



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MİKROÇEVRE DUYARLI G4
LİGANDLARININ GELİŞTİRİLMESİ,
KANSER METABOLİZMASININ VE İMMUN
TEPKİNİN DÜZENLENMESİ**

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran - 2026
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR tarafından hazırlanan “Mikroçevre Duyarlı G4 Ligandlarının Geliştirilmesi, Kanser Metabolizmasının ve İmmün Tepkinin Düzenlenmesi” adlı tez çalışması 10/06/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Esmâ Menevşe

.....

Danışman

Doç. Dr. Sündüs Erbaş Çakmak

.....

Üye

Prof. Dr. Gökhan Kars

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime Korucu

.....

Üye

Doç. Dr. Fatma Seçer Çelik

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 120C125 ve 225Z083 nolu projeleri ile desteklenmiştir. Ayrıca TÜBİTAK-2211A Yurtiçi Doktora Programı tarafından desteklendim.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

Tarih:10.06.2026

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MİKROÇEVRE DUYARLI G4 LİGANDLARININ GELİŞTİRİLMESİ, KANSER METABOLİZMASININ VE İMMUN TEPKİNİN DÜZENLENMESİ

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

2026, 199 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Prof. Dr. Esma MENEVŞE

Prof. Dr. Gökhan KARS

Doç. Dr. Fatma SEÇER ÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

G-kuadrupleks (G4) yapısı nükleik asitlerin guanince zengin bölgelerinde oluşan ve dizi içeriğine, uzunluğuna, monovalent katyona bağlı olarak farklı konformasyonlarda bulunan ikincil bir yapıdır. G-kuadrupleks yapısının kanser oluşumu ve gelişiminden sorumlu onkogen anlatımını ve telomeraz aktivitesini etkilemesi bu yapıları anti-tümör tedavi hedefi olarak bilim dünyasının ilgi odağı haline getirmiştir. G-kuadrupleks yapılarını kararlı hale getiren ligandların geliştirilmesi, yapı-aktivite ilişkilerinin çözülmesi ve hedef hücrede aktifleşerek seçici etkinlik gösteren ligandların terapötik potansiyellerinin değerlendirilmesi önemli bir çalışma alanı olmuştur. Bu tez çalışmasında seçici olarak G-kuadrupleks yapısına bağlanan, farklı yük ve konjugasyona sahip BODIPY temelli farklı G4 ligandı sentezlenmiş ve G4 seçicilikleri, stabilizasyonu karşılaştırılmıştır. Düzlemsel ligand yapısının ve yük sayısının G4 bağlanma ile korele olduğu, tasarlanan ligandlardan sırasıyla üç ve iki pozitif yüke sahip distiril yapıda olan piridinyum yapıda NGL-4 ve ammonyum yapıda NGL-8 ligandlarının daha iyi stabilizasyon sağladığı tespit edilmiş olup bu ligandların G4 oluşturan DNA oligomerlerinin T_m derecesinde 26°C'ye varan artmaya sebep olduğu gözlenmiştir. G4-spesifik antikorlarla yapılan floresan mikroskop ve akış sitometri analizler NGL-4 ligandının B16-F10 fare melanom hücresinde G4 katlanmasını yaklaşık 3 kat artırdığını göstermektedir. Tümör mikroçevresi makrofaj (RAW 264.7) ve *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu ko-kültürleri ve bakteri *quorum sensing* (çoğunluk algısı) sinyal bileşikleri açıl homoserin lakton (AHL) kullanılarak taklit edildiğinde immün tepkinin farklı düzenlenebildiği tespit edildi. NGL-5 ligandının yapısında yer alan nitrobenzil biriminin kanser mikroçevresi ile ilişkili hipoksi ortamında indirgenmesi ile aktifleşebilecek şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca yapısında yer alan iyot ağır atomu sayesinde singlet oksijen üreterek G4 oksidasyonu yapabilecek olup bu sayede fotodinamik etki ile G4 stabilizasyonunun sinerjik etkisinden faydalanılmak istenmiştir. Nitroredüktaz enzimi ile aktifleşebildiği belirlenen ligandın, ışık, karanlık, hipoksi ve normoksi mikroçevrelerinde anlamlı şekilde guanin oksidasyonunu artırdığı, hücre göçünü yavaşlattığı, ışıklı ve hipoksik mikroçevrede sitotoksitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Floresan mikroskobu ile yapılan analizlerde NGL-8 ligandının asetillenmesi ile elde edilen yüksüz NGL-7 ligandının hücre penetrasyonunun 2 kat fazla olduğu ve çekirdekte lokalize olduğu anlaşılmıştır. Bu ligandın histon deasetilaz 2 ve 6 enzimlerinin fazla ekprese edildiği mikrosatelit kararsız kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu %73 oranında baskıladığı gözlemlenmiştir. G4 ligandlarının tümör proliferasyon, metastazı, immün düzenlenme ve inflamasyon üzerindeki etkisi çeşitli kanser hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Ligandların promotöründe G4 yapısı bulunan onkogenlerin (HIF-1 α , BCL-2, cMYC, VEGFA, TERT) anlatımını transkripsiyonel olarak baskıladığı belirlenmiştir. İmmün sistemin düzenlenmesinde sorumlu sitokinler, kemokinler, düzenleyici proteinlerin gen anlatımını baskıladığı

gösterilmiştir. Bu tez çalışması ile G4 ligandlarının immün sistem üzerindeki transkripsiyonel etkisi araştırılmış ve potansiyel terapötik etkisi tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: G-kuadrupteks ligandı, immün düzenleme, kanser mikroçevresi

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DEVELOPMENT OF MICROENVIRONMENT RESPONSIVE G4 LIGANDS, REGULATION OF CANCER METABOLISM AND IMMUNE RESPONSE

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY THE DEGREE OF DOCTOR OF
PHILOSOPHY IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

Advisor: Assoc. Prof. Dr Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

2026, 199 Pages

Jury

Assoc. Prof. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Prof. Dr. Esma MENEVŞE

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assoc. Prof. Fatma SEÇER ÇELİK

Assist. Prof. Emine Nedime KORUCU

The G-quadruplex (G4) structure is a secondary structure that forms in guanine-rich regions of nucleic acids and exists in different conformations depending on the sequence, length, and monovalent cation. Scientific interest in G-quadruplex structures as targets for antitumor therapy has grown due to their influence on the expression of oncogenes and telomerase activity responsible for cancer development. The development of ligands that stabilize G-quadruplex structures, elucidation of the structure-activity relationships of ligands, and the targeting of specific cells using activatable ligands have become an important area of research. In this thesis, eight different novel BODIPY-based G4 ligands with varying charges and conjugations that selectively bind to the G-quadruplex structure were synthesized, and their G4 selectivity and stabilization were compared. It was found that the planar ligand structure and the number of charges correlate with G4 binding. NGL-4 ligand which has a pyridinium structure with three positive charges, and the NGL-8 ligand which has an ammonium structure with two positive charges were provided better stabilization among the designed ligands and it was observed that these ligands cause an increase in the T_m of G4-forming DNA oligomers of up to 26°C. Fluorescence microscopy and flow cytometry analyses using G4-specific antibodies were showed that NGL-4 ligand increases nearly three-fold G4 conformation in B16-F10 mouse melanoma cells. Differential regulation of immune responses was observed when the tumor microenvironment was mimicked using co-cultures of macrophages (RAW 264.7) and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial infections or the bacterial quorum-sensing signaling molecule acyl homoserine lactone (AHL). NGL-5 is designed to be activated by the reduction of its nitrobenzyl moiety in a hypoxic environment associated with the cancer microenvironment. Additionally, due to the presence of the heavy iodine atom in its structure, it is capable of producing singlet oxygen and undergoing G4 oxidation; the aim is to take advantage of the synergistic effect of G4 stabilization through photodynamic therapy. It was found that the ligand, which was determined to be activated by the nitroreductase enzyme, significantly increased guanine oxidation in light, dark, hypoxic, and normoxic microenvironments, reduced cell migration, and exhibited greater cytotoxicity in light-hypoxic microenvironments. The uncharged NGL-7 ligand, which is obtained by acetylating the NGL-8 ligand, has been shown to penetrate cells twice as effectively and localize in the nucleus when observed under a

fluorescence microscope. It was observed that this ligand suppressed cell proliferation by 73% in microsatellite-unstable colon cancer cells in which histone deacetylase 2 and 6 enzymes were overexpressed. The effects of G4 ligands on tumor proliferation, metastasis, immune regulation, and inflammation have been studied in various cancer cell lines. It has been determined that ligands transcriptionally suppress the expression of oncogenes (HIF-1 α , BCL-2, cMYC, VEGFA, TERT) that contain a G4 structure in their promoters. It has demonstrated that cytokines, chemokines, and regulatory proteins influence the gene expression involved in the regulation of the immune system. This thesis investigates the transcriptional effects of G4 ligands on the immune system and discusses their potential therapeutic effects.

Keywords: cancer microenvironments, immun regulations, G-quadruplex ligands

ÖNSÖZ

Doktora öğrenciliğim boyuncaengin bilgileri ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ-ÇAKMAK’a teşekkürü bir borç bilirim. Süreç boyunca ne zaman çıkmaza girsem sunduğu değerli katkıları ve yapıcı geri bildirimleri sadece bu tezi geliştirmekle ve tamamlamakta kalmadı aynı zamanda bana geniş bir vizyon kazandırdı. Akademik hayatın getirdiği sorumluluğu değerli deneyimi ve bakış açısıyla daha iyi anlamamı sağladı. Bu tezde ve diğer projelerde birlikte çalışma ayrıcalığına sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissediyorum. Hayatım boyunca desteğini hatırlayacağım, üzerimdeki emeğine ve katkısına her zaman minnettarım.

Prof. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ ve Doç. Dr. Yusuf Çakmak başta olmak üzere tez çalışmamda yardımda bulunarak yol gösteren öğretim üyelerine ve ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hedeflerime ulaşmamda daima arkamda olan, azmimi destekleyen ve sevgisiyle beni yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2211-A Yurtiçi Doktora Burs Programı, 120C125 ve 225Z083 nolu projelerle destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR
KONYA-2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. G-Kuadrupleks Yapısı	2
2.2. G-kuadruplekslerin Biyolojik Rolü	7
2.2.1. G-Kuadruplekslerin telomerlere etkisi.....	8
2.2.2. G-Kuadruplekslerin transkripsiyon ve translasyona etkisi	9
2.2.3. G-Kuadruplekslerin replikasyona etkisi	10
2.2.4. G-Kuadruplekslerin kromozom yeniden şekillenmesi ve genomik kararlılığa etkisi.....	11
2.2.5. G-Kuadruplekslerin DNA oksidasyonunun G4 yapısına etkisi.....	12
2.3. G-kuadrupleks Ligandları	13
2.3.1. Fotoduyarlastırıcı G4 ligandları.....	16
2.3.2. Aktifleşebilen G4 ligandları.....	18
2.4. Tümör Mikroçevresi	22
2.4.1. Fiziksel mikroçevre ve hipoksi ortamı.....	24
2.4.2. Stromal mikroçevre.....	26
2.4.3. İmmün mikroçevre.....	29
2.5. BODIPY Yapısı ve Özellikleri	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. G4 Ligandlarının Tasarımı ve Sentezi	35
3.1.1. Farklı yük ve modifikasyonlara sahip g4 ligandlarının sentezi	36
3.1.1.1. 1 nolu molekülün sentezi	36
3.1.1.2. 2 nolu molekülün sentezi	36
3.1.1.3. NGL-1 molekülün sentezi.....	36
3.1.1.4. 3 nolu molekülün sentezi	37
3.1.1.5. 4 nolu molekülün sentezi	37
3.1.1.6. 5 nolu molekülün sentezi	38
3.1.1.7. NGL-2 molekülünün sentezi.....	38
3.1.1.8. 6 nolu molekülün sentezi	39
3.1.1.9. 7 nolu molekülün sentezi	40
3.1.1.10. 8 nolu molekülün sentezi	40

3.1.1.11. NGL-3 molekülünün sentezi.....	41
3.1.1.12. 9 nolu molekülün sentezi	42
3.1.1.13. 10 nolu molekülün sentezi	42
3.1.1.14. NGL-4 molekülünün sentezi.....	42
3.1.2. Tümör mikroçevresinde aktifleşen ışığa duyarlı ligandın sentezi	43
3.1.2.1. 11 nolu molekülün sentezi	43
3.1.2.2. 12 nolu molekülün sentezi	44
3.1.2.3. 13 nolu molekülün sentezi	44
3.1.2.4. 14 nolu molekülün sentezi	45
3.1.2.5. NGL-5 molekülünün sentezi.....	45
3.1.2.6. 15 nolu molekülün sentezi	46
3.1.2.7. 16 nolu molekülün sentezi	46
3.1.2.8. 17 nolu molekülün sentezi	47
3.1.2.9. 18 nolu molekülünün sentezi	47
3.1.2.10. 19 nolu molekülün sentezi	48
3.1.2.11. NGL-6 nolu molekülün sentezi.....	48
3.1.3. HDAC enzmini ile aktifleşen ligandın sentezi	49
3.1.3.1. 20 nolu molekülün sentezi	49
3.1.3.2. 21 nolu molekülün sentezi	49
3.1.3.3. 22 nolu molekülün sentezi	49
3.1.3.4. 23 nolu molekülün sentezi	50
3.1.3.5. 24 nolu molekülün sentezi	50
3.1.3.6. NGL-7 molekülünün sentezi.....	51
3.1.3.7. 25 nolu molekülün sentezi	52
3.1.3.8. 26 nolu molekülün sentezi	52
3.1.3.9. 27 nolu molekülün sentezi	52
3.1.3.10. NGL-8 molekülünün sentezi.....	53
3.1.4. Açıl homoserin laktonların sentezi	54
3.1.4.1. AHL1 molekülünün sentezi	54
3.1.4.2. AHL2 molekülünün sentezi	54
3.1.4.3. AHL3 molekülünün sentezi	54
3.2. G4 Ligandlarının Fotofiziksel Özellikleri.....	55
3.3. Ligandların G4 Yapısına Bağlanmasının Belirlenmesi	56
3.4. Ligandların G-Kuadrupleks DNA'ya Bağlanma Katsayısının Belirlenmesi.....	57
3.5. Singlet Oksijen Üretiminin Belirlenmesi.....	57
3.6. Aktifleşen Ligandlarının Enzimatik Kesimi	58
3.7. Hipoksi Ortamının Oluşturulması.....	59
3.8. Ligandların Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması	60
3.9. Ligandların Gen Anlatımına Etkisi.....	61
3.10. Ligandların Hücre Göçüne Etkisi	64
3.11. Hücre Akış Sitometrisi.....	64
3.12. Floresan Mikroskopu Görüntüleme	65
3.13. Koloni Oluşumu Analizi	66
3.14. Transkriptom Analizi	66
3.15. Minimum İnhibisyon Derişiminin Belirlenmesi.....	67
3.16. Biofilm Oluşumunun Belirlenmesi	67
3.17. Piyosiyanın Üretimi	68
3.18. İstatiksel Analiz	68

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 69

4.1. G-kuadrupleks Ligandların Sentezi	69
4.2. G-kuadrupleks Ligandların Fotofiziksel Özellikleri	69
4.3. Ligandların G-kuadrupleks Yapısına Bağlanmasının Belirlenmesi	74
4.4. Ligandların G-Kuadrupleks DNA'ya Bağlanma Katsayısının Belirlenmesi.....	83
4.5. Üç Pozitif Yüklü G4 Ligandı NGL-4'ün Kanser ve Mikroçevresine Etkisi	84
4.5.1. Hipoksi ortamın oluşturulması.....	84
4.5.2. NGL-4 ligandının hücre canlılığına etkisi	86
4.5.3. NGL-4 ligandının G-kuadrupleks stabilizasyonunun <i>in vitro</i> analizi.....	86
4.5.4. NGL-4 ligandının immün sistem üzerine etkisi.....	88
4.5.5. NGL4 ligandının inflamasyon üzerine etkisi.....	93
4.5.6. NGL-4 ligandının quorum sensing üzerindeki etkisi.....	96
4.5.7. NGL-4 ligandının <i>P. aeruginosa</i> 'un canlılığına etkisi	98
4.5.8. NGL-4 ligandının <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm ve piyosiyanın oluşturması ..	99
4.5.9. NGL-4 ligandının <i>P. aeruginosa</i> 'da gen anlatımına etkisi.....	100
4.5.10. Transkriptom analizi	102
4.6. Hipoksi Ortamda Aktifleşen ve Fotoduyarlaştırıcı Ligand: NGL-5	105
4.6.1. Singlet oksijen üretiminin belirlenmesi	106
4.6.2. NGL-5 ligandının nitroredüktaz enzimi ile aktifleşmesi	108
4.6.3. Meme kanseri hücrelerinde hipoksi ortamın oluşturulması	109
4.6.4. NGL-5 ligandının hücre canlılığına etkisi	110
4.6.5. NGL-5 ligandının gen anlatımına etkisi	111
4.6.6. NGL-5 ligandına bağlı guanin oksidasyonunun <i>in vitro</i> belirlemesi.....	112
4.6.7. NGL-5 ligandının metastaza etkisi	114
4.7. Histon Deasetilaz Enzimi ile Aktifleşen G4 Ligandı: NGL-7	117
4.7.1. Histon deasetilaz enzim uygulaması.....	117
4.7.2. Farklı hücre hatlarında HDAC seviyesinin belirlenmesi	118
4.7.3. NGL-5 ligandının hücre canlılığına etkisi	119
4.7.4. <i>In vitro</i> NLG-7 ligandının lokalizasyonu ve g-kuadrupleks stabilizasyonu	120
4.7.5. NGL-7 ligandının gen anlatımına etkisi	121
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	125
5.1 Sonuçlar	125
5.2 Öneriler	130
6. KAYNAKLAR	131
EKLER	147

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. G-kuadrupleks yapısı ve guanin bazının <i>anti</i> ve <i>syn</i> konformasyonu.....	3
Şekil 2.2. G-kuadrupleks yapısının farklı konformasyonları ve ilmek çeşitleri.....	3
Şekil 2.3. G-kuadrupleks yapısındaki dar, orta ve geniş boyutta oluk tipleri.....	4
Şekil 2.4. Genomda G-kuadrupleks yeri ve işlevi.....	7
Şekil 2.5. Guanin oksidasyonu ve oluşan ürünler.....	12
Şekil 2.6. G-kuadrupleks ligand örnekleri.....	15
Şekil 2.7. Modifiye edilmiş Jablonski Diagramı.....	16
Şekil 2.8. Fotoduyarlastırıcı G4 ligandı örnekleri.....	18
Şekil 2.9. G-kuadrupleks ligandı içeren G4L-PROTAC sistemi ve çalışma mekanizması.....	19
Şekil 2.10. Aktifleşebilir G4 ligandı Pt ^(IV) -salphen kompleksi.....	19
Şekil 2.11. Aktifleşebilir G4 ligandı rotaksan temelli kafeslenmiş ligand ve 2 nolu molekül.....	20
Şekil 2.12. Azobenzen türevli aktifleşebilir G4 ligandı.....	21
Şekil 2.13. Hipoksi ortamında aktifleşen G4 ligandı ve aktifleşme mekanizması.....	22
Şekil 2.14. Tümör mikroçevresi.....	23
Şekil 2.15. Normoksi ve hipoksi ortamında HIF transkripsiyon faktörünün düzenlenmesi.....	24
Şekil 2.16. BODIPY molekülünün kimyasal yapısı.....	34
Şekil 3.1. Tez kapsamında sentezlenen G4 ligandları.....	35
Şekil 3.2. NGL-1 ligandının sentez basamakları.....	37
Şekil 3.3. NGL-2 ligandının sentez basamakları.....	39
Şekil 3.4. NGL-3 ligandının sentez basamakları.....	41
Şekil 3.5. NGL-4 ligandının sentez basamakları.....	43
Şekil 3.6. NGL-5 ligandının sentez basamakları.....	46
Şekil 3.7. NGL-6 molekülünün sentez basamakları.....	48
Şekil 3.8. NGL-7 molekülünün sentez basamakları.....	51
Şekil 3.9. NGL-8 molekülünün sentez basamakları.....	53
Şekil 3.10. AHL moleküllerinin sentez yolu.....	55
Şekil 3.11 a. NGL-5 ligandının ışık varlığında singlet oksijen üretimi b. DPBF molekülünün singlet oksijen varlığında DBB'ye oksidasyonu.....	58
Şekil 3.12. Aktifleşebilen ligandların aktifleşme mekanizması.....	59
Şekil 4.1. G-kuadrupleks ligandlarına ait absorbans ve emisyon spektrumları.....	70
Şekil 4.2. G-kuadrupleks ligandlarına ait absorbans spektrumu ve grafikleri.....	72
Şekil 4.3. NGL-1'in FRET DNA erime eğrileri.....	75
Şekil 4.4. NGL-2'nin FRET DNA erime eğrileri.....	76
Şekil 4.5. NGL-3'ün FRET DNA erime eğrileri.....	77
Şekil 4.6. 10 nolu molekülün FRET DNA erime eğrileri.....	78
Şekil 4.7. NGL-4'ün FRET DNA erime eğrileri.....	79
Şekil 4.8. NGL-5'in FRET DNA erime eğrileri.....	80
Şekil 4.9. NGL-7'nin FRET DNA erime eğrileri.....	81
Şekil 4.10. NGL-8'in FRET DNA erime eğrileri.....	82
Şekil 4.11. NGL-4 (5 µM) ile c-myc ve ssDNA oligomerlerinin titrasyon grafiği.....	83
Şekil 4.12. a) NGL-4'ün c-MYC ve ds-DNA oligomeri titrasyonuna bağlı olarak 655 nm'deki absorbans değişimi. b) NGL-4 ile c-MYC oligomerinin titrasyon eğrisinin Benesi-Hildebrand çizimi.....	84

