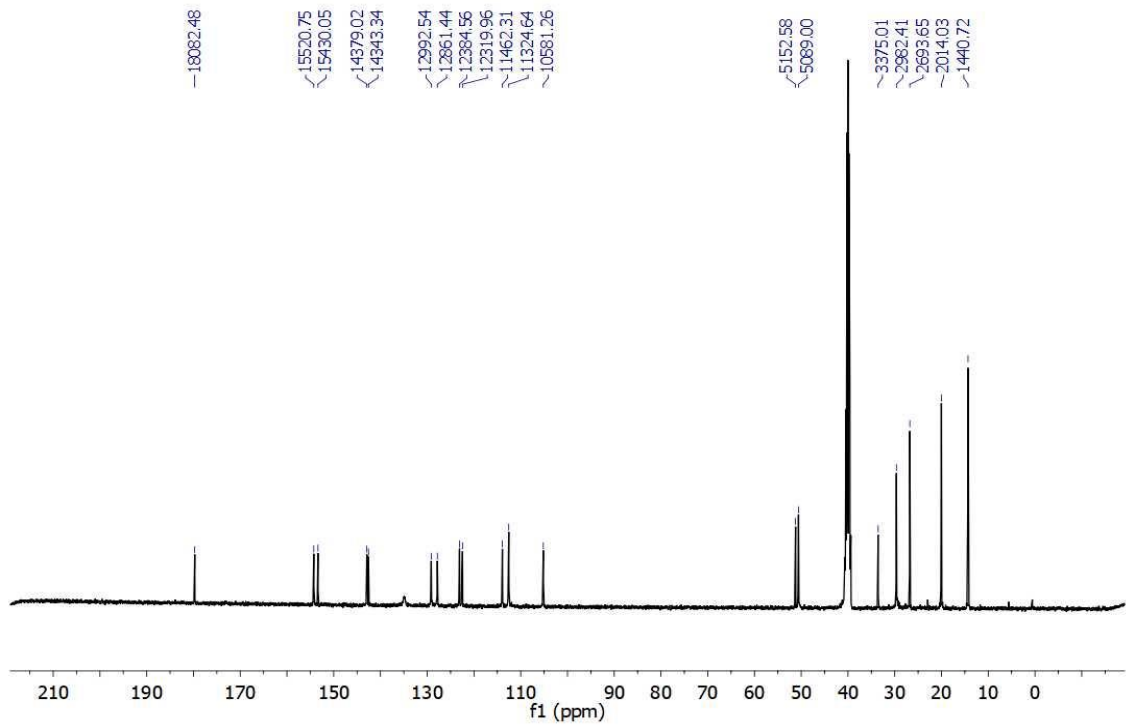


Şekil E1. Ci5 bileşğinin FTIR spektrumu.

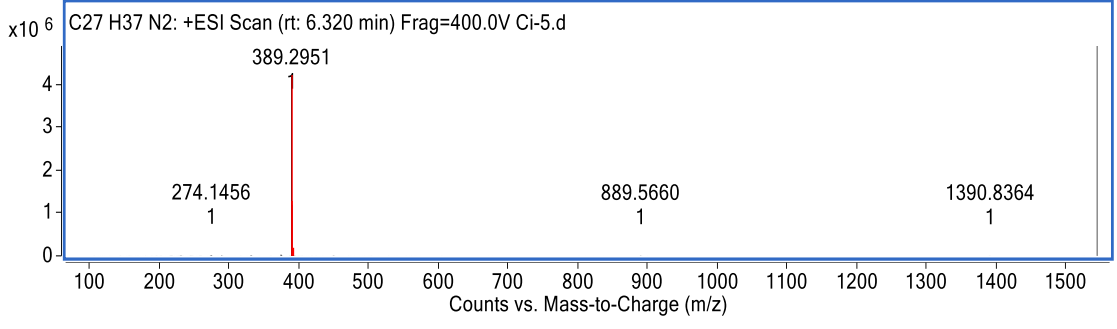




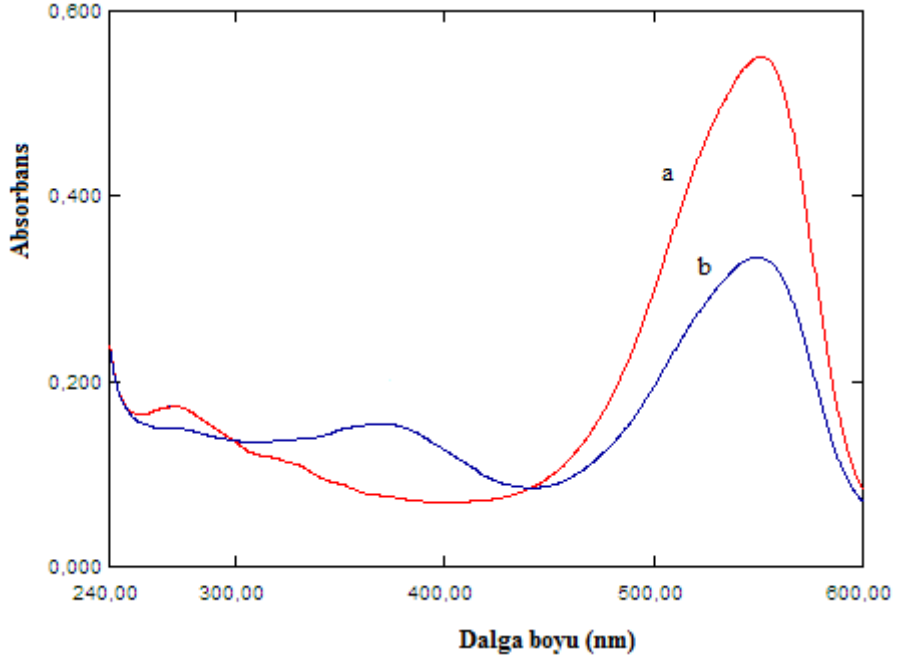
Şekil E2. Ci5 bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu.



Şekil E3. Ci5 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

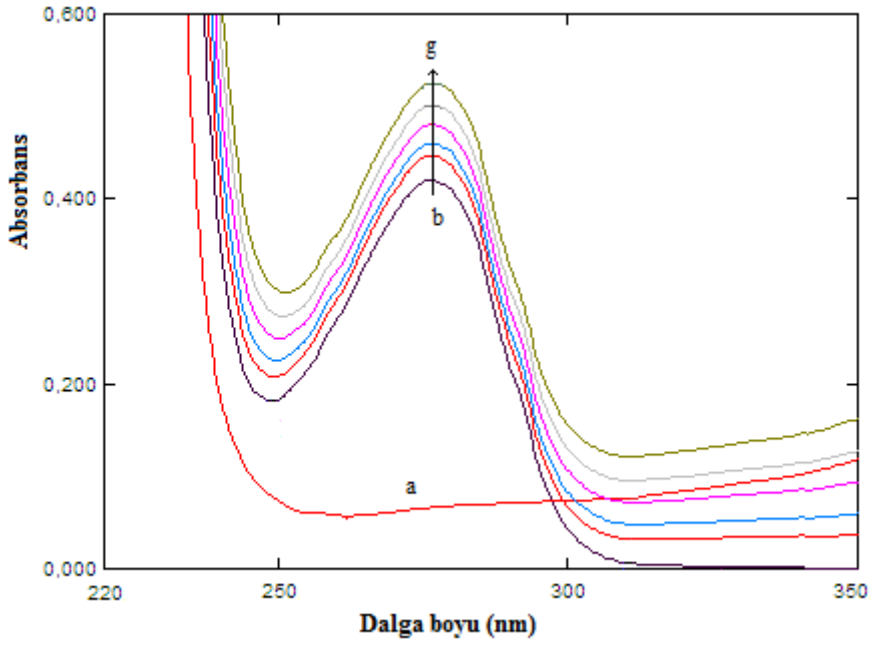


Şekil E4. Ci5 bileşiğinin HR-MS spektrumu.

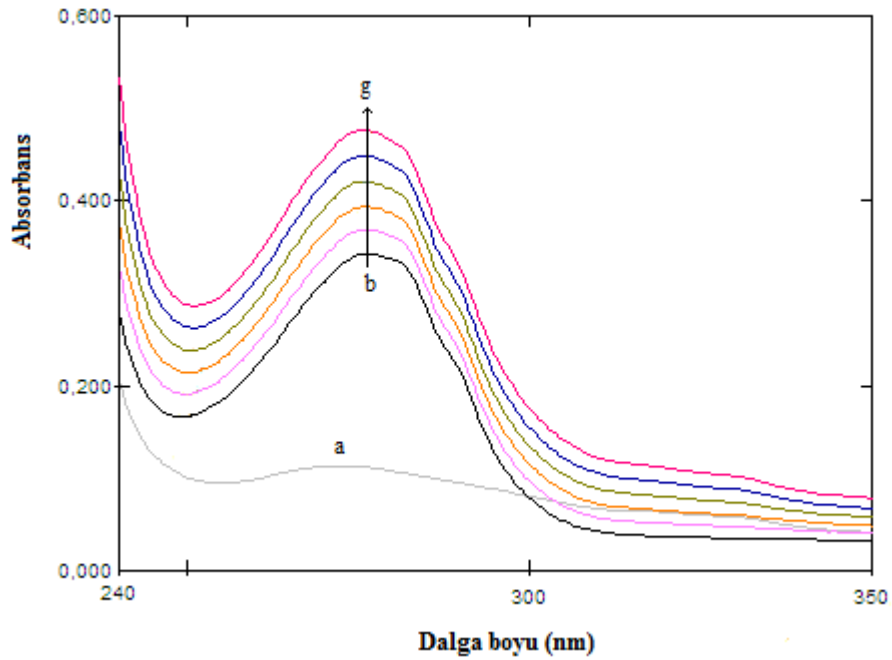


Şekil E5.  $7.16 \times 10^{-6}$  M Ci5 bileşiğinin (a) pH 7.4 PBS tamponunda (kırmızı), (b) pH 2.0 sitrik asit tamponunda (mavi) UV-görünür absorpsiyon spektrumları.