Şekil 4.13. A549 ve B16-F10 hücre hatlarında HIF-1 α gen anlatımının farklı CoCl ₂ (0-250 μ M) ve sürelerdeki (24 ve 48 saat) değişimi ve CoCl ₂ hücre canlılıkları üzerine etkisi.	85
Şekil 4.14. NGL-4'ün (0-20 μ M) hücre canlılığına etkisi.	86
Şekil 4.15. Normoksi koşullarında B16-F10 hücre hattında NGL-4 uygulaması ile hücrede G4 yapısı oluşumunun floresan mikroskop ile analizi.	87
Şekil 4.16. B16-F10 hücre hattında NGL-4 (5 ve 20 μ M) ligandının G4 yapı kararlılığına olan etkisi.	87
Şekil 4.17. B16-F10 hücresi ve RAW264.7 ile ko-kültüründeki B16-F10 hücresinin gen anlatımı değişimi.	89
Şekil 4.18. RAW264.7 hücresi ve B16-F10 ile ko-kültüründeki RAW264.7 hücresinin gen anlatımı değişimi.	91
Şekil 4.19. <i>P. aeruginosa</i> ile enfekte olan ve olmayan A549 hücre hattında NGL-4 ligandının gen anlatımına etkisi.	95
Şekil 4.20. <i>P. aeruginosa</i> ile enfekte olan A549 hücrelerinde gen anlatımı değişimi. ..	97
Şekil 4.21. NGL-4 ligandının <i>P. aeruginosa</i> 'da hücre canlılığına etkisi.	99
Şekil 4.22. NGL-4 ligandının tek başına (üst resim) ve AHL varlığında (alt resim) <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm oluşumu.	100
Şekil 4.23. NGL-4 ligandının <i>P. aeruginosa</i> 'da quorum sensing gen anlatımına etkisi.	101
Şekil 4.24. NGL-4 ligandının ve AHL moleküllerinin <i>P. aeruginosa</i> 'da quorum sensing gen anlatımına etkisi.	102
Şekil 4.25. B16-F10 hücresinde kontrol ve 20 μ M NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki gen ontoloji terimlerinin bulunduğu biyolojik süreçler.	105
Şekil 4.26. Fotoduyarlastırıcı NGL-3, NGL-5 ve 14 nolu molekülün singlet oksijen üretimine ait DBPF absorban spektrumları.	106
Şekil 4.27. NGL-5 ligandına nitroredüktaz enzimi uygulanmış ve uygulanmamış örneklerle ait HPLC spektrumu.	108
Şekil 4.28. MCF7 hücre hattında, farklı zamanlarda gaz uygulanmış deney gruplarındaki HIF1 α gen anlatımı.	109
Şekil 4.29. a) MCF7 hücre hattında farklı derişimlerde CoCl ₂ HIF1 α gen anlatımı. Referans gen olarak β -ACT kullanıldı. b) CoCl ₂ 'nin hücre canlılığına etkisi (n $\geq$ 3). ..	110
Şekil 4.30. NGL-5 ligandının MCF7 hücre canlılığına etkisi.	111
Şekil 4.31. NGL-5 ligandının MCF7 hücrelerindeki gen anlatımı değişimi.	112
Şekil 4.32. NGL-5 ligandı ile hücrede 8-OHdG oluşumu.	113
Şekil 4.33. MCF7 insan meme kanseri hücre hattında yara alanının NGL-5 varlığındaki değişimi normalize edilmiş sonuç grafikleri.	114
Şekil 4.34. MCF7 insan meme kanseri hücre hattında yara alanının NGL-5 varlığındaki migrograf görüntüleri.	115
Şekil 4.35. MCF7 hücre hattında NGL-5 ligandının EMT ilişkili genler üzerine etkisi.	116
Şekil 4.36. NGL-7, NGL-8 ve HDAC6 uygulanmış NGL-7'e ait HPLC spektrumu. .	118
Şekil 4.37. Farklı hücre hatlarında HDAC6 ve HDAC2 gen anlatımı değişimi.	119
Şekil 4.38. a) Farklı hücre hatlarında NGL-7'nin hücre canlılığına etkisi. b) NGL-7 (5 μ M) ve HDAC6 inhibitörü (1 μ M) içeren ve içermeyen örneklerdeki 8 günlük koloni oluşumu deneyi fotoğrafları ve sonuç grafiği.	120
Şekil 4.39. NGL-7 ligandının in vitro lokalizasyonu ve G4 satabilizasyonu.	121
Şekil 4.40. NGL-7 (5 ve 20 μ M) ligandının HUVEC, HTC116 ve SW480 hücre hatlarındaki gen anlatımına etkisi.	122

Şekil 4.41. NGL-7 ligandının HUVEC ve HTC116 hücre hatlarındaki gen anlatımına etkisi.....	124
---	-----

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. FRET deneyinde kullanılacak oligomerlerin özellikleri.	56
Çizelge 3.2. PCR analizinde kullanılan primerlerin sekansı.	63
Çizelge 4.1. G-kuadrupteks ligandlarına ait absorpsiyon, emisyon, molar ekstinksiyon katsayısı değerleri. NGL-1 488 nm, NGL-2, NGL-3, NGL-4, NGL-5, NGL-7, NGL-8 630 nm'den uyarılmıştır. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7.4) kullanıldı.	72
Çizelge 4.2. G4 ligandlarının (5 µM) normalizasyon değeri 0.5'e karşılık gelen sıcaklık (ΔT_m) değerleri.	82
Çizelge 4.3. B16-F10 hücrelerinde kontrol ve 5 µM NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren ilk 15 geni içeren diferansiyel ekspresyon analizi.	103
Çizelge 4.4. B16-F10 hücrelerinde kontrol ve 20 µM NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren ilk 15 geni içeren diferansiyel ekspresyon analizi.	104
Çizelge 4.5. B16-F10 hücrelerinde kontrol ve 20 µM NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren yollar.	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

SİMGELER

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
A	Absorbans
ϵ	Molar ekstinksiyon katsayısı
L	Litre
M	Molar
nm	Nanometre
T_m	Erime sıcaklığı
Φ	Singlet oksijen kuantum verimi
cm	Santimetre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
MHz	Mega Hertz

KISALTMALAR

ADCC	Antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiste
AHL	Açıl homoserin lakton
APC	Antijen sunan hücreler
ATRX	X'e bağlı α -talasemi zihinsel gerilik sendromu
BCL2	B-hücresi lenfoma 2
BER	Baz kesip çıkarma tamiri
Boc ₂ O	Ditertbutil dikarbonat
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BRCA2	Meme kanseri geni 2
CAF	Kanserle ilişkili fibroblast
CCL	CC-kemokin ligand
CD	Dairesel dikroizm
cDNA	Komplementer DNA
CTSB	Katepsin B
DAMP	Hasar ilişkili moleküler paternler
DBS	Çift zincir kırığı
DC	Dendritik hücreler
DDR	DNA hasar yanıtı
DKM	Diklorometan
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBF	Difenil izobenzofuran

ECM	Hücre dışı matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EMT	Epitel-mezenkimal geçiş
Et₃N	Trietil amin
FAM	Karboksifloresan
FAP	Fibroblast aktive edici protein
FasL	Fas ligandı
FBS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FRET	Föster rezonans enerji transferi
FSP1	Fibroblast spesifik protein 1
G4	G-kuadrupteks
Gh	5-guanidinohydantoin
HDAC	Histon deasetilaz
HG-DMEM	Yüksek şeker içeren dublecco modifiye eagle besiyeri
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF	Hipoksi uyarılabilir faktör
HIFP	Yüksek interstisyel basınç
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRE	Hipoksi cevap elementleri
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometre
HUVEC	İnsan göbek kordonu endotel hücresi
IC₅₀	Yarı öldürücü doz
IL	İnterlökin
lncRNA	Uzun kodlanmayan ribonükleik asit
ISC	İntersistem geçişi
MDSC	Miyeloid kökenli immün baskılayıcı hücreler
MeOH	Metanol
miRNA	Mikro ribonükleik asit
MMP	Matriks metalloproteinazlar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS	Kütle spektrometresi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NK	Doğal öldürücü hücreler
NMR	Nükleik rezonans spektrometresi
OG	8-okso-7,8-dihidroguanin
OGG1	8-oksoguanin glikosilaz
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler paternler
PBS	Fosfat salin tamponu
PCR	Polimerik zincir reaksiyonu
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PD-L	Programlanmış hücre ölümü protein ligandı
PDS	Piridostain
PDT	Fotodinamik terapi
p-G4	Potansiyel G-kuadrupteks yapıları
PHD	Prolil hidroksilaz
piRNA	Piwi-etkileşimli RNA
POT1	Telomer koruması proteini 1
PS	Fotoduyarlaştırıcı

QTOF	Kuadropol Uçuş Süreli Kütle Spektrometrisi
Rif1	Replikasyon zamanlamasını düzenleyen faktör 1
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu
smFRET	Tek molekül förster enerji transferi
Sp	Spiroiminodihydantoin
TAM	Tümörle ilişkili makrofajlar
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TEBPα/β	Telomer ucuna bağlanan protein α ve β
TAP	Tümörle ilişkili perisit
TFA	Trifloroasetik asit
TFR2	telomerik tekrara bağlanan faktör 2
Tg	Timin glikol
TMÇ	Tümör mikroçevresi
TRAIL	Tümör nekroz faktör-ilşkili apoptoz-indükleyici ligand
Treg	Düzenleyici T hücreler
TSS	Transkripsiyonel başlangıç bölgeleri
UTR	Çevrilmeyen bölge
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VHL	Von-Hippel-Lindau
WRN	Werner sendromu

1. GİRİŞ

DNA'nın ikincil yapılarından biri olan G-kuadrupleks yapısı guanince zengin DNA/RNA zincirinde bulunur. Bu yapı çoğunlukla DNA'da birçok onkogenin promotör bölgesinde, telomer bölgesinde, çift zincir kırığı bölgesinde yer alır. Transkripsiyonel veya traslasyonel düzeyde gen anlatımını etkilediği, telomeraz aktivitesini inhibe ettiği son zamanlarda yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Bochman vd., 2012). G-kuadrupleks yapısının çeşitli helikaz enzimleri, proteinler veya küçük moleküller ile etkileşime girerek dinamik bir şekilde açılıp kapanabildiği ve katlanma kinetiğinin düzenlendiği tespit edilmiştir (Sun vd., 1997). Dinamik G-kuadrupleks yapısının düzenlenmesine olanak tanıyan, bu yapıları stabilize edebilen çeşitli doğal ve sentetik bileşikler çalışılmıştır (Wang vd., 2022). Fakat hedef hücreye veya nükleik asit bölgesine özgü ligandların sayısı literatürde çok azdır. Bu tez çalışması kapsamında G-kuadrupleks yapısına bağlanarak bu bölgenin stabilizasyonunu arttıracak yeni ligandların literatüre kazandırılması, kanser mikroçevresinde aktiveleşir türevlerinin tasarlanması ve terapötik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tasarlanan BODIPY temelli ligandlar farklı yük veya moleküler gruplarla modifiye edilerek bağlanma, seçicilik gibi özellikleri optimize edilmiştir. Bu özellikleri ile kanser hücresine ve/veya mikroçevresine özgü, belli enzimlerin varlığında aktiveleşebilir ligandların sentezlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasında ilk kez kanser mikroçevresi ile ilişkili hipoksi ortamı ile karakterize nitroredüktaz enzimi ile aktiveleşen fotoduyarlastırıcı özelliği olan bir ligand geliştirilmiş ve G4 oksidasyonu, fotodinamik ve transkripsiyon düzenleme etkisi incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, amonyum DNA bağlanma modülünün asetil grubu ile kafeslenmesi yoluyla, Histon deasetilaz (HDAC) enzimi aracılığıyla aktive olabilen ilk G4 ligandı tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Ayrıca her ligandın karakterizasyonu ve optimizasyonu yükü, boyutu ve konjuge yapısı dikkate alınarak karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Sentezlenen G-kuadrupleks ligandların farklı kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Tümör mikroçevresi hipoksi ortamı, makrofaj ve bakteri enfeksiyonu ko-kültürleri kullanılarak taklit edilmiştir. G4 ligandlarının hem kanser hücresi hem de makrofaj hücresindeki tümör proliferasyon, metastazı ve immün düzenlenme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Tezde elde edilen bulgular kanser mikroçevresinin G4 ligandlarının etkinliğini değiştirebildiğini ve aktivitesini kontrol edebildiğini göstermektedir. Çalışmanın terapötik ligandların geliştirilmesinde literatüre önemli katkı sağlayacağı değerlendirilmiştir.

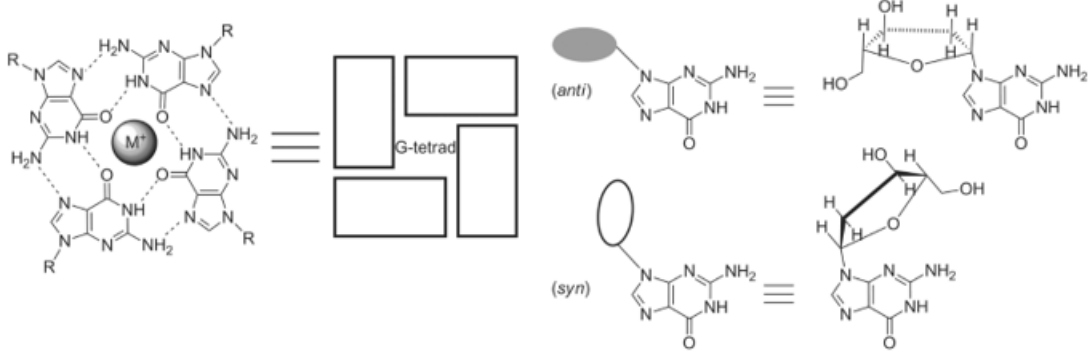
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. G-Kuadrupleks Yapısı

Genetik materyali taşıyan nükleik asitler çok çeşitli yapıda bulunabilirler. DNA'nın Watson-Crick baz eşleşmesi ile iki zincirin birbirini tamamlayarak oluşturduğu sağ-el çift sarmal B-DNA en yaygın formudur. Bunun haricinde sol-el sarmal Z-DNA, A-motif, saç-tokası, tripleks, i-motif ve G-kuadrupleks gibi farklı formlarda bulunabilir. G-kuadrupleks (G4) yapısı guanince zengin dizilerde guaninlerin Hoogsteen hidrojen bağıyla bağlanması sonucu oluşan ikincil DNA veya RNA yapısıdır (Burge vd., 2006). Hoogsteen hidrojen bağı aynı düzlem üzerinde bulunan guanin bazlarının N1H ile O6 ve N2H ile N7 atomları arasında kurulur ve böylece her bir guanin bazı komşu guanin bazlarıyla toplam 4 hidrojen bağı yaparak G-tetrad yapısını oluştur (Şekil 2.1). G-tetradın merkezinde ise her bir guaninin O6 atomundaki eşleşmemiş elektronlar ile etkileşimde olan monovalent alkali katyon bulunur (Sen ve Gilbert, 1988). En az 2 G-tetrad van der Waals kuvveti ve aromatik halkanın π elektronları yardımıyla birbiri üzerine istiflenerek G4 yapısını meydana getirir. G-tetradlar arasında yaklaşık 3,3 Å mesafe bulunur (Forman vd., 2000). Ayrıca çoğu G4 sağ-el sarmal olmasına rağmen sol-el sarmal ve hibrit G4 yapısı da raporlanmıştır. Sol-el sarmal G4'ler 12 nükleotidlik GTGGTGGTGGTG dizisi ile oluşur (Das vd., 2021). Fakat yapıya katılan guaninlerin veya guanin haricindeki bazların sayısı, G-tetradlar arasında kalan nükleik asit ilmeğinin konumuna veya uzunluğuna, yapıyı oluşturan nükleik asit zincir sayısına, oluk tipine ve merkezde yer alan monovalent katyona göre G4 yapısı çok çeşitli yapısal polimorfizm gösterir (Zhang vd., 2014). Ayrıca bütün bu faktörler yapının kararlılığını etkiler.

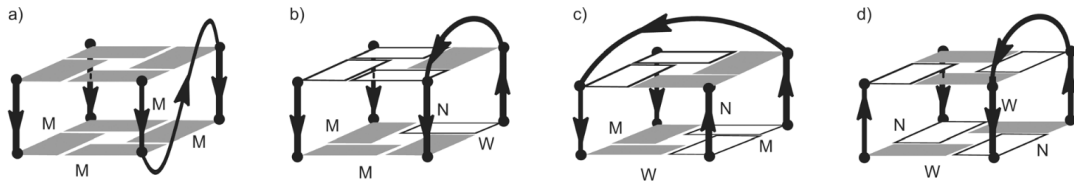
Guaninler glikosidik bağına açısına göre *syn* veya *anti* konformasyonda bulunmasından dolayı nükleik asit zincirinde paralel veya antiparalel oryantasyon sergiler (Şekil 2.1). Her bir G4 yapısında dört tane paralel veya antiparalel guanin tekrarları vardır. Paralel G4 yapısındaki bütün guaninler *anti* konformasyonda ve birbirlerine paralelken antiparalel G4 yapısında ise hem *syn* hem de *anti* konformasyondaki guaninlerden dolayı en az bir zincir diğerlerine göre antiparaleldir. Bu durum bir G-tetradta 4 farklı olasılığı meydana getirir: 1) bütün zincirlerin aynı yönde ve bütün guaninlerin *anti* veya *syn* konformasyonda olduğu paralel G-tetrad, 2) üç zincir aynı yönde bir zincirin ters yönde ve guaninlerin *anti-anti-anti-syn* veya *syn-syn-syn-anti* konformasyonda olduğu (3+1) G-tetrad (hibrit G-tetrad), 3) iki komşu zincirin aynı yönde ve diğer iki komşu zincirin ters yönde ve guaninlerin *syn-syn-anti-anti*

konformasyonda olduğu tip 1 antiparalel G-tetrad, 4) iki çapraz zincirin aynı yönde ve diğer iki çapraz zincirin ters yönde ve guaninlerin *anti-syn-anti-syn* konformasyonda olduğu tip 2 antiparalel G-tetradlardan G4 yapısı oluşabilir (Şekil 2.2).



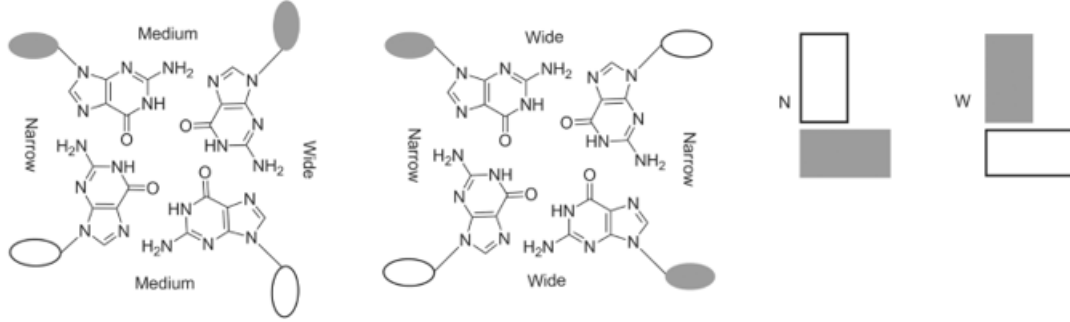
Şekil 2.1. G-kuadrupleks yapısı ve guanin bazının *anti* ve *syn* konformasyonu (Zhang vd., 2014).

G4 yapısını oluşturan nükleik asit zinciri dizinde guanin haricindeki bazlar ilmek oluşturarak G-tetradları birbirine bağlar. Bu ilmeklerin konumu da G4 yapısının topolojisini çeşitlendirir. Pervane, yanal ve çapraz (propeller, lateral, and diagonal) olarak ilmek tipleri 3 ana sınıfa ayrılır. Pervane ilmek komşu paralel G-tetradları bağlar ve beşten fazla bazdan oluşur. Yanal ilmek komşu antiparalel G-tetradları bağlar ve üç veya daha fazla bazdan oluşur. Çapraz ilmek karşılıklı antiparalel G-tetradları bağlar ve genellikle iki veya daha fazla bazdan oluşur (Zhang vd., 2014). Böylece paralel topolojide 3 tane pervane ilmek, hibrit topolojide 2 yanal ve 1 pervane ilmek, antiparalel topolojide ise 2 yanal ve 1 çapraz ilmek veya 3 yanal ilmek vardır. Ayrıca zincir yönü ve ilmek tipi farklılığından dolayı hibrid ve antiparalel G4 yapısının 2 ayrı alt formu bulunur (Ma vd., 2020).



Şekil 2.2. G-kuadrupleks yapısının farklı konformasyonları ve ilmek çeşitleri. a) Paralel G-tetrad ve pervane ilmek, b) Hibrit G-tetrad ve yanal ilmek, c) Tip 1 antiparalel G-tetrad ve çapraz ilmek, d) Tip 2 antiparalel G-tetrad ve yanal ilmek yapısı. N: dar (narrow) ve W geniş (wide) oluğu ifade etmektedir. (Zhang vd., 2014).

G-kuadrupleks yapısının bir başka topolojik farklılığı G-tetradların dışındaki oluk çeşitleridir. Her bir G-tetradın 4 adet oluğu bulunur. Bu oluklar komşu guanin konformasyonuna göre 3 farklı boyutta olabilir. Komşu 2 *anti* veya *syn* guanin arasında orta boyutta, *syn* guanin *anti* guanine dik ise dar boyutta, *anti* guanin *syn* guanine dik ise geniş boyutta oluk oluşur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. G-kuadrupleks yapısındaki dar, orta ve geniş boyutta oluk tipleri (Zhang vd., 2014). N: dar (narrow) ve W geniş (wide) oluğu ifade etmektedir.

G-tetrad merkezinde bulunan monovalent katyon elektrostatik stabilizasyon sağlar ve G4 yapısının fizyolojik koşullarda kararlı tutar. Ayrıca katyonun pozisyonu, ilmek veya oluklarla etkileşimi G4 topolojisini ve stabilitesini etkiler (Bhattacharyya vd., 2016). Hücrede bulunan pek çok katyonun arasında potasyum iyonu (K^+) en yüksek G-kuadrupleks stabilitesi sağlar. Potasyum katyonunun büyük iyonik yarıçapı (1,33 Å) düşük solvasyon entalpisi sağlar ve buna bağlı olarak enerji kaybı minimumdur (Hud vd., 1996). Potasyum haricinde sodyum (Na^+), rubidyum (Rb^+), talyum (Tl^+), sezyum (Cs^+) ve amonyum (NH_4^+) monovalent katyonları ve stronsiyum (Sr^{+2}), baryum (Ba^{+2}), kalsiyum (Ca^{+2}), kurşun (Pb^{+2}) divalent katyonları G4 stabilitesi sağlayabilir (Bhattacharyya vd., 2016). Fakat düşük konsantrasyonda mangan (Mn^{+2}), kobalt (Co^{+2}), nikel (Ni^{+2}) divalent katyonları K^+ varlığında bile G4 yapısının açılmasına neden olabilir. Ayrıca monovalent katyon konsantrasyonu azsa veya sıcaklık yeterince yüksekse divalent katyonlar G4 yapısının destabilize olmasına neden olabilir (Cadoni vd., 2021). Nadir çalışmalar olsa da trivalent lantanit metal katyonların da G4 stabilitesi sağladığı gözlenmiştir (Kwan vd., 2007).

G-kuadrupleks yapısını oluşturan zincir sayısına göre de polimorfizm gösterir. Yapıyı tek bir nükleik asit zinciri oluşturursa intramoleküler, birden fazla zincir varsa intermoleküler olarak sınıflandırılır. İntermoleküler G4'ler ise 2 zincirli (bimoleküler), 3 zincirli (trimoleküler) ve 4 zincirli (tetramoleküler) olabilir (Zhang vd., 2014).

G-kuadruplekslerin topolojik yapısı X-ray kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi, dairesel dikroizm (CD) spektrometresi, kütle spektrometresi (MS) gibi yöntemlerle tespit edilir. X-ray ve NMR teknikleri G4'lerin 3 boyutlu yapı analizini de sağlar (Ma vd., 2020). Nükleik asitlerin kiralite özellikleri olduğu için karakteristik refraktif indeksi ve sağ-sol polarize ışığa göre absorpsiyonu vardır. CD analizinde paralel topolojide G4'ler 260 nm'de pozitif Cotton etkisi ve 235 nm'de negatif Cotton etkisi gösterirken hibrid topolojide G4'ler 290 nm'de pozitif Cotton etkisi ve 235 nm'de negatif Cotton etkisi gösterir. Antiparalel G4'ler ise 290 ve 240 nm'de pozitif Cotton etkisi ve 260 nm'de negatif Cotton etkisi vardır (Paramasivan vd., 2007). Fakat tek başına CD analizi topoloji belirlemek için yeterli olmayabilir, X-ray veya NMR analizleriyle birlikte sonuçlar değerlendirilir.

Intramoleküler G4 topolojisi için yapılan çalışmalar için telomer dizisi en uygun aday olmuştur. İnsan telomer bölgesi 5'-d[TTAGGG]-3' dizisinin 15-200 baz tekrarlarıyla guanince zengin bir DNA bölgesidir. Dizi tekrarında bulunan TTA bazları G4 yapısındaki ilmekleri oluşturur. NMR spektroskopisi ve moleküler dinamik hesaplamaları ile Na⁺ katyonu varlığında d[AGGG(TTAGGG)3] dizisinin antiparalel G4 topolojisi oluşturduğu gösterilmiştir. Bu yapıya katılan her bir G-tetradteki 2 komşu guanin aynı yöndeysen diğer 2 komşu guanin zıt yönde bulunarak *syn-syn-anti-anti* konformasyonu ile 1 dar, 1 geniş ve 2 orta boyutta oluk ve TTA bazlarının 1 çapraz ve 2 yanıl ilmek yapısı oluşturur (Wang ve Patel, 1993). Aynı DNA dizisi K⁺ katyonu varlığında ise paralel topolojisi oluşturur. Bu G4 yapısındaki bütün guaninler *anti* konformasyonda, bütün oluklar orta büyüklükte bulunur ve 3 pervane ilmek vardır (Parkinson vd., 2002). Sonraki yıllarda aynı telomerik dizinin K⁺ çözeltisinde CD ve NMR teknikleri kullanılarak hibrid (3+1) topoloji de oluşturabildiği gösterilmiştir (Dai vd., 2007). Aynı DNA dizisinden elde edilen üç farklı sonuç göz önüne alındığında G-kuadrupleks yapısının birkaç polimorfizmi bulunabilir. Telomer haricindeki G4'lerin topolojisi de ayrıca incelenmiştir. Örneğin K⁺ katyonu varlığında *c-kit*, *c-myc* ve VEGF genlerinin promotör bölgesinde bulunan G4'lerin paralel topolojideysen *bcl-2* ve hTERT genlerinin promotör bölgesinde bulunan G4'leri hibrid topolojidedir (Ma vd., 2020).

Çift zincirli intermoleküler G-kuadruplekslerde genellikle aynı tip iki ilmek bulunur ve ilmek tipine göre çapraz-ilmekli, yanıl-ilmekli ve pervane-ilmekli olarak üç farklı topolojisi vardır. Farklı ilmek tipi içeren çift zincirli G4'ler ise oldukça nadirdir (Zhang vd., 2014). Çapraz-ilmekli G4, *Oxytricha nova* siliyatındaki telomer bölgesindeki d(G₄T₄G₄) dizisinde rapor edilmiştir (Haider vd., 2002). *Tetrahymena* siliyatının

telomerik d(TG₄TTG₄T) dizi ise yanal-ilmekli intermoleküler G4 oluşturur (Phan vd., 2004). İnsan telomer bölgesinde yapılan ileri çalışmalarda pervane-ilmekli intermoleküler G4 oluşumu gösterilmiştir (Zhang vd., 2014). Neidle ve ekibinin *B-raf* geninin promotör bölgesindeki d(G₃CG₄AG₅A₂G₃A) dizisi üzerinde yaptığı X-ray kristalografi çalışmalarında bu dizinin dimerik G4 yapısı oluşturduğu gözlenmiştir. Bu yapıda 7 ardışık G-tetrad ve merkezinde 6 K⁺ katyonu bulunur. Ayrıca GCGC tetradı ve sitozinler ile adeninler arasında 6 tane ilmek oluşumu ile eşsiz bir yapısı vardır (Wei vd., 2013).

Trimoleküler G-kuadrupleks yapısını Mergny ve ekibi poliakrilamid jel elektroforezi, CD spektroskopisi, UV absorbans ve kütle spektroskopisi yöntemlerini kullanarak göstermiştir. Bu yapı için 3 zincir iki adımda oluşur. İlk olarak tekli zincirler Li⁺ solüsyonunda kısa dubleksler oluşturur ve bu G-tetrad için rehber görevi görür, guaninleri birbirine yaklaştırır. Daha sonra ara yapı Na⁺ solüsyonuna alınır ve tri-G-kuadrupleks yapısı oluşur. Trimoleküler G4 yapısının üstünde ve altındaki 2 dubleks kuyruğundan dolayı geleneksel G4'lerden farklıdır. Fakat guanince zengin 3 zincirin G-kuadrupleks yapısı oluşturabildiği ortaya konmuştur (Zhou vd., 2012).

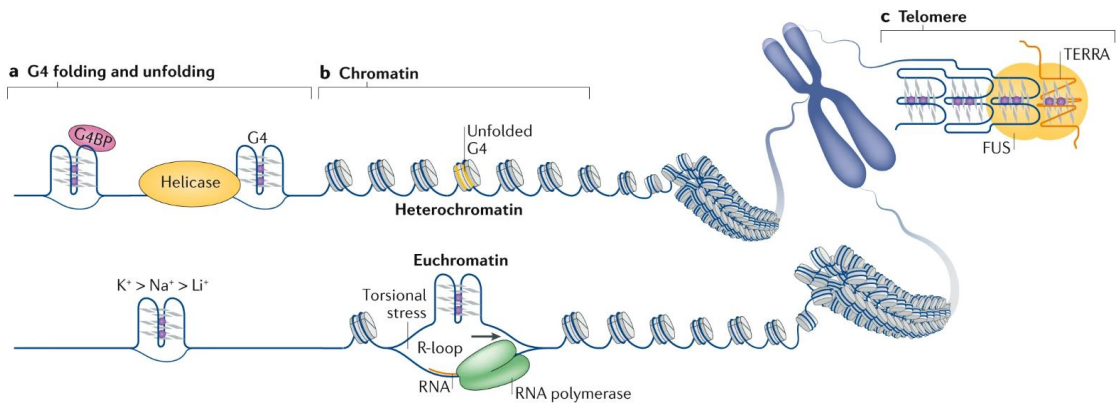
Tetramoleküler G-kuadrupleks yapısı guaninin tek tekrarını içeren 4 ayrı zincir ile oluşabilir. d(TG₄T) DNA dizisinde bütün zincirler birbirine paralel, bütün guaninler anti konformasyonda, bütün oluklar orta büyüklükte ve hiç ilmek olmadan tetramoleküler G4 oluşturur (Phillips vd., 1997). Fakat daha karmaşık yapılar da vardır. Örneğin d(GCGGXGGY) dizisi Na⁺ solüsyonunda 2 ayrı G4 monomerinin 2 GCGC tetradı ile birbirine bağlanmasıyla oluşur. Her bir monomer G4 yapısında 2 G-tetrad vardır. d(GGGT) dizisi K⁺ solüsyonunda 2 paralel tetramoleküler G4 monomerleri ekstra bir G-tetrad ile bağlanarak birbirine kenetlenmiş G4'leri oluşturur (Zhang vd., 2014).

Genomdaki G-kuadruplekslerin varlığı göz önüne alındığında RNA dizilerinin de RNA G-kuadrupleksi (rG4) oluşturabilmesi şaşırtıcı değildir. DNA ile RNA arasındaki farklılıklar G4 yapısına da yansır. Timin yerine urasil, deoksiriboz şekeri yerine riboz şekeri ve riboz şekerindeki 2'-hidroksil grubunun bulunması rG4 yapısını etkiler. RNA zincirinde timin yerine urasil bulunması yani C5-metil eksikliği RNA G4'lerin ilmeğinin hidrasyon seviyesini düşürür ve böylece yapının açılması için daha yüksek sıcaklık gereklidir. rG4'lerin oluklarındaki 2-hidroksi (2'-OH) grubunun su molekülleriyle etkileşimi yapının DNA G4'lerden daha kararlı olmasını sağlar (Zhang vd., 2010). Riboz şekerindeki 2'-OH gurubu C3'endo kıvrımını oluşturur ve bazların *syn* konformasyonuna geçmesini engeller. Bazlar aynı yönde ve *anti* konformasyonda bulunur. Bundan dolayı

rG4'ler paralel topolojidedir. Kısa ilmek zinciri rG4 yapısı ayrıca daha kararlı kılar. DNA ve RNA G4 yapısı arasındaki diğer önemli fark katyon bağlanma özelliğidir. K^+ katyonu hem DNA G4 hem de RNA G4'lerin yapısına katılırken Na^+ katyonunun RNA G4 yapısına etkisi yoktur (Fay vd., 2017).

2.2. G-kuadruplekslerin Biyolojik Rolü

Nükleik asitler genetik bilginin saklandığı, bir organizmanın bileşenlerini etkili bir şekilde oluşturmak için kodun anlatımı ve kalıtımı sağlayan biyopolimerlerdir. Bilinenin aksine nükleik asitler sadece çift-zincir sarmal yapıda değil alternatif konformasyonlarda bulunarak işlevini sürdürür. Bunlara A-DNA, Z-DNA, intramoleküler tripleks, saç-tokası, paralel-zincir DNA ve kuadrupleks DNA örnek verilebilir. G-kuadrupleks (G4), DNA veya RNA dizilerinin guanin bakımından zengin bölgelerinde oluşan bir nükleik asit ikincil yapısıdır. İlk kez 1910 yılında guanilik asit türevlerinin kendiliğinden birleştiği Bang tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra Gellert vd. (1962) X-ray kırınımı analiziyle guanozin monofosfatların kendiliğinden birleşerek düzlemsel bir tetrad oluşturabildiğini gösterilmiştir. Yapılan pek çok biyokimyasal ve yapısal analiz sonucunda diğer bazların araya girdiği guanin tekrarlarından oluşan DNA ve RNA nükleik asit zincirlerinin G4 yapısını oluşturabildiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (Sen vd., 1988). Guanin zengini dizilerde G4 yapısının oluştuğuna dair artan kanıtlara rağmen hücre içinde G4 yapısının kararlı kalacağına garanti yoktur. Kromozomal DNA'da G4 dizisi tamamlayıcı dizisi ile rekabet halindedir. Tamamlayıcı dizi varlığında G4 dizisi G4 yapısını oluşturmak yerine Watson-Crick Hidrojen bağı ile çift-zincir sarmal DNA oluşturma eğilimindedir. Çift sarmal açılmadıkça G4 yapısının kendiliğinden katlanması kolay değildir (Dell'Oca vd., 2024).



Şekil 2.4. Genomda G-kuadrupleks yeri ve işlevi (Varshney vd., 2020).

İnsan genomunda yapılan bilgisayar temelli biyoinformatik analizlerle korunmuş $G_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}$ dizisi kullanılarak 300000'den fazla potansiyel G-kuadrupleks (pG4) dizisi tespit edilmiştir (Hupper ve Balasubramanian, 2005). Yüksek verimli G4-dizileme analiziyle ise yaklaşık 700000 pG4 ortaya çıkarılmıştır (Chambers vd., 2015). Dizi çeşitliliği göz önüne alındığında pG4'ler genomda rastgele değil belli fonksiyonel bölgelerde bulunur (Şekil 2.4). Bu bölgeler G-zengini mikro ve minisatellitler, telomerler, mitotik ve mayotik çift zincir kırılma (DSB, "double-strand break") bölgeleri, transkripsiyonel başlangıç bölgeleri (TSS, "transcriptional start site"), mRNA'ların 5'-UTR bölgesidir (Bochman v.d., 2012). Bulunduğu bölgeler de göz önüne alındığında G-kuadrupleksler transkripsiyon, translasyon, DNA replikasyonu, DNA hasar tamiri, genomik stabilite ve epigenetik dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar (Şekil 2.4). Ayrıca bu bölgeler farklı türler arasında genel olarak korunmuştur. Sadece G4 yoğunluğu, dizi içeriği veya uzunluğu bakımından değişkenlik gösterir. G4'ler bakteri, düşük ökaryotik canlılar, insan RNA ve DNA virüsleri dahil olmak üzere pek çok organizmada bulunur (Rhodes vd., 2015).

2.2.1. G-Kuadruplekslerin telomerlere etkisi

İnsan genomunda biyolojik olarak keşfedilen ilk G-kuadrupleks yapısı telomer bölgesindedir ve en fazla bu bölgede bulunur. İnsan telomeri kromozomların tek zincirli 3'- uçlarında d(TTAGGG) ardışık tekrar dizilerinden oluşur. Kromozom uçlarının birbirine bağlanmasını, nükleazlar tarafından kesilmesini engeller. Guanince zengin bu bölge G4 yapısının oluşumu için oldukça uygundur.

Telomerik G4'lerin *in vivo* kanıtı G4'e bağlanan antikör kullanılarak *Stylonychia* telomerinde gösterilmiştir (Schaffitzel vd., 2001). Bu çalışmada telomerde antiparalel intermoleküler G4 yapısının varlığı ve DNA repikasyonu sırasında yapının açıldığı gösterilmiştir. Böylece telomerdeki G4 yapısının telomer bölgesini kaplayarak koruduğu önerilmiştir. Daha sonraki çalışmalar telomerik G4 yapısı ve bu yapıyı tanıyan proteinler üzerine yoğunlaşır. Rif1 (replikasyon zamanlamasını düzenleyen faktör 1) ve TFR2 (telomerik tekrara bağlanan faktör 2) proteinlerinin telomerik G4 yapısına bağlanarak kromozom uçlarını koruduğu bulunmuştur (Biffi vd., 2012). TLS/FUS (Liposarkomada transloke/ sarkomada bulunan) proteini hem telomerik DNA G4 hem de RNA G4 yapısına bağlanarak histon metilasyonu seviyesini arttırdığı ve böylece kromatin uçlarını koruduğu tespit edilmiştir (Takahama vd., 2013). Kromozom uçlarının korunmasının

yanı sıra telomerik G4'ler telomer uzunluğunun düzenlenmesinde özellikle telomeraz aktivitesinin sınırlandırmada görev yapar. İntramoleküler antiparalel topolojiye sahip G4 yapısı telomerazın bağlanmasını engellerken intermoleküler paralel topolojiye sahip G4 yapısı telomeraz enzimi tarafından açılabilir (Moya vd., 2015). Telomer ucuna bağlanan protein α ve β (TEBP α/β) tarafından telomerik G4'lerin kapanmasının düzenlenmesi telomer uçlarının nükleazlardan korunmasına ve RecQ benzeri helikazlar ise gerektiğinde telomer sentezi için yapının açılmasına yardımcı olur (Rhodes ve Lipps, 2015).

2.2.2. G-Kuadruplekslerin transkripsiyon ve translasyona etkisi

İnsan telomerindeki G-kuadrupleks yapısının varlığına ait ilk bulgular radyoaktif ve floresan işaretli G4 stabilize eden moleküllerin veya yapı-spesifik antikorumların mikroskop görüntülerinde kromozom uçlarındaki sinyale dayanır. Fakat sinyallerin sadece kromozom uçlarında değil kromozoma dağılmış halde olması G4'lerin kromozom boyunca bulunabileceğini ortaya çıkarmıştır. İnsan genlerinin yaklaşık %40'tan fazlasının promotöründe potansiyel G-kuadrupleks (pG4) dizisinin bulunması gen anlatımının düzenlenmesinde G4'lerin işlevsel olduğunu gösterir. Bu genlere bakıldığında pG4 yapısı onkogen veya düzenleyici genlerde *housekeeping* veya tümör baskılayıcı genlere oranla daha fazla bulunur (Huppert vd., 2007). Promotör bölgesinde bulunan G4 yapısı basitçe RNA polimerazın ilerlemesini engelleyerek transkripsiyonu baskılar. G4 stabilize eden moleküllerin kullanıldığı çalışmalar ile promotörde ve gen sonunda bulunan G4 yapısının gen anlatımının başlamasını ve sonlanmasını etkilediğini göstermiştir (Fernando vd., 2009). Ayrıca insan tüm genom analizi transkripsiyonla ilişkili XPB ve XPD helikazlarının tanıma dizilerinin pG4 dizisiyle çakıştığının tespiti ile transkripsiyon sırasında G4 yapısının açılıp kapanarak gen anlatımını düzenlediği belirlenmiştir (Gray vd., 2014). ATRX (X'e bağlı α -talasemi zihinsel gerilik sendromu) proteini SWI/SNF sınıfı bir kromatin yeniden düzenleyici faktördür ve DAXX histon şaperonuyla birlikte genomda ardışık tekrarlı dizilere bağlanır. Bu tekrar dizilerinin pG4 dizisi olabileceği bilgisayar temelli çalışmalar ile gösterildikten sonra *in vitro*'da ATRX proteinin G4 yapısına bağlandığı belirlenmiştir. Bu durum ATRX yokluğunda G4 yapısı kromatin erişilebilirliği ve gen anlatımını olumsuz etkileyebilir (Truch vd., 2022). DNazI duyarlı bölgelerde pG4'lerin varlığı nükleozom oluşumunu ve kromatin kararlılığı ile ilişkilendirilebilir (Hegyi, 2015). Pek çok gene ait RNA'nın 5' çevrilmeyen bölgesinde (5'UTR) pG4 yapısının bulunduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir (Bugaut

vd., 2012). Örneğin kırılğan X sendromuna neden olan CGG tekrarlarının fazlalığı G4 yapısını oluşturur. 5'UTR bölgesindeki bu G4 yapısı translasyonu engelleyici rol oynar (Darnell vd., 2001). Telomerik DNA'nın transkripsiyonundan sorumlu uzun guanince zengin tekrarlar içeren RNA'da (TERRA) G4 yapısının bulunması şaşırtıcı değildir. Telomere bağlanan protein TRF2, TERRA G4'leri ile etkileşime girerek telomer organizasyonunu düzenler (Biffi vd., 2012). Öncül mRNA'nın ekzon kesilme bölgelerinde bulunan G4'ler hem olgun mRNA oluşumunda hem de alternatif kesilme sürecinde rol oynar. Çoğunlukla RNA G4'leri mRNA'lar üzerinden araştırılmış olsa da bu yapılar lncRNA, miRNA, piRNA gibi kodlanmayan RNA'larda da bulunur (Kharel vd., 2020).

2.2.3. G-Kuadruplekslerin replikasyona etkisi

Replikasyon sırasında DNA polimerazların ve helikazların genetik ve epigenetik kararsızlığı önlemek için G-kuadrupleks yapısını düzenlediğine dair pek çok çalışma vardır (Valton vd., 2016). Transkripsiyon veya replikasyon sırasında çift-zincirli DNA'nın açılması, tek-zincirli DNA'yı açığa çıkararak G4 yapısının katlanmasını destekler. Fakat bu durum DNA veya RNA polimerazlarının zincir üzerinde ilerlemesini engelleyebilir. Hücrede G4 yapısının açılmadığı ve replikasyon çatalının ilerlemeye devam edemediğinde Okazaki parçalarına benzer 60-300 nükleotitten 80 kilobaza kadar değişen boyutlarda DNA delesyonları meydana gelir (London vd., 2008). G4 yapısını açarak replikasyonun doğru bir şekilde işlemesine yardımcı olan ve genomik kararsızlığı önleyen WRN helikazı telomer bölgesinin, FANCI, BLM ve Pif1 helikazları genomun iç bölgelerinin replikasyonunda görev alır. Bu helikazlardaki mutasyonlar çift-zincir kırığı, telomer kısalması, DNA parçalarının oluşması veya replikasyonun tamamlanmamasına neden olur. Kusurlu replikasyon sonucunda ise genomik kararsızlık meydana gelir (Brosh, 2013). Ayrıca mitoz sırasında açılmamış G4 içeren zincirin kalıp olarak kullanılması DNA lezyonuna neden olduğu ve bu durumun sonraki hücrelere aktarıldığı PCR temelli analizlerle ortaya çıkarılmıştır (Lemmens vd., 2015). Bir başka çalışmada ise G4 yapısından dolayı duraksayan DNA polimeraz kompleksinin kurtulması için EXO1 ekzonükleaz enziminin birkaç nükleotidi keserek yapının açılmasını ve DNA polimerazın serbest kalmasını sağladığı tespit edilmiştir (Stroik vd., 2020).