## EK 2 – Pepsin/tripsin-Ci5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları:



**Şekil E6.**  $1.0 \times 10^{-5}$  M pepsin (spektrum b) ile Ci5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen Ci5 derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 2.38; 4.75; 7.11; 9.46; 11.8 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a:  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5).



**Şekil E7.**  $1.0 \times 10^{-5}$  M tripsin (spektrum b) ile Ci5 etkileşimine ait absorpsiyon spektrumları. Artan miktarda eklenen Ci5 derişimleri (spektrum b'den spektrum g'ye doğru): 0.0; 2.38; 4.75; 7.11; 9.46; 11.8 ( $\times 10^{-6}$ ) M. (Spektrum a:  $1.0 \times 10^{-5}$  M Ci5).

### EK 3 - Moleküler kenetlenme sonuçları:

**Çizelge E1.** Ci5 'in pepsin/tripsin ve DNA ile oluşturduğu kompleksinde etkileşim türleri ve uzaklıkları.

<b>Pepsin-Ci5 Etkileşimleri</b>	<b>Mesafe Å</b>	<b>Bağ</b>	<b>Bağ Türü</b>	<b>Pepsin'in Bağlanma Bölgesi</b>	<b>Ci5'in Bağlanma Bölgesi</b>
:ci5:H18 A:GLU13:OE2	- 2.8826	Hidrojen Bağı	Karbon Hidrojen Bağı	A:GLU13:OE2	:ci5:H18
:ci5:H30 A:GLY217:O	- 2.2910	Hidrojen Bağı	Karbon Hidrojen Bağı	A:GLY217:O	:ci5:H30
A:ALA115 - :ci5:C	4.4937	Hidrofobik	Alkil	A:ALA115	:ci5:C
:ci5:C - A:LEU112	4.4119	Hidrofobik	Alkil	A:LEU112	:ci5:C
:ci5:C - A:ILE120	5.0609	Hidrofobik	Alkil	A:ILE120	:ci5:C
A:TYR75 - :ci5:C	4.4006	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:TYR75	:ci5:C
A:TYR75 - :ci5:C	4.8996	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:TYR75	:ci5:C
A:PHE111 - :ci5:C	4.7902	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:PHE111	:ci5:C
A:PHE111 - :ci5:C	4.5950	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:PHE111	:ci5:C
A:PHE111 - :ci5:C	5.4813	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:PHE111	:ci5:C
:ci5 - A:ILE30	5.1453	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:ILE30	:ci5
<b>Tripsin-Ci5 Etkileşimleri</b>	<b>Mesafe Å</b>	<b>Bağ</b>	<b>Bağ Türü</b>	<b>Tripsin'in Bağlanma Bölgesi</b>	<b>Ci5'in Bağlanma Bölgesi</b>
:ci5:H17 A:SER195:OG	- 2.9345	Hidrojen Bağı	Karbon Hidrojen Bağı	A:SER195:OG	:ci5:H17
:ci5:H19 A:PHE41:O	- 2.9952	Hidrojen Bağı	Karbon Hidrojen Bağı	A:PHE41:O	:ci5:H19
A:PHE41:HB1 :ci5	- 2.8748	Hidrofobik	Pi-Sigma	A:PHE41:HB1	:ci5
A:TYR151 - :ci5	3.6961	Hidrofobik	Pi-Pi İstiflenmiş	A:TYR151	:ci5
:ci5:C - A:ILE73	4.5948	Hidrofobik	Alkil	A:ILE73	:ci5:C
:ci5:C - A:ILE73	4.3520	Hidrofobik	Alkil	A:ILE73	:ci5:C
A:TYR39 - :ci5:C	4.7710	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:TYR39	:ci5:C
A:HIS40 - :ci5:C	4.3921	Hidrofobik	Pi-Alkil	A:HIS40	:ci5:C

<b>DNA-Ci5 Etkileşimleri</b>	<b>Mesafe Å</b>	<b>Bağ</b>	<b>Bağ Türü</b>	<b>DNA'nın bağlanma bölgesi</b>	<b>Ci5'in Bağlanma Bölgesi</b>
:ci5:H17 A:DC9:O2	- 2.4546	Hidrojen Bağ	Karbon Hidrojen Bağ	A:DC9:O2	:ci5:H17
:ci5:H19 A:DG10:O4'	- 2.6986	Hidrojen Bağ	Karbon Hidrojen Bağ	A:DG10:O4'	:ci5:H19
:ci5:H30 A:DC11:O2	- 2.7578	Hidrojen Bağ	Karbon Hidrojen Bağ	A:DC11:O2	:ci5:H30
<b>A:DG10:OP1 - :ci5</b>	<b>3.9548</b>	<b>Elektrostatik</b>	<b>Pi-Anyon</b>	<b>A:DG10:OP1</b>	<b>:ci5</b>
<b>B:DA18:H4' - :ci5</b>	<b>2.6712</b>	<b>Hidrofobik</b>	<b>Pi-Sigma</b>	<b>B:DA18:H4'</b>	<b>:ci5</b>