Replikasyon başlama bölgelerinin GC açısından zengin diziler içermesi bu bölgelerde pG4'lerin olabileceğini işaret eder. Bu bölgelerdeki pG4'lerin replikasyonun

başlamasını tetiklediği keşfedilmiştir. (Valton vd., 2014). G4 içeren replikasyon orijinlerinin nükleozomdan yoksun bölgelerde bulunması, replikasyonun başlaması için görevli proteinleri veya helikazların G4 yapısını tanıyıp bu bölgelere yönelmesi replikasyonun başlamasına yardımcı olabilir (Dell'Oca vd., 2024).

Mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) ağır zinciri pG4 dizileri bakımından zengindir. G4 ligandı ile yapılan *in vitro* bir çalışmada ligandın mtDNA'ya seçici olduğu ve buradaki G4 yapısına bağlanarak DNA/RNA polimerazın işlevini inhibe ettiği ve solunumda görevli proteinlerin kodlandığı genlerde delesyonlara yol açtığı bulunmuştur. G4 yapısının bu rolü antiparalel G4 yapısının oluşumunu tetikleyen bir mutasyonun oluşturulması ile doğrulanmış ve hücrel solunum fonksiyonunda ciddi sorunlara yol açtığı gözlenmiştir (Falabella vd., 2019). Ek olarak bazı virüslerin replikasyon başlama bölgesinde pG4 dizisi keşfedilmiştir. Böylece viral genomun replikasyonunda da G4 yapısının etkin olabileceği varsayılabilir (Madireddy vd., 2016).

2.2.4. G-Kuadruplekslerin kromozom yeniden şekillenmesi ve genomik kararlılığa etkisi

G-kuadrupleks yapısının telomerler, promotör ve replikasyon başlama bölgesi gibi bulunduğu yerler göz önüne alındığında yapının kromozom yeniden şekillenmesine etki etmesi şaşırtıcı değildir. Daha önce tartışıldığı gibi G4 yapısı nükleozomdan yoksun bölgelerde bulunması nükleozom konumlanmasının yanı sıra histon modifikasyonlarını da düzenleyebilir (Guilbaud vd., 2017). Ayrıca kromozom yeniden şekillenmesine örnek olarak G4 yapısını tanıyabilen YY1 transkripsiyon faktörünün hem G4 yapısına hem de uzak kromatin bölgelerine bağlanması DNA ilmeği oluşumunu destekler. Bu mekanizma enhancer-promotör etkileşimlerini düzenleyerek gen ekspresyonunu etkileyebilir (Li vd., 2021).

Polimerazlara engel teşkil eden G4 yapısının ortadan kaldırılmasıyla meydana gelen DNA kırıkları DNA mutasyonlarına neden olur ve DNA hasar yanıtı (DDR) yolağını aktive eder (Pavlova vd., 2021). Kanseri hücrelerinde G4 stabilize eden moleküllerin kullanıldığı çalışmada DDR yolağında görevli H2A.X ve ATM'nın fosforilasyona uğrayarak yolağı aktive ettiği tespit edilmiştir (De Maris vd., 2019).

İnsan genomundaki *in silico* analiz ile 30 binden fazla rekombinasyon bölgesinde potansiyel G4 dizisi ortaya çıkarılması ile mayotik rekombinasyonda G4 yapısının etkili olabileceği sonucuna varıldı (Mani vd., 2009). G4 yapısını açmakla görevli BLM helikazı bulunmayan insan ve fare embriyonik kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada kardeş

sentezinin baskılanmasına neden olur. Fakat kodlanmayan dizide OG varlığı ise transkripsiyonu tetiklemektedir (Fleming vd., 2017).

Kromozom uçlarında tek-zincirli DNA formunda bulunan telomer bölgesindeki guaninler serbest radikallerin saldırısına açıktır. OGG1 (8-oksoguanin glikosilaz) ve BER (baz kesip çıkarma tamiri) G4 guaninleri üzerindeki aktivitesi oldukça düşük ve yavaştır. Bu durum telomerlerde yapı ve fonksiyonu etkileyen oksitlenmiş azotlu bazların birikimine yol açar (Dou vd., 2003). Oksijen radikallerinin G4 yapısındaki azotlu bazların hasarına yönelik smFRET mikroskopisi kullanılarak yapılan çalışmada guanin oksidasyonunun G4 yapısını açtığı ve timin oksidasyonunun ise G4 yapısının oluşumunu engellediği gösterildi (Lee vd., 2017). G4 yapısının açılması telomer bölgesini daha ulaşılabilir olmasını sağlayarak telomeraz aktivitesini artırabilir. POT1 (telomer koruması) proteini telomere daha kolay bağlanır ve tamir enzimlerinin bağlanmasını engeller. Sonuç olarak uzayan telomer bölgesinde oksidasyonlu bazlar birikir (Theruvathu vd., 2014).

Timin bazının oksidasyonu sonucu oluşan timin glikol (Tg) G4 ilmeğinin G-tetrad yakınında olursa yapı bozulur. Tg üzerindeki fazladan iki OH grubu hem sterik engel yaparak hem de hidrasyon seviyesini arttırarak G4 yapısının oluşumunu zorlaştırır (Lee vd., 2017). Azotlu bazların oksidasyon ürünleri tekrar oksidasyona uğramaya meyillidir. Tekrar tekrar NEIL glikosilaz enzimi tarafından onarılması telomer kısalmasına ve fonksiyon kaybına neden olur.

2.3. G-kuadrupleks Ligandları

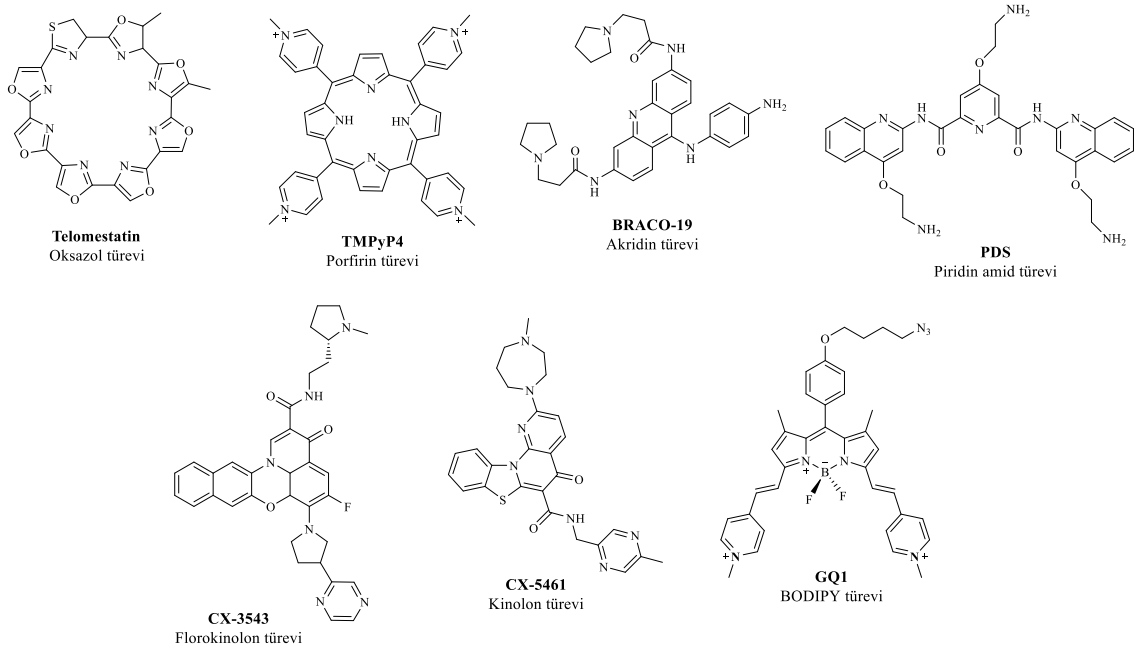
Nükleik asitlerin guanince zengin bölgelerinde oluşan G-kuadrupleks yapısının kanserle ilişkili genlerin promotöründe ve telomer bölgesinde bulunması DNA replikasyonu, genomik kararlılık, transkripsiyonel düzenlemede rol oynadığı son yıllarda yapılan pek çok çalışmada gösterildi. Bu çalışmalar G4 yapısının başta anti-kanser araştırmaları olmak üzere pek çok farklı alanda ilaç hedefi olarak potansiyel taşıdığını vurgulamaktadır. G4 yapısının telomeraz aktivitesini ve onkogen transkripsiyonunu baskılamada kullanılması için G4 yapıyla etkileşime giren ve onu stabilize eden küçük moleküller tasarlanmaya başlandı. G4 yapısıyla etkili bir şekilde etkileşime girebilen bu küçük moleküller G4 ligandı veya stabilizatör olarak adlandırılır. Farklı bölgelerdeki farklı biyolojik fonksiyonlara sahip G4 yapısından dolayı G4 ligandları hücreyi farklı şekilde etkileyebilir. Örneğin, replikasyon çatalının ilerlemesi durdurarak tek zincirli DNA kırıklarına, RNA G4 yapısını stabilize ederek translasyonun engellenmesine neden

olabilir. Bu ligandlar G4 yapısına karşı yüksek ilgi gösterdiği gibi başka nükleik asit bölgelerine de bağlanabilir. Bundan dolayı, özellikle G4 yapısına bağlanırken diğer DNA veya RNA ikincil yapılarına bağlanmayan ligandların tasarlanması büyük öneme sahiptir. G4 yapısında ligandlar için birçok interaksiyon bölgesi vardır; terminal G-tetrad, orta G-tetrad, oluk/ilmek/omurga bölgesi veya merkez kanal gibi (Zhang v.d., 2014). Düzlemsel aromatik halkalı ligandlar genel olarak π - π istiflenme aracılığıyla G4 ile etkileşime girerken çok azı G-tetradların arasına interkale olur. Amino grubu veya yan zincir içeren ligandlar, G4 yapısındaki oluk, ilmek ve negatif yüklü fosfat omurgası ile etkileşime girer. Protonlanma veya metilasyon ile amino grubunun pozitif yük kazanması ligandın G4 yapısının oluklarını veya negatif yüklü fosfat omurgasını daha iyi tanımasına ve elektrostatik etkileşimlerle daha güçlü bağlanmasına olanak sağlar (Zhang vd., 2014). Ligandın modifiye edilmiş yan zincirleri ilmekteki bazıları ve oluşu tanıyabilir ve hidrojen bağı oluşturur, ayrıca ligandın sudaki çözünürlüğünü artırır. Küçük ve uzun pozitif yüklü yan zincirlere sahip ligandlar G4 yapısının merkezine uzanabilir ve yapıyı stabilitesini artırır. Düzlemsel ligandların G-tetrad arasına girme potansiyeli olmasına rağmen yüklü ligandların G4 yapısındaki oluk, ilmek, omurgaya daha fazla etkileşime sahip olduğu araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir (Murat vd., 2011, Neidle 2017). Sonuç olarak G4 ligandları, G4 yapısına doğrudan bağlanabilir, G-tetradların arasına interkale olabilir veya G4 ile ilişkili proteinlere bağlanabilir. Ligand ile G4 yapısı arasındaki bağlanma sabitinin (K_D) 10^{-6} mol.L⁻¹ seviyesinde veya daha düşük olması beklenir (Sun vd., 2019).

G-tetrad uçlarına ligandların bağlanması ligand-G4 komplekslerinin en yaygın etkileşimidir. Bu yüzden G4 ligandları öncelikli olarak G-tetrad uçlarına π - π istiflenme ile etkileşim sağlayacak küçük, düzlemsel aromatik halkasal yapıda tasarlanmıştır (Şekil 2.6). Büyük aromatik yüzeye sahip ligandlar G4 DNA'ya dupleks DNA'ya göre daha yüksek seçicilikle bağlanır. Porphirin türevi olan TMPyP4 merkezinde bir aromatik halka ve halkanın dört köşesinde dört *N*-metilasyon grubu bulunan bir moleküldür ve G4 ligandı olarak yaygın bir şekilde çalışılmıştır (Anantha vd., 1998, Han vd., 2001). TMPyP4'ün, G4 yapısına yüksek ilgi sergilediği, telomeraz aktivitesini inhibe ettiği, birçok onkogenin anlatımını baskıladığı saptanmıştır (Siddiqui-Jain vd., 2002, Grand vd., 2002, Kim vd., 2003, Cogo ve Xodo 2006). Liganda bulunan porfirin halkası ile G-tetradın bir ucuna yerleşir (Parkinson vd., 2007). TMPyP4'ün yüksek ilgiyle G4'e bağlanmasına rağmen düşük seviyede G4 DNA'ya karşı seçiciliği vardır, dupleks DNA'ya da bağlanma kapasitesi bulunur (Dixon vd., 2005). Akridin türevi olan BRACO-19 telomeraz inhibisyonu gösteren aromatik bir G4 ligandıdır (Gowan vd., 2002) ve G4 yapısının en

üst veya en alt G-tetradı ile oluklarına bağlanabilir (Machireddy vd., 2017). Piridin amid türevi piridostatin (PDS) seçici olarak üst G-tetradı bağlanır (Rodriguez v.d., 2008). Telomerik bölgedeki G4 yapısı stabilizasyonu yoluyla BRCA2 eksikliği olan hücrelerde telomer kırılabilirliğini artırır ve böylece çift sarmal kırıklarının birikimini ve kontrol noktası aktivasyonunu indükleyerek ve G2/M ilerlemesini düzensizleştirerek homolog rekombinasyon (HR) kusurlu hücrelerin çoğalmasını azaltır. Ayrıca bir prob olarak kullanılarak RNA G4 yapılarının *in vitro* haritası çıkarılmıştır (Kwok vd., 2016). *Streptomyces annulatus*'dan izole edilen doğal makrosiklik bileşik Telomestatin, telomerik G4'e bağlanarak telomeraz inhibisyonu sağlar (Shin-ya v.d., 2001). Florokinolon türevi olan CX3543 ve CX-5461 G4 yapısına yüksek ilgiyle bağlanarak PolI transkripsiyonu baskılar ve apoptotik hücre ölümüne yol açar (Drygin vd., 2009, Masud vd., 2021). Ayrıca CX5461 için ilk defa klinik çalışmalar yapılmış ve Faz I denemelerine başlanmıştır (Hilton vd., 2022).

Ayrıca çalışma grubumuz tarafından BODIPY türevi olan GQ1 ligandının c-myc oligomerinin üst G-tetradına seçici olarak bağlandığı ve HIF-1 α gen anlatımını azaltarak hipoksi ile ilişkili metabolik yeniden düzenleme, oksijen tüketimini etkilediği ve hücre göçünü engellediği bulundu (Baser vd., 2023).

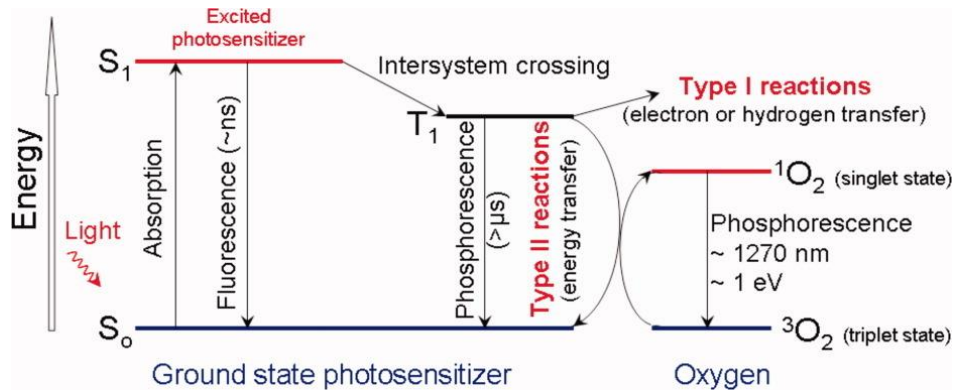


Şekil 2.6. G-kuadrupleks ligand örnekleri (Santoz v.d., 2021, Baser vd., 2023).

G-quadruplex/i-motif ligandları veritabanı G4LDB 2.2'ye göre literatürde 3200'den fazla ligand vardır (Wang vd., 2022). Bu ligandların arasında antrakininler, amidoakridinler, kinakridinler, kindolinler, katyonik porfinler, perilenler, berberinler, kinoantroksazin, bistriazol, biskinolinyum ve bunların türevleri gibi pek çok kimyasal yapı G4 ligandı olarak tasarlanmış ve çalışılmıştır (Ou vd., 2008; Santoz v.d. 2021). Fakat bu ligandların büyük çoğunluğu G4'e karşı yüksek ilgi gösterebilir bile belli hücre tipine veya ortam şartlarına göre aktifleşebilme özelliğine sahip çok az ligand bulunmaktadır. Yeni çalışmalar, G4 ligandlarının biyouyumlu, hücre seçiciliği veya ışık varlığında, enzimatik reaksiyon ile aktifleşme gibi daha fonksiyonel uyarı-duyarlı ligand tasarlanması yönünde gelişmektedir. Işık ile uyarılan ligand tasarımı dalga boyu, yoğunluk, mesafe veya sürenin kolayca ayarlanabilmesinden dolayı son yıllarda birçok araştırma grubu tarafından çalışılmaktadır (Velema v.d., 2014).

2.3.1. Fotoduyarlastırıcı G4 ligandları

Düşük oksidasyon potansiyelinden dolayı guanin bazı oksidatif hasara karşı duyarlıdır. G4 ligandları aracılığıyla kontrollü ROS oluşumu hedefli terapötik yaklaşımlar için fotodinamik terapinin (PDT) kullanılmasına olanak tanımıştır. PDT'nin başarıyla gerçekleşmesi için fotoduyarlastırıcı (PS) bir molekül, moleküler oksijen ve ışık kaynağı gereklidir. G4 ligandları bu amaçla tasarlanarak PS olarak görev alabilir.

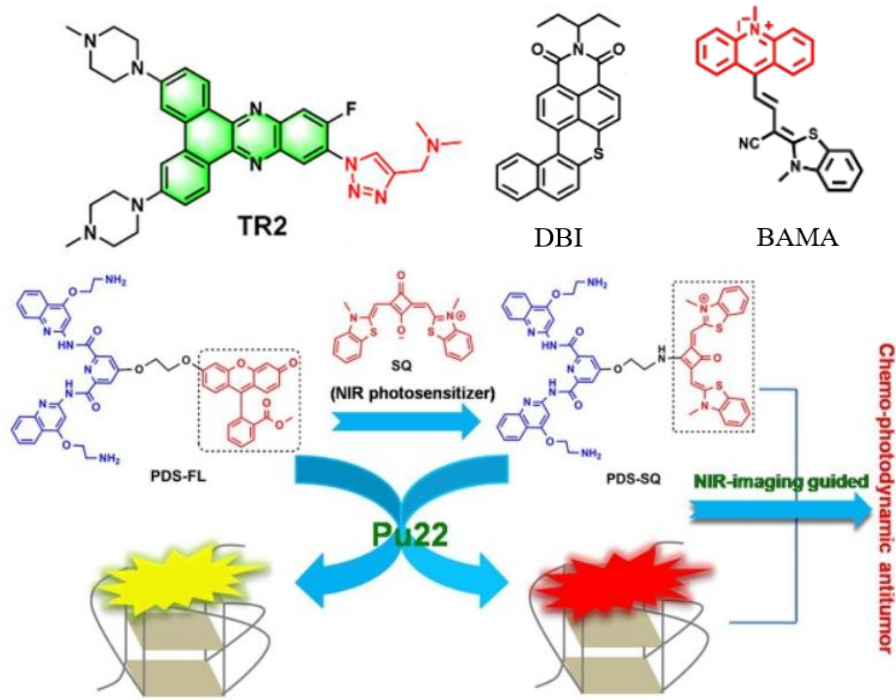


Şekil 2.7. Modifiye edilmiş Jablonski Diagramı (Agostinis vd., 2011).

Çoğu PS, S_0 temel enerji seviyesinde, moleküler orbitalinde zıt spinli iki elektrona sahiptir. Işık Emilimi bir elektronun daha yüksek enerjili bir orbitale aktarılmasına yol açar. Uyarılmış PS oldukça kararsız halde S_1 seviyesine geçer, fazla enerjisini ısı veya floresan olarak yayar. Alternatif olarak uyarılmış PS, bir elektronun ters spinine sahip

daha kararlı bir triplet durum (T_1) oluşturmak için bir sistemler arası geçişe (ISC) uğrayabilir (Şekil 2.7). T_1 durumundaki PS doğrudan fosforesans yayarak S_0 seviyesine geçebilir, Tip II enerji transferi veya Tip I elektron transferi yaparak ROS oluşturabilir. Tip II reaksiyonda uyarılmış triplet durumundaki PS, temel triplet haldeki moleküler oksijene (3O_2) enerji aktarır, kendisi temel seviyeye geçerken moleküler oksijen uyarılmış singlet duruma geçerek singlet oksijen (1O_2) oluşur. Tip I reaksiyonda ise PS elektronca zengin substratı indirgenir ve radikal anyon PS oluşur. İndirgenmiş PS elektron donörü olarak davranır ve moleküler oksijene elektron transfer eder. Böylece süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur, daha sonraki indirgenmelerle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşur (Şekil 2.7, Agostinis vd., 2011). Sonuç olarak PS aracılığıyla oluşan ROS hücrede oksidatif stresi tetikler ve apoptotik, nekrotik veya otofaji ile ilişki hücre ölümü meydana gelebilir. İdeal bir fotoduyarlastırıcı G4 ligandının seçici olarak G4 yapısına bağlanması ve çok az karanlık toksisite göstermesi beklenir.

Katyonik porfirin türevi ZnP1, seçici olarak telomerik G4'e bağlandığı ve mavi ışık altında singlet oksijen üreterek DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir (Beniaminov v.d., 2016). Triazole birimi bulunan dibenzokinoksalin türevi TR2, telomerik G4 yapısına seçici olarak bağlanır, 465 nm ışık altında Tip 1 mekanizmasıyla ROS üretir. Fotositotoksitesi çeşitli kanser hücrelerinde nanomolar derişim seviyesindedir ve 3D tümör sferoid oluşumunu inhibe etmiştir (Şekil 2.8.a, Zhang vd., 2024). Dibenzotiyoksanten imide (DBI) paralel G4 yapısına yüksek afiniteyle bağlandığı, mavi ışık altında HeLa ve MCF7 hücre hatlarında yüksek fotositotoksite ($IC_{50} < 30 \mu M$) göstermiştir. Ayrıca zebra balığı rabdomiyosarkom modelinde yapılan *in vivo* analizlerle anti-tümör etkisi belirlenmiştir (Şekil 2.8, Deiana vd., 2023). Benzotiyazolyum-asetonitril-metilakridinyum konjugatı (BAMA) G4 RNA yapısını hedefler ve beyaz ışık altında Tip I mekanizmasıyla $O_2^{\cdot-}$ üretir. Hem normoksi hem de hipoksi (%2 O_2 seviyesi) ortamında fotositotoksite göstermiştir. RNA dizilime analizleri BAMA uygulanmış hücrede oksidatif stres, immünite ve hücre ölümü yollarının etkilendiği belirlenmiştir (Şekil 2.8, Chen vd., 2023). G4 ligandı olarak iyi çalışılmış piridostatinin floresan grup (PDS-FL) ve squaraine boyası (PDS-SQ) ile modifiye edilerek hem bir prob hem de PS içerir şekilde tasarlanmıştır. c-MYC G4 yapısına yüksek oranda seçici olan PDS-SQ, yakın kızılötesi altında ROS üretebilmektedir ve böylece hücreyi apoptoza götürerek anti-tümör etki sunmaktadır (Şekil 2.8, Li vd., 2023).

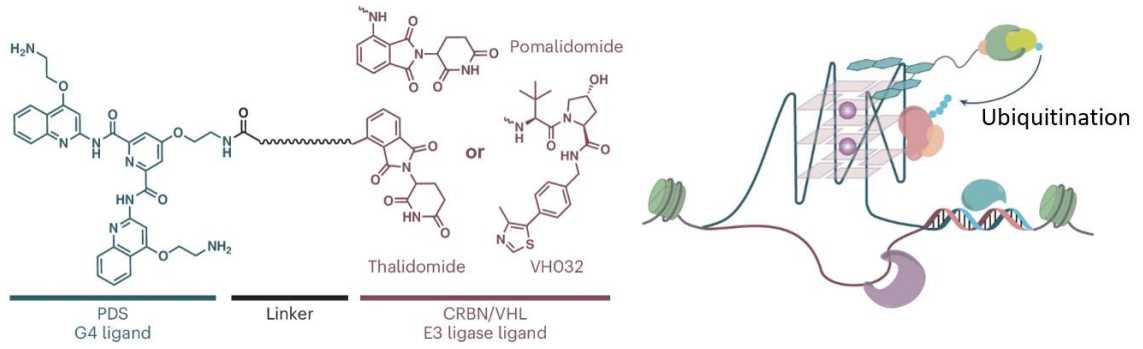


Şekil 2.8. Fotoduyarlastırıcı G4 ligandı örnekleri: TR2 (Zhang vd., 2024), DBI (Deiana vd., 2023), BAMA (Chen vd., 2023), PDS-FL ve PDS-SQ (Li vd., 2023).

2.3.2. Aktifleşebilen G4 ligandları

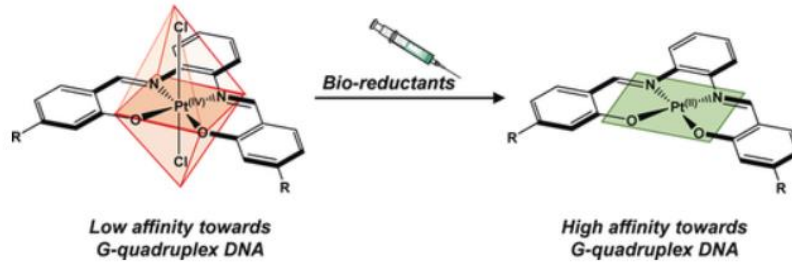
G-kuadrupleks ligandlarının en temel özelliği dubleks DNA yerine G4 yapısını tanıyıp yüksek afinite ile bağlanma yeteneğidir. Fakat günümüze kadar tasarlanan ve sentezlenen pek çok G4 ligandı olmasına rağmen belli bir hücreye yönlendirilen veya hastalıkla ilişkili aktivasyon sağlanan G4 ligandı oldukça az sayıdadır. Fonksiyonel uyarı-duyarlı G4 ligandı tasarlanması hedefli terapötik yaklaşımlara imkan tanır. Bunun için ortam pH'ı, ışık gibi fiziksel uyarılarla konformasyon değişimi, hastalık belirteci protein veya enzim aracılığıyla aktifleşme, nükleik asit dizisi veya G4 yapısı ilişkisi proteinleri spesifik tanıma mekanizmaları kullanılabilir (Asamitsu vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada, G4-ligandlarının hücre/sekans seçiciliğinden ziyade G-kuadrupleks yapılarına bağlanan proteinlerin hedefli yıkımı gerçekleştirilmiştir. G-kuadrupleks ligandı PDS ve E3 ligaz bağlama birimi içeren G4L-PROTAC kompleksi G4 yapısına bağlandıktan sonra G4 yapısı ile ilişkili proteinlerin ubiquitinasyonunu kolaylaştırır (Şekil 2.9). Böylece G4 ilişkili proteinler proteozomal degradasyon ile parçalanır. G4L-PROTAC ligandının kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve FUS ve SMARCA4 gibi transkripsiyon faktörlerini parçalandığı gösterilmiştir (Wang vd., 2026).

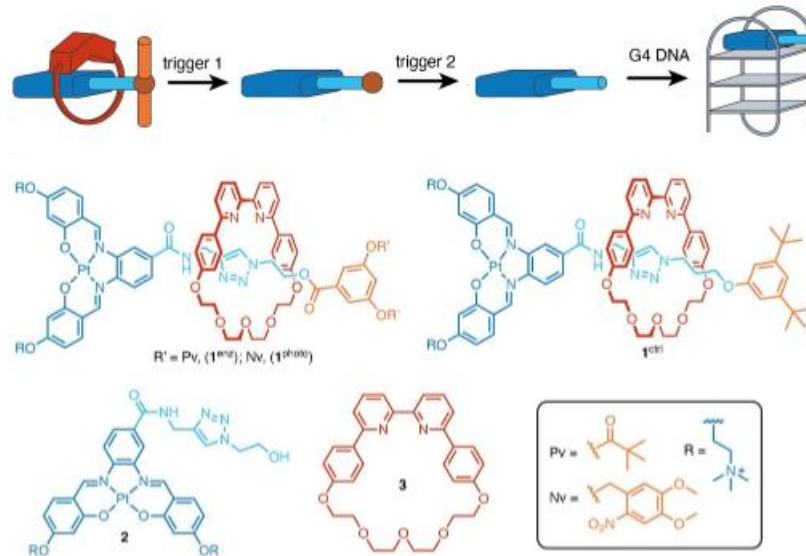


Şekil 2.9. G-kuadrupleks ligandı içeren G4L-PROTAC sistemi ve çalışma mekanizması (Wang vd., 2026).

G-kuadrupleks yapısıyla birlikte yakınındaki nükleik asit zincirini de tanıyabilene G4 ligandları geliştirilmiştir. Bir siklik imidozole/lizin poliamid türevi cIKP ve pirol/imidazol poliamid zinciri PIP yapısından oluşan kompleks G4 yapısını oluşturduğu ve c-MYC G4 yapısına ve yanındaki nükleik zincirine hedeflendiği gösterilmiştir (Asamitsu vd., 2016). G4 ligandı olan Phen-DC3 ile netropsin molekülünün birleşiminden oluşan kompleks de benzer şekilde hem G4 yapısını hem de bitişiğindeki dubleks DNA'ya bağlanma kapasitesine sahiptir (Nguyen vd., 2017). Ayrıca yüksek afinite ile telomerik, mitokondriyel ve RNA G4 yapısına özgü G4 ligandları tasarlanmaktadır (Asamitsu vd., 2019).

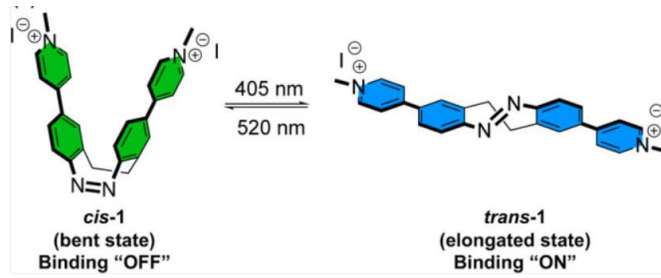


Şekil 2.10. Aktifleşebilir G4 ligandı $Pt^{(IV)}$ -salphen kompleksi (Bandeira vd., 2018).



Şekil 2.11. Aktifleşebilir G4 ligandı rotaksan temelli kafeslenmiş ligand ve 2 nolu molekül (Kench vd., 2021).

İndirgenme ile aktifleşen ilk G4 ligandı oktahedral $Pt^{(IV)}$ -salphen kompleksi Vilar ve ekibi tarafından sunulmuştur (Şekil 2.10). Fizyolojik sulu ortamda (pH: 7.4) DNA ile etkileşime girmezken askorbik asit veya glutatyon gibi biyolojik indirgeyicilerin varlığından düzlemsel $Pt^{(II)}$ -salphen kompleksine indirgendiği ve oluşan bu bileşiğin G4 yapısına yüksek ilgiyle bağlandığı belirlenmiştir (Bandeira vd., 2018). Bileşiğin *in vitro* etkinliği incelenmemiştir. Daha sonra aynı çalışma grubu tarafından $Pt^{(II)}$ -salphen kompleksinin etrafında rotaksan kafesi bulunan (2 nolu molekül, Şekil 2.11) ve esteraz enzimi hidroliziyle veya ışık uyarımıyla iki aşamalı olarak aktifleşen G4 ligandı tasarlamıştır. Dairesel dikroizm kullanarak G4 yapısına bağlanma ilgilerine bakıldığında 2 nolu molekülün yüksek ilgiyle bağlandığı fakat rotaksan bulunan pasif formlarının bağlanmadığı tespit edilmiştir. U2OS osteokarsoma hücre hattında yapılan çalışmalar 2 nolu G4 ligandının toksik etkisinin bulunmadığı ve canlı hücre görüntülenmesinde hücreye girmediği gözlenmiştir. Rotaksan kafesli 2 nolu G4 ligandının hücreye girdiği, UV ışık uygulamasıyla sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bu rotaksan kafesi (3 nolu molekül, Şekil 2.11) hücre alımını arttırmaktadır, esteraz veya ışık ile aktifleşerek kontrollü bağlanma sağlamaktadır (Kench vd., 2021).

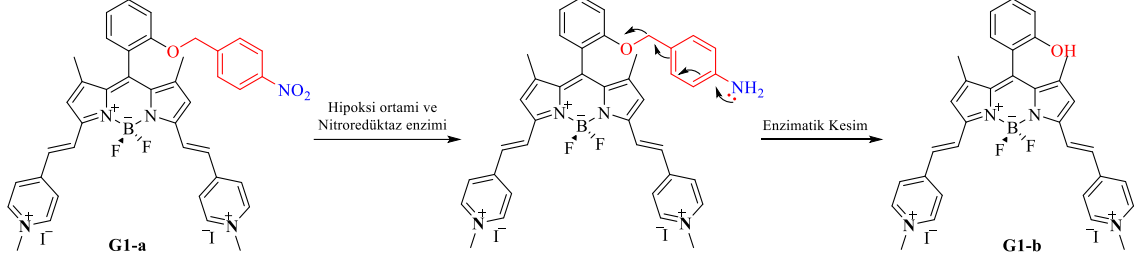


Şekil 2.12. Azobenzen türevli aktifleşebilir G4 ligandı (Ramos-Soriano vd., 2025).

Azobenzen türevlerinin ışık varlığında tersine çevrilebilir şekilde izomerize olması aktifleşebilen G4 ligandı tasarımında kullanılmıştır (Şekil 2.12). Galan ve ekibinin tasarladığı siklik azobenzen molekülü 405 nm ile uyarıldığında *trans* izomerine dönüşür ve HIV-1 uzun terminal tekrarı bölgesindeki (LTR-III) G4 DNA'ya *cis* izomerine oranla 50 kat fazla bağlanma afinitesi gösterir (Ramos-Soriano vd., 2025). Dudek ve ekibinin *orto*-fluoroazobenzen türevleri üzerinde yaptıkları çalışmada görünür ışık altında *cis* izomerlerine dönüşen Q-Azo4F-C G4 ligandının A549 hücre hattında oldukça toksik (IC₅₀ 4.8 µM) olduğu, buna karşılık *trans* izomerinin daha az toksik (IC₅₀>100 µM) etki gösterdiği belirlenmiştir (Dudek vd., 2025). Siklik azobenzen türevleriyle (diazosinler) yapılan bir başka çalışmada da görünür ışıkta *trans* izomerine dönüşen G4 ligandının *cis* izomerine kıyasla G4 yapısına daha fazla stabilize ettiği ve U2OS hücre hattında 311 genin transkripsiyonel aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir (Zhang vd., 2025). Bir kafes birimi nitroveratril içeren ve piridostatin türevi olan [C]-PDS, 365 nm UV ışık varlığında kafes biriminin kopmasıyla aktifleşerek G4 yapısına bağlandığı ve fotositotoksiste, SRC onkogeninin anlatımını baskıladığı, telomeraz inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (Murat v.d., 2011).

Son yıllarda BODIPY temelli moleküller G4 ligandı olarak çalışılmaktadır. Çoğunlukla G4 yapısına yüksek afiniteye sahip floresan prob olarak tasarlanmıştır (Zhang vd., 2014). Wang ve ekibi tarafından sentezlenen BODIPY temelli MYC3 ligandının c-MYC promotörüne yüksek afiniteyle bağlandığı belirlenmiştir (Li vd., 2022). Bir başka BODIPY temelli G4 liganları Dembska ve ekibi tarafından sentezlenmiş ve c-MYC G4 yapısını stabilize etmiştir (Żubertowski vd., 2025). Çalışma grubumuz tarafından sentezlenen ilk aktifleşebilir distiril BODIPY türevi ligand G1a sentezlenmiştir. Hipoksi ortamında indirgeyici enzimler tarafından nitrobenzil biriminin indirgenerek aktifleştiği (Şekil 2.13) ve G4 yapısına yüksek afiniteyle bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca hücre döngüsünden sorumlu onkogenlerden biri olan c-MYC geninin anlatımını transkripsiyonel olarak azalttığı gözlenmiştir (Uyar v.d., 2023). Piridinyum BODIPY

temelli benzer bir ligand kullanılarak kanser kanser metabolik yeniden programlanması çalışma grubumuzun yaptığı araştırmalarda sağlanmış ve metastatik eğilim baskılanmıştır (Baser v.d. 2023).



Şekil 2.13. Hipoksi ortamında aktifleşen G4 ligandı ve aktifleşme mekanizması (Uyar v.d., 2023).

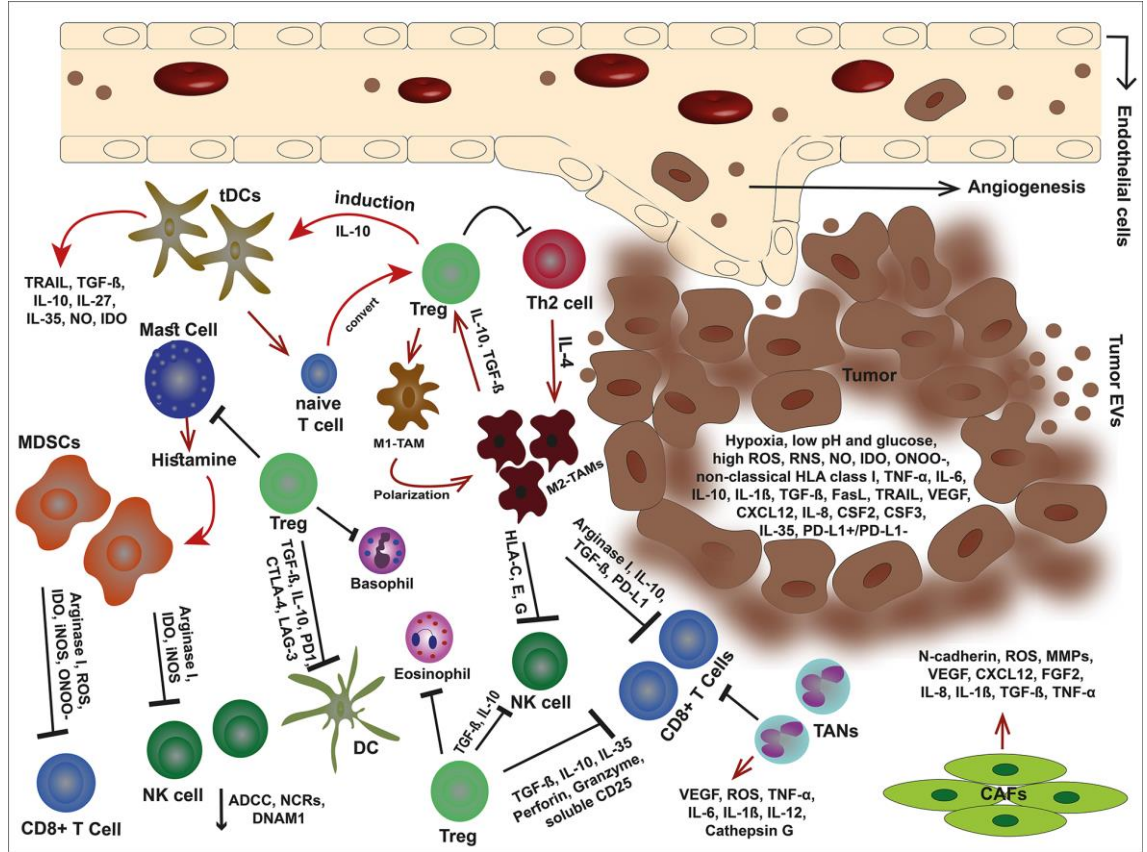
2.4. Tümör Mikroçevresi

Kanser, birden fazla faktörün neden olduğu karmaşık bir hastalıktır ve temelde gen ekspresyonu ve protein aktivitelerinin kontrolünün bozulmasına bağlı olarak hücrenin apoptozdan kaçması ve aşırı hücre bölünmesiyle ortaya çıkar. Hücrede biriken mutasyonlar karar mekanizmasının bozulmasına yol açarak hücrenin kontrolsüz bölünmesine ve metastatik özellikler kazanmasına neden olur. Onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin susması hücre döngüsünün bozulmasına ve hücre ölümünün inhibisyonuna yol açar. Dahası malignant kanser hücresi hücreler arası bağlantıdan sorumlu proteinlerin anlatımını azaltarak ve hücre hareketini sağlayan proteinlerin anlatımı arttırarak metastaz yapabilir ve vücut boyunca yayılabilir (Sarkar vd., 2013). Bu yüzden kanser insan sağlığını tehdit eden ciddi bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada 2024 yılında yaklaşık 20 milyon yeni vaka ve 10 milyon ölüm gerçekleşmiştir. 2040 yılına gelindiğinde 28.4 milyon insanın kanserden etkileneceği öngörülmektedir (Ferlay vd., 2024).

Kanser gelişimine bakıldığında kanser hücresi bağımsız düşünülemez. Kanser hücresi yaşamak ve gelişmek için çevreden gelen sinyal veya desteklere ihtiyaç duyar. Kanser hücresinin etrafını saran bu çevreye tümör mikroçevresi (TMÇ) adı verilir. Tümör mikroçevresi oldukça kompleks ve heterotipik yapıdadır. Burada tümör hücrelerinin sürekli olarak çoğalmak, apoptoza direnmek, bağışıklık sisteminden kaçmak ve metastaz için gerekli sinyal ve bileşenler aldığı hassas bir sistem vardır (Balkwill vd., 2012). Erken aşamada pek çok çalışma sadece kanser hücresine odaklanırken kanser gelişimi

çalışmalar ilerledikçe TMÇ'nin tümör oluşumu, gelişimi, metastazı, ilaç direnci, bağışıklık baskılamasında kilit rol oynadığı kanıtlanmıştır. Genetik kararsızlığından dolayı ilaç direncine yatkın kanser hücrelerini hedeflemek yerine nispeten daha kararlı gen özelliklerine sahip TMÇ'nin diğer bileşenlerini hedefleyen tedaviler ortaya çıkmaktadır.

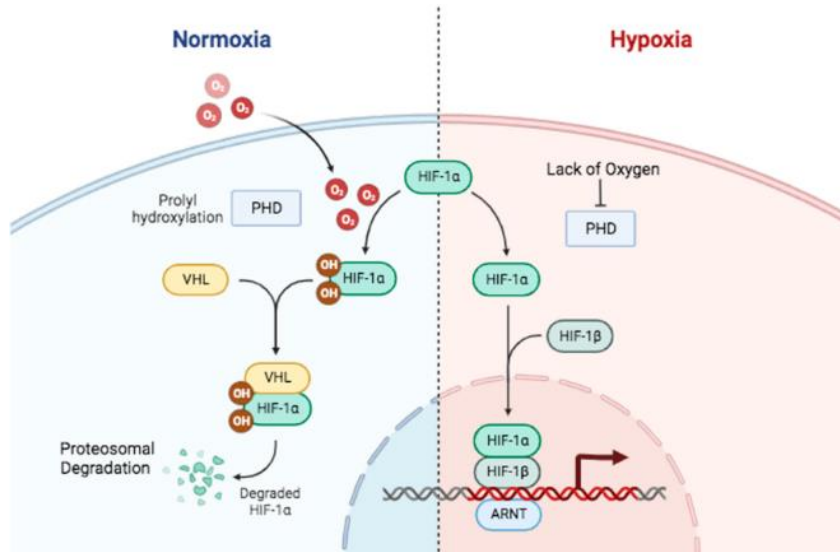
Tümör mikroçevresi hücrel ve hücrel olmayan bileşenleriyle dinamik bir sistemdir (Şekil 2.14). Kanser tipine göre TMÇ bileşenleri çok çeşitlik gösterir. Oksijen, pH ve basıncın etkilediği fiziksel mikroçevre; hücre dışı matriks, kan damarlarının oluşturduğu mekanik mikroçevre; glikoz, lipid, sitokinlerin olduğu metabolik mikroçevre; bağışıklık hücrelerinin bulunduğu immün mikroçevre; bağ dokusu hücrelerinin oluşturduğu stromal mikroçevre gibi çeşitli bileşenler tümör mikroçevresini oluşturur ve birbirleriyle etkileşim halindedirler (Anderson vd., 2020, Wang vd., 2025).



Şekil 2.14. Tümör mikroçevresi (Anderson vd., 2020).

2.4.1. Fiziksel mikroçevre ve hipoksi ortamı

Normal fizyolojik koşullarda dokulardaki oksijen seviyesi %4-8 arasında değişmektedir. Oksijen seviyesinin %2'nin altında olan ortama hipoksi ortamı adı verilir (McKeown, 2014). Hipoksi tümördeki oksijen ihtiyacı ve tüketimindeki dengesizlikten kaynaklanan düşük oksijen seviyesindeki ortamdır. Hızlı çoğalan kanser hücreleri oksijen tüketimini artırırken diğer yandan tümör boyunca yayılan kılcal damarlar oksijen ihtiyacını karşılar (Brown ve Wilson, 2004). Ayrıca daha büyük tümörlerde kan damarlarından uzaklaşan hücrelerde oksijenin sınırlı difüzyonu hipoksi ortamı oluşturur. Hipoksi ortamında hücrede hipoksiye duyarlı faktörler aktive olarak pek çok genin aktivasyonuna yol açar. Hücre metabolik yollarını değiştirir ve hipoksi ortamına uyum sağlar (Semenza, 2012). Normal oksijen koşullarında sitoplazmada HIF-1 α alt birimi prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından prolin birimlerinden (Pro-402 ve Pro-564 birimleri) hidroksile edilir. Hidroksillenmiş HIF-1 α Von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaz enzimi tarafından tanınır ve ubiquitinasyon-proteazom sistemiyle çok kısa sürede parçalanır. Ancak hipoksik koşullarda PHD etkinlik gösteremez ve HIF- α çekirdeğe girerek HIF- β alt birimi ile birleşerek birden fazla hücresel yolda görevli genin promotöründe bulunan hipoksi yanıt elemanı (HRE) bölgesine bağlanarak gen anlatımını tetikler (Şekil 2.15, Sullivan vd., 2008). Ayrıca HIF-1 α stabilizasyonu ve fonksiyonu hipoksi olmayan ortamda büyüme faktörleri, sitokinler veya onkogenik sinyallerle oksijen seviyesinden bağımsız olarak kontrol edilebilir. PI3K/Akt/mTOR ve Ras/MAPK sinyal yolları HIF-1 α sentezi veya inhibisyonunda görev almaktadır (Ma vd., 2022).



Şekil 2.15. Normoksi ve hipoksi ortamında HIF transkripsiyon faktörünün düzenlenmesi (Qannita vd., 2024).

HIF-1 α , bir transkripsiyon faktörü olarak kanser büyümesi ve gelişiminde görev alan genleri hedefler. Anjiyogeneizde görevli VEGF, glikolizde görevli glikolitik enzimler ve glukoz taşıyıcı GLUT, anti-apoptotik yolda görevli BCL-2, hücre bölünmesinde ve metastazda görevli Twist ve Snail, hücre dışı matriksi parçalayan metalloproteinazlar ve katepsin C proteazlar gibi birçok genin anlatımını düzenler (Qannita vd., 2024). Ayrıca immün sistem hücrelerinde hipoksi ortamında HIF-1 α aracılığıyla kemokin, interlökin ve immün kontrol reseptörlerinin sentezini etkiler. Tümör mikroçevresindeki CD8⁺ T hücreleri ve NK hücrelerinin sayısını azaltırken MDSC ve TAM hücrelerinin sayısını artırarak immünbaskılayıcı aktiviteyi destekler (Semenza, 2023).

Tümörün fiziksel mikroçevresinin bir diğer önemli özelliği asidik pH'ın olmasıdır. Enerji elde etmek için oksidatif fosforilasyon yapan normal hücrelerin aksine tümör hücreleri aerobik koşullarda kontrolsüz bir biçimde ve yüksek oranda anaerobik glikoz yolağını tercih ederek enerji ihtiyacını karşılar (Warburg vd., 1927). Bu yolağın aracılığıyla çok miktarda laktik asit üretilir ve hücre dışına atılır. Ayrıca pentoz-fosfat yolağıyla aşırı CO₂'nin karbonik anhidraz enzimi tarafından hidrasyonu H⁺ iyonu üretir ve bu durum TMÇ'nin asitliğini artırır. Normal hücreler ile karşılaştırıldığında tümör hücrelerinde yüksek hücre içi pH ve düşük hücre dışı pH vardır (Kato vd., 2013). Bu iyon gradiyent farklı Na⁺/H⁺ pompası, H⁺/K⁺ ATPaz, Na⁺/HCO₃⁻ taşıyıcısı gibi pek çok membran taşıyıcı sistemin işleviyle korunur. Asidik mikroçevre tümör hücresinin hayatta kalmasına, çoğalmasına, invazyonuna ve apoptozdan kaçmasına yardımcı olur. Proteolitik enzimlerin hücre dışına salınımıyla metastazı tetikler. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve IL-8 üretimi damarlaşmayı sağlar. Makrofajların M2 polarizasyonu, dentritik hücrelerin ve lenfositlerin sitotoksik aktivasyonunun inhibisyonu immün sistemden kaçışı kolaylaştırır (Worsley vd., 2022). Ayrıca asidik ortamda glutamin taşıyıcısı ACT2 ve glutaminaz-1'in anlatımı artarak glutamini glutamata dönüştürür ve bu sayede glikozun yetersiz kaldığı durumda tümör hücresi glutamin metabolizmasını aktif olarak kullanır (Corbet vd., 2014). Yağ asitleri, kolesterol gibi lipidlerin asidik TMÇ'de bol bulunduğu tespit edilmiştir. Yüksek miktardaki kolesterol CD8⁺ T hücrelerinde PD-1 anlatımını artırarak tümör hücresinin immün sistemden kaçmasını kolaylaştırır (Ma vd., 2019).

Yüksek interstisyel basınç (HIFP) tümör gelişiminin önemli bir belirteçidir. Normal sirkülasyonda kılcal damarların arteriyel segmentinden sıvılar sızar ve ekstraselüler matriksteki lenfatik damar veya venüller aracılığıyla kan dolaşımına geri döner ve böylece düşük seviyede (0-3 mm Hg) interstisyel basınç korunur. Fakat tümör

hücrelerinin sınırlı bir alanda hızlı çoğalması, hızla çoğalan tümör hücrelerinin besin ve oksijen ihtiyacını karşılamak yeni kan damarlarının oluşumu, bu kan damarlarının anormal yapısından dolayı tümör mikroçevresinde büyük miktarda sıvı birikir ve 10-40 mm Hg arasında interstisyel basınç oluşur (Purkayastha vd., 2021). Oksijen ve besin maddelerinin transferini sınırlayarak hipoksi ve asitliği şiddetlendirir. Ayrıca antitümör ilaçlarının tümör hücresine ulaşımını kısıtlayabilir (Bockelmann ve Schumacher, 2019).

2.4.2. Stromal mikroçevre

Hücre dışı matriks (ECM, extracellular matrix) proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler ve başka pek çok biyomolekülden oluşur. Ayrıca stroma ve tümör hücrelerinin salgıladığı sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ile pH, oksijen, basınç gibi fiziksel parametreler hücre dışı matriksin oluşumunu etkiler (Hynes, 2009). Hücre dışı matriksteki ana proteinlerden fibrin ve proteoglikan doku sertliği ve bazal membran oluşumunu sağlayarak stroma hücreleri ile tümör hücreleri arasında bariyer görevi görür. Tümör dokusunda hücre dışı matriks düzenleyen enzimlerin anlatımı artar, büyüme faktörleri salgılanır ve böylece hücre dışı matriks yeniden şekillenerek tümör gelişimi için uygun ortamı sağlar (Lu vd., 2011). Tümör hücre yüzeyinde anlatımı artan integrin hücre-ECM etkileşimiyle adhezyon ve migrasyona etki eder. Ayrıca yeni kan damarlarında sentezlenen integrin ile tümör anjiyogenezi meydana gelerek tümör proliferasyonu artar (Luo vd., 2007). Matriks metalloproteinazlar (MMP) ECM yeniden şekillenmesinde önemli rol oynar. Hücre dışı matriksteki proteinleri parçalayarak metastazı ve yeni kan damarlarının oluşumunu tetikler, pro-apoptotik faktörleri hidroliz ederek apoptoza direnç oluşturur (Li ve Wang, 2020).

Besin, oksijen ihtiyacı ve atıkların temizlenmesi bakımından tümörler kan ve lenf damarları ile çevrelenmiştir. Normal dokularda endotel büyüme faktörü A (VEGF-A), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), anjiyogenin ve diğer pro-anjiyojenik faktörler gibi çeşitli faktörler ve sinyal yolları tarafından anjiyogeneze oluşumu ve endostatin ve anjiyostatin gibi anjiyojenik inhibitörler ile anjiyogeneze inhibisyonu sıkı bir şekilde denetlenirken tümör dokusunda anjiyogeneze homeostazı dengesizdir (Ionescu vd., 2022). Ayrıca bu dengesizlik anormal fonksiyona yol açarak vaskülojenik taklit oluşur. Vaskülojenik taklit ile endotel hücrelerinden bağımsız besin kaynağı sağlanır ve tümör proliferasyonu, invazyon ve metastaz tetiklenir (Zheng vd., 2021). Hipoksi ortamda aktifleşen HIF transkripsiyon faktörleri VEGFA ve

diğer vasküler büyüme faktörlerinin anlatımını başlatarak anjiyogenezi destekler (Sullivan vd., 2008). TMC’de oluşan yeni kan damarları son haline ulaşmadan zayıf bir damar sistemi sunar. Tümör vasküler sistemin düzensiz yapısı anti-tümör ilaçlarının ve immün hücrelerinin tümör hücresine ulaşımını engeller ve böylece tümör hücresi immün sistemden kaçır ve hayatta kalır (Peix ve Casanovas, 2022).

Kanser hücreleri hayatta kalmak için çevresindeki endojen dokudaki stroma hücrelerini provoke edebilir. Stroma hücre çeşidi tümör tipine göre farklılık göstermesine rağmen temelde vasküler endotelial hücreler, fibroblastlar, adiposit ve stellat hücrelerinden oluşabilir. Fibroblastlar normal dokularda dinlenme halindedir. Yaralanma halinde geçici olarak miyofibroblastlara dönüşür ve yarayı kapatmak için normal hücrelerin proliferasyonu, hücre dışı matrisin yeniden yapılanmasına yardımcı olur. Fakat kanser hücresi tarafından salgılanan TGF- β , PGDF ve FGF2 gibi büyüme faktörleri de miyofibroblast farklılaşmasına neden olur. Bu farklılaşım kalıcıdır ve apoptoza karşı direnç gösteren böyle miyofibroblastlara kanserle ilişkili fibroblast (CAF, tumor-associated fibroblast) adı verilir. CAF hücrelerinde spesifik olarak α -düz kas aktini (α -SMA), fibroblast spesifik protein-1 (FSP1) ve fibroblast aktive edici protein (FAP) gibi biyolojik belirteçlerin anlatımı yapılır (Kalluri ve Zeisberg, 2006). CAF hücreleri tümör gelişimi ve metastazında kritik rol oynar. Kanser hücresi trombosit kaynaklı büyüme faktörü, IL-1 veya temel fibroblast büyüme faktörü salgılayarak CAF hücrelerinde hepatosit büyüme faktörünün (HGF) anlatımı yapılması için uyarır. HGF ise anti-apoptoz, anti-inflamasyon ve anjiyogeneze kritik rol oynar (Nakamura ve Mizuno, 2010). Ayrıca CAF hücreleri MMP, büyüme faktörleri ve sitokin salgılar, Notch ve p53 sinyal yolağındaki düzensizlikler proliferasyonu, anjiyogenezi, invazyonu ve enflamasyon yanıtını uyarır (Procopio vd., 2015). Normal fibroblastlara kıyasla CAF hücrelerinde anjiyogenezi teşvik eden ve oksidatif strese karşı toleransı arttıran adrenomedullin hormonunun yüksek miktarda salgılar (Benyahia vd., 2017). CAF hücrelerinde programlanmış hücre ölümü protein ligandı 1/2 (PD-L1/2) anlatımı fazladır ve T hücrelerinden kaçır (Pinchuk vd., 2008). Ayrıca CCL22 ve CCL28 kemokinleri ve IL-10 salgılayarak miyeloid kökenli immün baskılayıcı hücreler (MDSC) ve düzenleyici T hücrelerini (Treg) aktiveleştirerek, NK hücrenin fonksiyonunu inhibe ederek immün baskılaması oluşur (Takahashi vd., 2017). Pek çok çalışma CAF hücrelerinin ilaç direncine neden olduğunu göstermektedir. Hücre içine ilaç alımından sorumlu membran taşıyıcılarının anlatımının azaltılması kemoterapi ilaçlarının kanser hücresindeki dozunu azaltır (Cheng vd., 2020).

Endotel hücreleri kan damarlarında tek tabaka halinde bulunur ve çevresindeki dokulara besin, oksijen, immün hücrelerinin geçişini düzenler. Tümör mikroçevresindeki endotel hücreleri normalden farklı davranır. Tümörle ilişkili endotel hücrelerinde hücre-hücre bağlantısından sorumlu ICAM, VCAM, E-kaderin gibi proteinlerin anlatımı azalır ve hem doku bütünlüğü bozulur hem de T hücrelerinin ulaşması ve tutunması engellenir (Motz ve Coukos, 2011). Hücre ölümü ve immünolojik toleransın kontrolünden sorumlu FasL ve TRAIL ligandlarının tümörle ilişkili endotel hücrelerinde anlatımı artar. Bu ligandların reseptörlerine sahip TIL, Treg, T hücresinde apoptoz tetiklenir ve ölür. Bu sayede tümör hücresi immün sistemden kaçır (Rossin vd., 2019). Perisit hücreleri vasküler endotel hücrelerinin etrafını sarar ve hem fiziksel hem de parakrin sinyal yoluyla birbirleriyle etkileşim halindedir ve anjiyogenez sürecine katkı sağlar, EMT yeniden şekillenmesinde, beyindeki kan-beyin bariyerinin düzenlenmesinde görev alır (Bergers ve Song, 2005). Tümörle ilişkili perisit (TAP) hücreleri ile endotel hücreleri arasındaki anormal sinyalleşme tümör anjiyogenezini ve metastazı tetikler. Ayrıca TMÇ içindeki immünomodülasyonu etkiler. Normalde sadece MHC I sentezleyen perisit hücreleri IFN- γ ile indüklendiğinde MHC II sentezleyerek antijen sunan hücrelere dönüşür. Böylece yardımcı T hücrelerini çeker ve enflamasyon başlatır (Harrell vd., 2018).

Adiposit hücreleri enerji dengesini düzenleyen, fazla enerjiyi yağ asidi türevleri olarak depolayan özelleşmiş yağ hücrelerdir. Yapılan pek çok çalışma TMÇ’de adipositler ile kanser hücreleri arasında aktif bir metabolit iletimi olduğunu göstermiştir. Adiposit tarafından salgılanan yağ asitleri, pro-inflamatuar sitokinler (IL-1 β , IL-6 ve IL-10), matriks metallaproteinazlar, insülin tümör oluşumu ve gelişimine katkı sağlar (Mukherjee vd., 2022). Ayrıca kanserle ilişkili adipositler immün düzenleyici etkisi vardır. Miyeloid hücrelerini TMÇ’ye çeker ve salgıladığı CCL2 ile makrofajlarda M2 polarizasyonu yaparak kanser hücresinin immün sistemden kaçmasını destekler (Arendt vd., 2013). Serbest yağ asitlerinin hücreye alımında görevli taşıyıcı CD36 kanser hücrelerinde bol bulunur. Bu taşıyıcıyla hücre içine alınan yağ asitleri hücrede β -oksidasyonla enerjiye dönüştürülerek tümör gelişimini ve Wnt ve TGF- β sinyal yolağını aktifleştirerek epitel-mezenkimal geçişi (EMT) tetikler (Kazantzis ve Stahl, 2012).

2.4.3. İmmün mikroçevre

Bağıışıklık hücreleri TMÇ'nin en kritik bileşenidir. Çünkü aldığı sitokin, kemokin sinyalleriyle tümör gelişimini hem baskılayabilir hem de teşvik edebilir. Kronik enfeksiyona bağlı kalıcı inflamasyon çeşitli kanser tipinin gelişimine neden olduğu pek çok çalışma tarafından gösterildi. İmmün sistem tümör hücrelerini tümöre özgü antijenler aracılığıyla tanır ve ortadan kaldırır. Bu süreç tümör immün gözetimi olarak da adlandırılır. Tümör immün gözetiminin yok etme, dengeleme ve kaçıştan oluşan üç aşaması vardır. İlk olarak immün sistem hücreleri kanser hücrelerini spesifik antijenlerle tanır ve yok eder. Yok etme aşaması bütün tümör temizlendiğinde tamamlanır ama bir parça tümör kaldığında tamamlanmaz. Yok etme aşaması tamamlanmadığında immün sistem ile tümör gelişimi arasında bir geçici bir dengeleme durumu oluşur. Bu aşamada kanser hücreleri pasif hale geçebilir veya artan mutasyonlar sonucu proliferasyona devam edebilir. İmmün sistem mümkün olduğunca kanser hücrelerini yok etmek için çabalar. Fakat bütün tümörün yok edilememesi kanser hücrelerinin antitümör immün yanıtı baskılamasına, direnç kazanmasına ve kaçmasına neden olur. Kaçış aşamasında immün sistem tümör gelişimini kontrol altına alamaz ve durdurulamaz bir tümör ortaya çıkar (Swann ve Smyth, 2007).

İmmün sistem hücreleri genel olarak doğuştan gelen ve kazanılmış bağıışıklık hücreleri olarak iki sınıfa ayrılır ve iki sınıf da tümör immün gözetimine katılır. Doğuştan gelen bağıışıklık hücreleri miyeloid kökenlidir ve makrofajlar, dentritik hücreler (DC), nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve mast hücrelerinden oluşur. Konaktaki enfeksiyona ilk tepki veren hücrelerdir, patojenleri fagositoz ile ortadan kaldırır ve antijen sunumunda görev alırlar. Kazanılmış bağıışıklık hücreleri lenfosit kökenlidir ve T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücrelerden (NK) oluşur. Özgül hedefleri tanır ve immün hafıza oluştururlar. TMÇ'deki fonksiyonlarına göre ise NK, CD8⁺ T hücresi, CD4⁺ yardımcı T hücresi (Th), M1 makrofajı ve dentritik hücreleri anti-tümör immün yanıtta görev alırken miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) ve Foxp3⁺ düzenleyici T hücreleri (Treg) tümör immün sistemi baskılayıcı görevdedir. Bütün bu hücreler hem var olan aktif immün hücreleri kontrol etmek hem de baskılamak için kanser hücresi ve mikroçevresi tarafından bölgeye çekilir ve yayılırlar. İmmün hücrelerinden kaçınmak için tümör hücreleri pek çok mekanizma geliştirmiştir. Tümör antijenlerinin anlatımı azalır veya tamamen ortadan kalkar, immünbaskılayıcı hücre dışı vezikül ve IL-10, TGF- β gibi moleküler salınımı, ICAMI gibi hücre-hücre bağlayıcı moleküllerin kaybı, BCL-2 ve diğer anti-apoptoz

moleküllerinin anlatımının artması ile apoptoza direnç oluşturma, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1), Fas ve TRAIL aşırı anlatımı ile immün sistemden kaçabilir (Labani-Motlagh vd., 2020).

Makrofajlar kemik iliğinden üretilen monosit öncüllerinden türevlenen ve işlevine göre çok çeşitli fenotiplere sahip immün sistem elemanıdır. İltihaplanma, doku onarımı, Genel olarak iltihaplanmayı kontrol ederek diğer hücrelerin enfeksiyon bölgesine çekilmesi, doku onarımı, patojenlerin fagositozu, antijen sunumu görevlerinin yanı sıra dokuya özgü olarak karaciğerde Kupffer hücresi, akciğerde alveolar, beyinde mikrogliya gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlara tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) adı verilir ve pek çok tümör dokusunda bolca bulunur (Pan vd., 2020). Makrofajlar çevreden aldıkları sitokin veya kemokin uyarılara göre M1 tipi ve M2 tipi olarak iki farklı polarizasyon sergilerler. M1 makrofajları pro-inflamasyon ve anti-tümör özelliklidir ve bakteriyel ürünler, lipopolisakkarit, IFN- γ , IL-1 β , TNF ile aktifleşir. Patojenleri veya kanser hücrelerini tanır ve yok eder. Bunun için iki mekanizma geliştirmiştir. İlki ROS veya NO gibi sitotoksikler salgılayarak hedefi öldürmeye yöneliktir. Fakat bu süreç çok yavaştır. Diğer ölüm mekanizması ise antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksikite (ADCC) ile hücre ölümüdür. Kısa sürede ölüm gerçekleşse de bu mekanizma için özgül anti-tümör antikorlara ihtiyaç vardır. Ayrıca salgıladıkları pro-inflamasyon sitokinlerle diğer immün sistem hücrelerini bölgeye çeker. M2 makrofajları anti-inflamasyon ve pro-tümör özelliklidir ve IL-4, IL-10, IL-13 sitokinleriyle aktifleşir. Uyarının çeşidine göre M2a, M2b, M2c ve M2d olarak alt sınıflara ayrılır (Mantovani vd., 2004). Ayrıca M2 makrofajlarında glikoliz aktivasyonu, yağ asidi sentezi, trikarboksilik asit modifikasyonu ve azot döngüsü metabolizması gibi metabolik yeniden programlama meydana gelir. M2 makrofajları EGF, PDGF, HGF gibi büyüme faktörleri ve epitel büyüme ligandı salgılayarak tümör hayatta kalması ve proliferasyonunu destekler. VEGF, TNF- α , timidin fosforilaz ve prostaglandin E2 salgılayarak anjiyogenez, tümör göçü, invazyon ve metastazı tetikler. Çeşitli MMP enzimi ile ECM'nin yeniden şekillenmesinde rol oynar (Riabov vd., 2014). TMÇ'de makrofajlar sadece kanser hücresiyle değil aynı zamanda T hücreleri, NK, MDSC gibi başka hücrelerle de etkileşim halindedir. Özellikle hipoksi ortamında kanser hücresinin HIF-1 α anlatımıyla laktik asit üretimini artır ve ortamdaki laktik asit TAM hücrelerinin M2 polarizasyonunu tetikler (Colegio vd., 2014). Dahası ortamdaki laktik asidin varlığı arjinaz 1 enziminin makrofajlar tarafından salınmasına neden olur. Fakat arjinaz enzimi T hücre reseptörlerinden CD3- ζ zincirindeki L-arjinini parçalar ve böylece CD8⁺

sitotoksik T hücre aktivasyonunu engellenir (Degirmencay vd., 2024). M2 makrofajı tarafından salınan CCL22 kemokini TMÇ'ye Treg hücrelerini çekerek immünbaskısı oluşturur (Curiel vd., 2014). TAM membranlarında HLA-C, -E ve -G insan lökosit antijenleri bulunur ve böylece NK hücrelerini inhibe ederek IFN- γ anlatımını azaltır (Noy ve Pollard, 2014). TAM tarafından salınan TGF- β sitokini T hücresi, NK hücrelerini baskılar, DC göçünü azaltır ve CD4⁺ T hücrelerinin Treg hücrelerine farklılaşmasını tetikleyerek immün kaçışı destekler. Ayrıca hem PD-1 hem de PD-L1 anlatımını artırarak PD-1/PD-L1 kontrol noktasının inhibisyonuna sebep olur (Hao vd., 2012).

Dendritik hücreler (DC) TMÇ ve lenfoid organda az bulunmasına rağmen antijene özgü bağışıklık ile T hücrelerinin aktifleşmesinde önemli rol oynar. Olgunlaşmamış DC'ler sitokinler, hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP), patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP) gibi çevresel sinyaller ve hücre-hücre etkileşimiyle olgunlaşarak CD8⁺ T hücrelerine antijen sunan hücreler haline alır. Ayrıca olgun DC IL-12 sitokini salgılayarak NK hücrelerinin aktivasyonunu artırır. Normalde anti-tümör özellikteki DC'nin TMÇ içinde kanser hücresi ve kanserle ilişkili diğer hücreler tarafından gelen sinyallerle uyarımı düzgün gerçekleşmezse tümör immün kaçışı meydana gelir. Kanser hücreleri CC-kemokin ligand 4 (CCL4) salgılayarak DC'nin TMÇ'ye girmesini önler, koloni uyarıcı faktör 1 (CSF1) üreterek veya FMS benzeri tirozin kinaz 3 ligandının (FLT3L) yokluğu DC olgunlaşmasını inhibe eder, TMÇ'de yağ asitlerinin birikimi, besin ve oksijen azlığı DC'nin metabolizmasını değiştirir ve işlevselliği azalır (Wculek vd., 2020).

Bazofiller kemik iliğinde farklılaşır ve olgunlaşır, daha sonra kan dolaşımıyla vücuda dağılır. Alerjik hastalıklar, parazit enfeksiyonunda görevli olmasının yanı sıra otoimmünite ve T hücresi farklılaşmasında da görevlidir. IL-4, CCL3, CCL4 salgılayarak CD8⁺ T hücrelerini uyarır (Sektioğlu vd., 2017). MHC 1 ve CD86 membran proteinleri ile antijen sunumu yaparak immün sistemi harekete geçirir. Düzenleyici T hücrelerini IL-3 ve STAT5 aracılığıyla etkiler (Sharma vd., 2018). Ayrıca bazofiller tümör gelişimini VEGF-A ve proanjyogenik faktörler salgılayarak doğrudan etkileyebilir (Varricchi vd., 2018). Eosinofiller de bazofiller gibi kemik iliğinde olgunlaşıp dolaşıma katılır. Pek çok farklı sitokin, büyüme faktörleri ve reaktif oksijen türleri (ROT) salgılayarak T hücre çoğalması, DC olgunlaşması, diğer immün sistem hücrelerinin düzenlenmesinde rol alır (Lotfi ve Lotze, 2018). Ayrıca PD-L1 ve nitrik oksit sentaz ile T hücrelerini baskılayabilir. Böylece eosinofillerin hem anti-tümör hem de pro-tümör özelliği bulunur (Grisaru vd., 2022).

Nötrofiller TMÇ'de en çok bulunan immün hücrelerindendir. Anti-tümör özellikli N1 ve pro-tümör özellikli N2 nötrofilleri olarak kabaca iki alt sınıfa ayrılır. Tümör ve tümörle ilişkili stromal hücreleri tarafından salınan sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-17), kemokinler (CXCL1, CXCL2, CXCL6) veya büyüme faktörlerine (G-CSF, GM-CSF) göre nötrofiller olgunlaşır. IFN- γ ile olgunlaşarak antijen sunan hücrelere dönüşür ve T hücrelerini aktifleştirir. Tümörle ilişkili nötrofiller (TAN) reaktif oksijen türleri, nitrik oksit, arginaz 1 salgılayarak T hücre aktivasyonunu engeller, PD-L1, VISTA gibi immün kontrol noktası ligandları ile immün sistemden kaçır, salgıladıkları büyüme faktörleriyle tümör gelişimini destekler, metalloproteinazlar ile ECM'yi yeniden şekillendirir (Jaillon vd., 2020).

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) granülosit veya monositlerle benzer morfolojiye sahiptir. TMÇ'den gelen büyüme faktörleri, sitokinlere bağlı olarak olgunlaşarak immün baskılayıcı özellik kazanırlar. Bu aktivasyon sonucu ARG1 ve iNOS sentezleyerek NK ve T hücrelerini inhibe eder. Yüksek oranda 2,3-dioksijenaz (IDO) anlatımı yaparak T hücrelerinde apoptozun aktifleşmesine neden olur. Ayrıca reaktif oksijen ve nitrojen türevleri salgılayarak T hücre fonksiyonunu inhibe eder (Xiang vd., 2009).

Lenfositler spesifik antijenleri tanıyıp ayırt edebilen ve hafıza oluşturabilen adaptif immün sistemin parçasıdır. Kemik iliğindeki kök hücrelerden türevlenen lenfositler daha sonra ikincil periferik organlara geçerek burada farklılaşır ve olgunlaşırlar. Morfolojik olarak benzer olsalar da lenfositler çok çeşitlidir ve pek çok farklı gruplara ayrılır. T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri olarak ana gruba ayrılan lenfositler, daha sonra özgül antijen reseptörlerine göre çeşitli alt gruplara ayrılır. B ve T hücreleri aynı antijen reseptörüne sahip pek çok klon oluşturur ve farklı antijenlere sahip farklı klonları bulunur. T hücreleri, timusta sıkı bir seçim sürecinden geçirilerek olgunlaşır. En yaygın T hücreleri yardımcı CD4⁺ T hücreleri, sitotoksik CD8⁺ T hücreleri ve düzenleyici T hücreleridir. Bütün T hücrelerinde T hücresi reseptörü (TCR) ve ko-reseptör CD3 bulunur. Aktive edilmiş bir CD8⁺ dolaşıma girdiğinde ve antijenik hedefini bulduğunda iki farklı öldürme fonksiyonunu kullanır. İlk mekanizma Fas/Fas Ligandının (FasL) kullanımını içerir. Aktive edilmiş CD8⁺ T hücreleri, birçok hücre tipinde bulunan bir reseptör olan Fas'a (CD95) bağlanan FasL'yi ifade eder ve bu da kaspazların aktivasyonuna ve ardından hedef hücrenin apoptozuna yol açar. İkinci mekanizmada ise granzimlerin ve perforinin salınımıyla kaspazların aktivasyonunu içerir. Ayrıca CD8⁺ T hücreleri, makrofaj veya diğer bağışıklık hücreleri

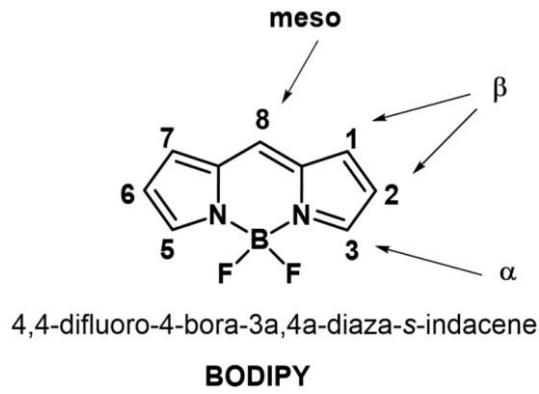
aktifleştiren IFN- γ salgılar. Tümör mikroçevresine ortamda bulunan kemotinler aracılığıyla CD8⁺ T hücreleri çekilir (Maimela vd., 2019). Kanser hücresindeki MHC-1 antijeninin CD8⁺ T hücre reseptörü tarafından tanınmasıyla apoptoz indüklenir ve kanser hücresinin ölümü gerçekleşir. Fakat kanser hücresindeki BCL-2 proteinin artması, MHC-1, PD-L1, CTLA-4 gibi antijen sunumunu inhibe ederek sitotoksik T hücrelerden kaçabilir (Labani-Motlagh vd., 2020). CD4⁺ T hücreleri veya diğer adıyla yardımcı T hücreleri, antijen sunan hücreler (APC) tarafından aktifleşir ve antijene bağlı olarak Th1, Th2, Th9 ve Treg gibi pek çok alt gruba ayrılır. Th1 hücreleri, sitotoksik T hücre aktivasyonuna yardımcı olmak için IL-2 ve IFN- γ salgılar. Th2 hücreleri, tümör mikroçevresine eozinofil alımını indükleyebilen ve antitümör yanıtında rol alabilen IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler salgılar (Borst vd., 2018). NK hücreleri de öncelikle perforin ve granzim içeren sitolitik granüllerin salınımı yoluyla apoptozu indükleyerek tümör hücrelerini öldürür. NK hücrelerinin düşük aktivitesi tümör gelişimini artırır. Bununla birlikte tümöre sızan NK hücreleri TMÇ'den etkilenerek fenotipi değişerek MDSC'ye dönüşebilir, IFN- γ salgılaması azalabilir ve sitotoksitesi inhibe olabilir (Park vd., 2013).

2.5. BODIPY Yapısı ve Özellikleri

BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) molekülü ilk olarak Kreuzer ve Treibs tarafından floresans boyası olarak sentezlenmiş ve raporlanmıştır (Treibs ve Kreuzer, 1968). Sentezi genellikle pirol ve benzaldehid kullanılarak başlar. Asit katalizör kullanılarak aromatik aldehit ile pirol arasında kondenzasyon gerçekleşir ve kararsız yapıda bulunan dipirrometan oluşur. Daha sonra oksidasyon ajanı kullanılarak dipirrometan, dipirrometen ara ürününe yükseltgenir. Son olarak bor kaynağı baz yardımıyla yapıya eklenerek BODIPY sentezi tamamlanır (Loudet ve Burgess, 2007). Yapısal olarak BODIPY ana konjuge gövdesi simetriktir ve iki flor atomu düzlemin iki farklı tarafında yer alır (Şekil 2.16). Ana gövdenin sekiz aktif bölgesi temel sentez sırasında veya sonraki sentez basamaklarıyla değiştirilebilir. 8-pozisyonu (*meso*) genellikle temel sentez aşamasında farklı aldehit veya açıl klorür kullanılmasıyla modifiye edilebilir ve ana gövdenin sentezinden sonra çapraz bağlanma, nükleofilik ilave reaksiyonlarıyla çeşitlenebilir. 2,6-pozisyonunda halojenasyon reaksiyonu yapılabilir. 3,5-pozisyonunda klik reaksiyonu, Knoevenagel yoğunlaşma reaksiyonu, çapraz-bağlama (cross-coupling) reaksiyonu yapıyı modifiye etmek için yapılan önemli yöntemlerdir ve BODIPY molekülünün fotofiziksel özelliklerini değiştirir. Örneğin Knoevenagel reaksiyonu BODIPY molekülünün düzlemsel yüzeyini, konjugasyon

derecesini arttırır ve hem absorbands hem de emisyon spektrasını kırmızı bölgeye kaydırır (Boens vd., 2015).

Günümüzde yapısal değişimlerle farklı türevleri sentezlenmiş olan BODIPY'leri floresan prob, hücre görüntülenmesi, elektroluminesan cihazlar, moleküler anahtarlar gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar. Böyle çok çeşitli alanlarda kullanılması esas olarak BODIPY'nin yüksek molar soğurma katsayısı, yüksek floresans kuantum verimi, dar soğurma bantları, uzun dalga boyu emisyonu gibi fotofiziksel özelliklerinden kaynaklanır. Ayrıca yapının kolay modifikasyonu fotofiziksel özelliklerinin kontrolünü kolaylaştırır (Li vd., 2022). Bu tez çalışmasında, farklı BODIPY türevleri G4 ligandı olarak çalışılmıştır.

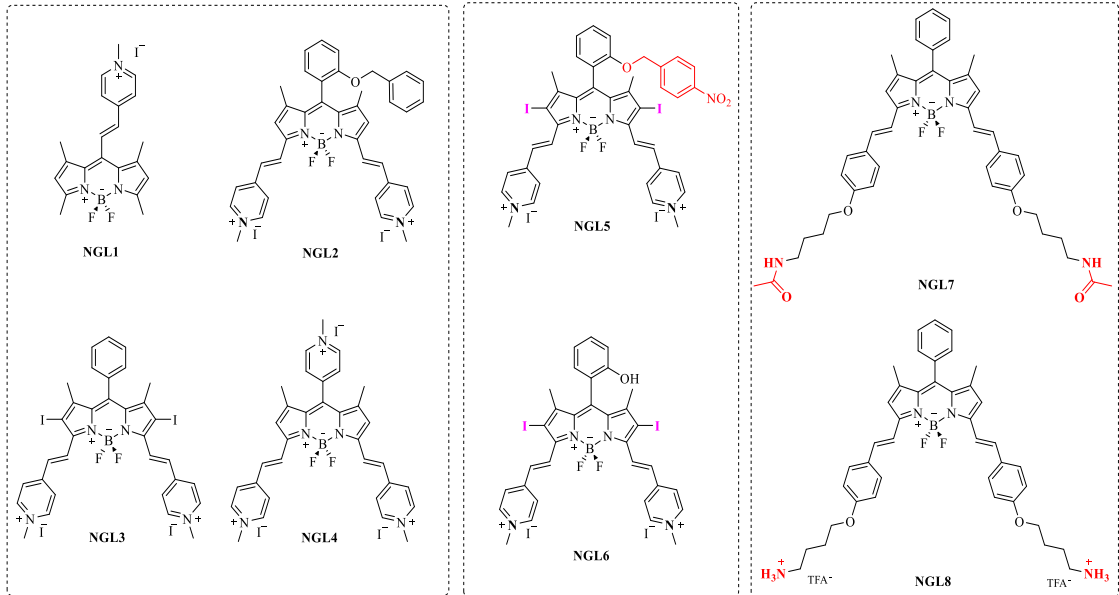


Şekil 2.16. BODIPY molekülünün kimyasal yapısı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. G4 Ligandlarının Tasarımı ve Sentezi

Bu tez kapsamında yeni BODIPY temelli G-kuadrupleks (G4) ligandları organik kimya yöntemiyle sentezlendi (Şekil 3.1). Sentezlenen moleküller silika kolon kromatografisi, ekstraksiyon, çöktürme, süzme, yıkama gibi çeşitli teknikler kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan moleküllerin ^1H ve ^{13}C Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrometrisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri (HRMS) analizleriyle karakterizasyonu yapıldı. Ayrıca sentezlenen her ligandın fotofiziksel karakterizasyonu yapılarak, UV-Vis absorbans ve emisyon spektrumları ölçüldü.



Şekil 3.1. Tez kapsamında sentezlenen G4 ligandları.

Tez çalışması kapsamında organik sentezi yapılan bütün moleküller BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) ana gövdeye sahiptir. BODIPY ana gövdesi Knoevenagel kondanzasyon yöntemi ile farklı substitüentler eklenerek modifiye edilmiş, konjugasyon artırılarak G4 yapısına bağlanmada etkili olduğu değerlendirilen π -yüzeyi genişletilmiştir (Şekil 3.1). Aktif ligandların pozitif yükleri piridin kuaternizasyonu ile (NGL1-6) veya ammonyum tuzu halinde (NGL-8) sağlanmıştır.

3.1.1. Farklı yük ve modifikasyonlara sahip g4 ligandlarının sentezi

3.1.1.1. 1 nolu molekülün sentezi

Trietil amin (2 mL) 150 mL diklorometan (DKM) içinde çözöldü. 15 dakika azot gazı geçirildi. 2,4-dimetil pirol (1,1 mL, 10.64 mmol) ve asetil klorür (357 µL, 4,54 mmol) eklendi. Balonun ağzı sıkıca kapatılıp 16 saat oda sıcaklığında karıştı. Trietil amin (Et₃N, 4 mL) ve boron triflorid dietil etenat (BF₃.OEt₂, 4 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak hekzan:DKM (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 1 nolu molekül katı halde ve %3,5 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,98 (s, 2H), 2,50 (s, 3H), 2,45 (s, 6H), 2,34 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 153,62, 141,41, 140,99, 132,07, 121,25, 17,33, 16,39, 14,43. HRMS: [M+H]⁺ için teorik m/z değeri: 263,15256; deneysel m/z değeri: 263,15084; Δ = 6,54 ppm.

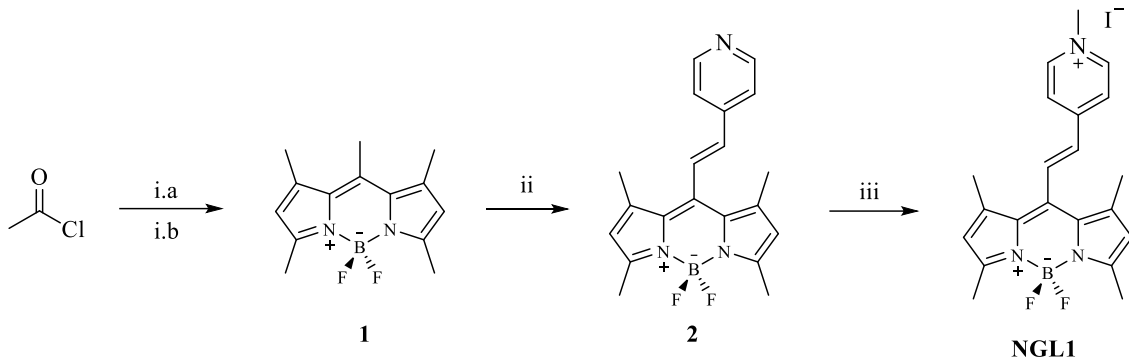
3.1.1.2. 2 nolu molekülün sentezi

1 nolu molekül (37,4 mg, 0,14 mmol), 4-piridin karboksaldehit (37 µL, 0,39 mmol), asetik asit (0,5 mL) ve piperidin (0,4 mL) 10 mL benzen içinde çözöldü. Dean-Stark aparatı ile 90°C’de reflaks edildi. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak hekzan:etilasetat (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 2 nolu molekül kırmızı katı halde ve %35,4 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 8,59 (d, J = 6,1 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 7,17 (d, 1H), 6,64 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 5,99 (s, 2H), 2,48 (s, 6H), 2,09 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,65, 150,70, 149,37, 142,85, 141,86, 138,32, 135,44, 130,91, 126,71, 123,03, 121,42, 121,38, 120,81, 30,94, 16,97, 14,65 (Şekil 4.42). HRMS: [M+H]⁺ için teorik m/z değeri: 352,17911; deneysel m/z değeri: 352,17803; Δ = 3,07 ppm.

3.1.1.3. NGL-1 molekülün sentezi

2 nolu molekül (17,8 mg) 2 mL dimetil formamid (DMF) içinde çözöldü. İyodometan (0,5 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 1 gün boyunca oda sıcaklığında karıştı. DMF döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Katı madde etilasetat ile yıkanarak saflaştırıldı. NGL-1 koyu kırmızı olarak ve %70 verimle elde edildi (Şekil 3.2). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,37 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 8,58 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 8,34 (dd, J =

16,4, 2,1 Hz, 1H), 7,30 (dd, $J = 16,4, 2,1$ Hz, 1H), 6,36 (s, 2H), 4,75 (s, 3H), 2,75 (s, 6H), 2,40 (s, 6H). HRMS: $[M]^+$ için teorik m/z değeri: 366,19476; deneysel m/z değeri: 366,19416; $\Delta = 1,64$ ppm.



Şekil 3.2. NGL-1 ligandının sentez basamakları. Tepkime koşulu: i.a) N_2 , 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; i.b) p-kloranil; i.c) Et_3N , BF_3OEt_2 ; ii) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, $90^\circ C$; iv) CH_3I , DMF.

3.1.1.4. 3 nolu molekülün sentezi

2-hidroksi benzaldehit (1,24 g, 10 mmol), benzil bromür (1,18 mL), potasyum karbonat (3,7 g) 12 mL dimetil formamid içinde çözüldü. Gece boyu oda sıcaklığında reaksiyon karıştırıldı. DMF uçuruldu ve diklorometan ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak hekzan:DKM (5:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle molekül saflaştırıldı. 3 nolu molekül şeffaf yağ halde ve %94 verimle elde edildi. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ 10,59 (s, 1H), 7,89 (dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz, 1H), 7,63 – 7,52 (m, 1H), 7,51 – 7,35 (m, 5H), 7,08 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 5,23 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 189,77, 161,08, 136,10, 135,91, 128,76, 128,49, 128,31, 127,31, 125,23, 121,04, 113,05, 70,50. HRMS: $[M+H]^+$ için teorik m/z değeri: 213,09100; deneysel m/z değeri: 213,09147; $\Delta = 2,21$ ppm.

3.1.1.5. 4 nolu molekülün sentezi

3 nolu Molekül (1,26 g, 6 mmol) 150 mL DKM içinde çözüldü. 15 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Daha sonra hızla 2,4-dimetil pirol (1,54 mL, 15 mmol) ve birkaç damla trifloroasetik asit (TFA) eklendi. Balonun ağzı sıkıca kapatılıp 16 saat oda sıcaklığında karıştı. p-kloranil (1,62 g, 6 mmol) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Daha sonra 7 mL trietilamin (Et_3N) ve 7 mL boron triflorid dietil eterat (BF_3OEt_2) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile

ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak hekzan:DKM (2:1, v:v) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle molekül saflaştırıldı. 4 nolu molekül katı halde ve %17 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29 (ddd, $J = 8,3, 7,4, 1,8$ Hz, 1H), 7,22 – 7,04 (m, 7H), 7,02 – 6,81 (m, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 2,50 (s, 6H), 1,33 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155,44, 154,97, 142,62, 138,96, 136,96, 131,62, 130,48, 129,67, 128,50, 127,81, 126,80, 124,53, 121,77, 120,88, 113,26, 70,06, 14,62, 13,92. HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ için teorik m/z değeri: 431,21008; deneysel m/z değeri: 431,20892; $\Delta = 2,69$ ppm.

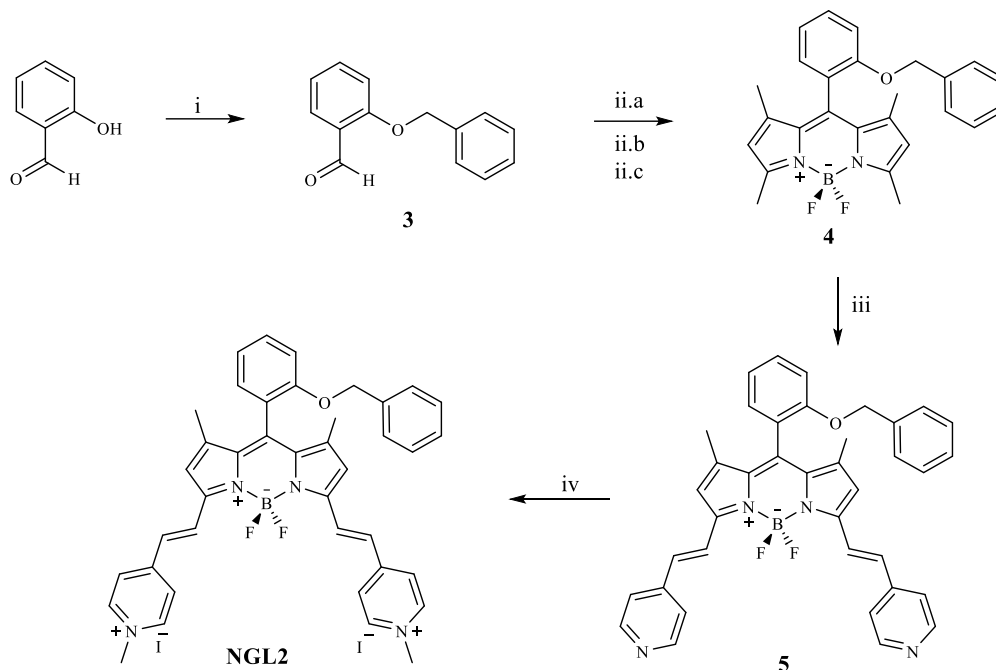
3.1.1.6. 5 nolu molekülün sentezi

4 nolu Molekül (200 mg, 0,464 mmol) 8 mL benzen içinde çözüldü. 4 eşdeğer 4-piridin karboksaldehit (175 μL , 1,855 mmol), asetik asit (0,4 mL) ve piperidin (0,4 mL) eklendi. Dean-Stark aparatı ile 90°C 'de reflaks edildi. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak etilasetat:metanol (95:5, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle molekül saflaştırıldı. 5 nolu molekül yeşil katı halde ve %13 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,58 (d, $J = 6,2$ Hz, 4H), 7,85 (d, $J = 16,3$ Hz, 2H), 7,41 (d, $J = 6,2$ Hz, 4H), 7,36 (ddd, $J = 8,3, 7,4, 1,8$ Hz, 1H), 7,18 – 6,92 (m, 10H), 6,61 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 1,43 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155,50, 150,29, 143,71, 142,84, 136,70, 134,36, 132,93, 130,98, 129,71, 129,05, 128,58, 127,95, 126,84, 124,00, 123,43, 121,93, 121,35, 121,08, 118,31, 113,31, 70,13, 14,24. HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ için teorik m/z değeri: 609,26317; deneysel m/z değeri: 609,25934; $\Delta = 6,29$ ppm.

3.1.1.7. NGL-2 molekülünün sentezi

5 nolu molekül (10 mg) 2 mL DMF içinde çözüldü. İyodometan (0,5 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştı. DMF uçuruldu. Katı etilasetat ile yıkanarak saflaştırıldı. NGL-2 molekülü koyu yeşil katı olarak ve %90 verimle elde edildi (Şekil 3.3). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,93 (d, $J = 6,7$ Hz, 4H), 8,22 (d, $J = 6,5$ Hz, 4H), 7,95 (d, $J = 16,2$ Hz, 2H), 7,86 (d, $J = 16,3$ Hz, 2H), 7,62 – 7,51 (m, 1H), 7,37 (dd, $J = 7,5, 1,8$ Hz, 2H), 7,30 – 7,14 (m, 7H), 5,23 (s, 2H), 4,33 (s, 6H), 1,50 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 155,23, 151,13, 150,86, 146,09, 144,04, 140,84, 137,37, 135,56, 132,05, 129,68, 128,80, 128,32, 127,78, 127,55, 124,74, 122,74, 122,55,

121,09, 114,30, 69,92, 55,41, 47,85, 34,88, 14,36. HRMS: $[M]^{+2}$ için teorik m/z değeri: 319,15088; deneysel m/z değeri: 319,15109; $\Delta = 0,66$ ppm.



Şekil 3.3. NGL-2 ligandının sentez basamakları. Tepkime koşulu: i) benzil bromür, K_2CO_3 , DMF; ii.a) N_2 , 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; ii.b) p-kloranil; ii.c) Et_3N , $BF_3.OEt_2$; iii) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, $90^\circ C$; iv) CH_3I , DMF.

3.1.1.8. 6 nolu molekülün sentezi

150 mL DKM çözücüsüne 15 dakika boyunca N_2 gazı uygulandı. 1 mL (10 mmol) benzaldehit ve 2 mL (20 mmol) 2,4-dimehtil pirol eklendi. Birkaç damla TFA yavaşça damlatıldı. Ağzı sıkıca kapatılıp üstüne N_2 gazı bulunan balon yerleştirildi. Gece boyu oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonraki gün 1,6 g p-kloranil eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında karıştı. 7 mL Et_3N ve 7 mL $BF_3.OEt_2$ eklendi, 3 saat oda sıcaklığında karıştı. TLC ile ürün oluşumu kontrol edildikten sonra DKM: dH_2O ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra uçuruldu. Mobil faz olarak DKM:Hekzan (2:1, V:V) kullanılarak silica kolon kromatografisi yapıldı. 6 nolu molekül kahverengi katı olarak %10 verimle elde edildi. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,41 (dd, $J = 5,1, 2,1$ Hz, 3H), 7,26 – 7,19 (m, 2H), 5,91 (s, 2H), 2,48 (s, 6H), 1,30 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 155,45, 143,17, 141,74, 135,02, 131,45, 129,13, 128,94, 127,96, 121,19, 14,59, 14,34. ESI-MS: teorik m/z değeri 325,16821 ($M+H$) $^+$; deneysel m/z değeri 325,16654 (Δ : 5,1 ppm).

3.1.1.9. 7 nolu molekülün sentezi

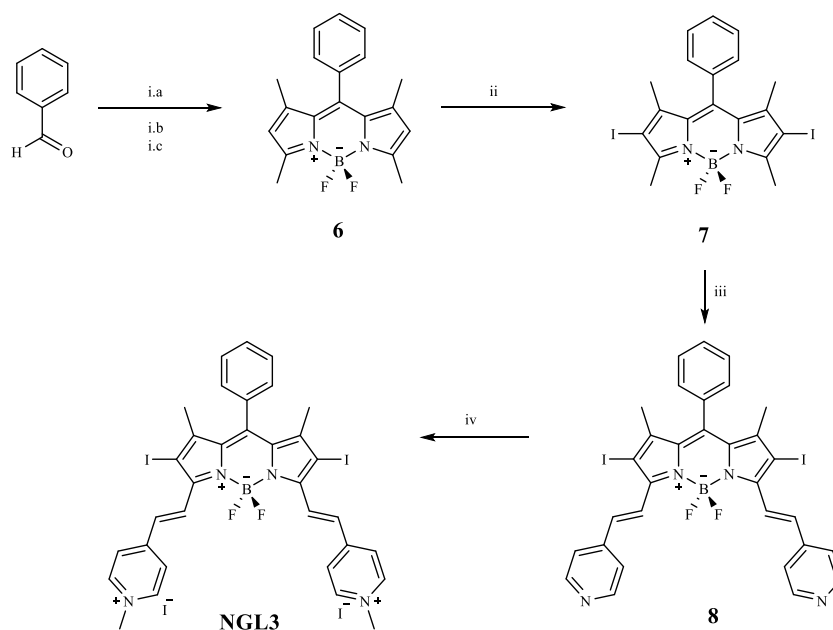
162 mg (0,5 mmol) 6 molekülü 50 mL etil alkol içinde çözüldü ve 60°C'de karıştırıldı. 1.5 eşdeğer (0,75 mmol) 190 mg iyot (I_2) eklendi. 1.5 eşdeğer (0,75 mmol) 132 mg iyodik asit (HIO_3) 2 mL suda çözüldükten sonra reaksiyon karışımına eklendi. 7 dakika aralıkla TLC ile ürün oluşumu takip edildi. 15. dakikada başlangıç tükendiği gözlemlendi ve reaksiyonu durdurmak için 2 g sodium thiosulfate 5 mL suda çözülüp eklendi. Etil alkol döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı ve DKM:dH₂O ile ekstraksiyon yapıldı. DKM:Hekzan (5:4, V:V) ile kolon kromatografisi yapıldı. Pembe katı halde 5 molekülü %80 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58 – 7,41 (m, 3H), 7,31 – 7,09 (m, 2H), 2,58 (s, 6H), 1,31 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156,79, 145,38, 141,39, 134,75, 131,30, 129,54, 129,47, 127,79, 85,66, 16,95, 16,05. HRMS: [M] için teorik m/z değeri: 575,95422; deneysel m/z değeri: 575,95579; Δ = 2,73 ppm.

3.1.1.10. 8 nolu molekülün sentezi

200 mg (0,35 mmol) 7 nolu molekül 5 mL benzen içinde çözüldü. 5 mol eşdeğer (1,75 mmol) 165 μ L 4-piridin karboksaldehit eklendi. 0,4 mL asetik asit ve 0,4 mL piperidin eklendi. 90°C'de Dean Stark aparatı ile reflaks edildi. Ürün oluşumu TLC ile takip edildi. DKM:dH₂O ile ekstraksiyon yapıldı ve organik faz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra uçuruldu. Mobil faz olarak MeOH:DKM (1:9, V:V) kullanarak kolon kromatografisi yapıldı. Mavi katı haldeki 8 nolu molekül %10 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,61 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 16,7 Hz, 0H), 7,83 – 7,70 (m, 0H), 7,51 (dd, J = 5,0, 1,9 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 6,2 Hz, 1H), 7,29 – 7,18 (m, 0H), 1,41 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.34, 149.97, 147.11, 143.69, 141.50, 136.69, 134.63, 133.55, 129.97, 129.73, 127.91, 122.76, 121.54, 17.58. HRMS: [M+H]⁺ için teorik m/z değeri: 755,01459; deneysel m/z değeri: 755,01791; Δ = 4,40 ppm.

3.1.1.11. NGL-3 molekülünün sentezi

6 nolu molekül (20 mg, 0,027 mmol) 2 mL DMF içinde çözüldü. 0,5 mL metil iyodür (CH_3I) eklendi. Oda ısısında gece boyu karıştırıldı. Sonraki gün 0,5 mL CH_3I eklenip yine gece boyu karıştırıldı. DMF'i uçurmak için hekzan ile yıkama yapıldı. Yeşil katı NGL-3 molekülü kantitatif verimle elde edildi (Şekil 3.4). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H), 8,35 (d, $J = 6,4$ Hz, 4H), 8,09 (d, $J = 16,7$ Hz, 2H), 7,90 (d, $J = 16,6$ Hz, 2H), 7,67 (dd, $J = 5,1, 1,9$ Hz, 3H), 7,53 (dd, $J = 6,5, 2,8$ Hz, 2H), 4,33 (s, 6H), 1,47 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162,78, 150,80, 149,88, 148,21, 146,24, 144,43, 134,75, 133,91, 133,84, 130,81, 130,30, 128,57, 128,20, 127,36, 125,04, 88,34, 47,92, 17,76. HRMS: $[\text{M}]^{+2}$ için teorik m/z değeri: 392,23765; deneysel m/z değeri: 392,02533; $\Delta > 100$ ppm.



Şekil 3.4. NGL-3 ligandının sentez basamakları. Tepkime koşulu: i.a) N_2 , 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; i.b) p-kloranil; i.c) Et_3N , BF_3OEt_2 ; ii) HIO_3 , I_2 , EtOH , 60°C ; iii) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, 90°C ; iv) CH_3I , DMF.

3.1.1.12. 9 nolu molekülün sentezi

150 mL diklorometan 15 dakika boyunca N₂ gazı geçirildi. 1,2 mL (12,7 mmol) piridin karboksaldehit ve 2,6 mL (26,2 mmol) 2,4-dimetilpirol eklendi. Birkaç damla TFA yavaşça damlatıldı. Ağzı sıkıca kapatılıp N₂ gazı altında oda sıcaklığında 16 saat karıştırıldı. Sonrasında 3,4 g (13,8 mmol) p-kloranil eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Trietil amin (7 mL) ve 7 mL boron triflorid dietil etenat eklendi, 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. İnce tabaka silika kromatografisi (TLC) ile ürün oluşumu kontrol edildikten sonra diklorometan ve su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Silika kolon kromatografisi ile DKM:MeOH (95:5, V:V) mobil faz kullanılarak saflaştırma işlemi yapıldı. 864 mg, turuncu katı 9 nolu molekül %21 verimle elde edildi. Karakterizasyon verisi literatür ile uyumlu bulunmuştur (Yurt v.d. 2019).

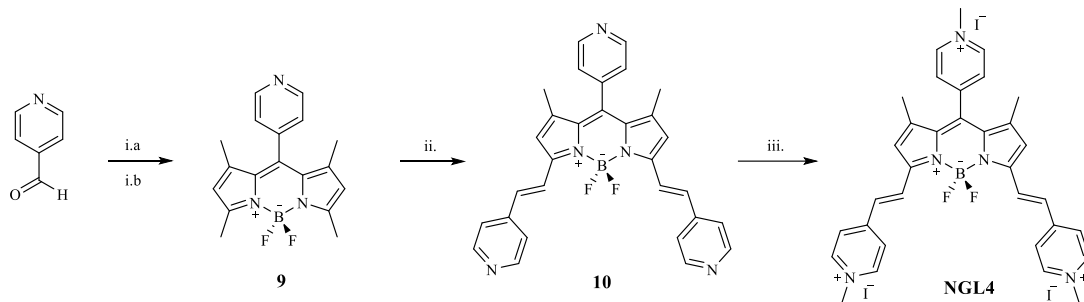
3.1.1.13. 10 nolu molekülün sentezi

9 nolu molekül (345 mg, 1 mmol), 4-piridin karboksaldehit (455 µL, 4 mmol), asetik asit (0,4 mL) ve piperidin (0,4 mL) 10 mL benzen içinde çözüldü. Dean-Stark aparatı ile 90°C'de reflaks edildi. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak etilasetat:metanol (97:3, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 10 nolu molekül mavi-yeşil katı halde ve %23,8 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,77 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 8,58 (d, J = 6,1 Hz, 4H), 7,81 (d, J = 16,3 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 6,3 Hz, 4H), 7,31 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 7,13 (d, J = 16,4 Hz, 2H), 6,65 (s, 2H), 1,44 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152,56, 150,75, 150,23, 143,54, 143,28, 142,67, 136,75, 134,06, 133,01, 123,46, 123,05, 121,49, 119,12, 14,98. HRMS: [M+H]⁺ için teorik m/z değeri: 504,21656; deneysel m/z değeri: 504,21582; Δ = 1,47 ppm.

3.1.1.14. NGL-4 molekülünün sentezi

10 nolu molekül (35 mg) 2 mL DMF içinde çözüldü. İyodometan (0,5 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştı. DMF uçuruldu. Katı örnek etilasetat ile yıkanarak saflaştırıldı. NGL-4 molekülü koyu yeşil katı olarak ve %70 verimle elde edildi (Şekil 3.5). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,27 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 8,95 (d, J = 6,8 Hz, 4H), 8,53 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 8,25 (d, J = 7,0 Hz, 4H), 7,95, 7,28 (s, 2H), 4,50 (s, 3H), 4,34 (s, 6H), 1,57 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152,60,

150,53, 149,82, 147,47, 146,20, 144,07, 136,03, 133,76, 133,39, 128,44, 127,24, 124,97, 121,95, 49,06, 47,94, 16,03. HRMS: $[M]^{+3}$ için teorik m/z değeri: 182,75935; deneysel m/z değeri: 182,75933; $\Delta = 0,11$ ppm.



Şekil 3.5. NGL-4 ligandının sentez basamakları. Tepkime koşulu: i.a) N_2 , 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; i.b) p-kloranil; i.c) Et_3N , BF_3OEt_2 ; ii) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, $90^\circ C$; iii) CH_3I , DMF.

3.1.2. Tümör mikroçevresinde aktifleşen ışığa duyarlı ligandın sentezi

3.1.2.1. 11 nolu molekülün sentezi

2-hidroksi benzaldehit (1,5 g, 12,3 mmol) ve 1,2 mol eşdeğer 4-nitrobenzil bromür (2,92 g, 13,5 mmol) 15 mL dimetilformamit içinde çözüldü. 2 mol eşdeğer potasyum karbonat (3,39 g, 24,6 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı 16 saat oda sıcaklığında karıştı. DMF uçuruldu ve reaksiyon karışımı diklorometan (DKM) ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Daha sonra mobil faz olarak DKM kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 11 nolu molekül beyaz katı olarak ve %87 verimle elde edildi. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ 10,58 (s, 1H), 8,29 (d, $J = 8,69$ Hz, 2H), 7,90 (d, $J = 7,69$ Hz, 1H), 7,66 (d, $J = 8,74$ Hz, 2H), 7,57 (t, $J = 7,85$ Hz, 1H), 7,12 (t, $J = 7,46$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 8,33$ Hz, 1H), 5,33 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz, δ ppm) 69,1, 112,7, 121,6, 124,0, 125,2, 127,5, 129,2, 136,0, 143,4, 147,7, 160,1, 189,2. HRMS (ESI): $[M+H]^+$ için teorik m/z değeri 258,0766 ve deneysel m/z değeri 258,0764, Δ : 0,77 ppm.

3.1.2.2. 12 nolu molekülün sentezi

Öncelikle 150 mL DKM çözeltisinden 20 dakika boyunca N₂ gazı geçirildi. Daha sonra hızla 11 nolu molekül (1,2 g, 4,7 mmol), 2,2 eşdeğer 2,4-dimetil pirol (1,05 mL, 10,3 mmol) ve birkaç damla trifloroasetik asit (TFA) eklendi. Balonun ağzı sıkıca kapatılıp 16 saat oda sıcaklığında karıştı. 1,1 eşdeğer p-kloranil (1,27 g, 5,17 mmol) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Daha sonra trietilamin (6 mL) ve boron triflorid dietil eterat (6 mL) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak DKM:hekzan (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 12 nolu molekül turuncu katı halde ve %22 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 8,10 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,42 (ddd, J = 8,3, 7,4, 1,8 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,26 (s, 1H), 7,21 (dd, J = 7,5, 1,8 Hz, 1H), 7,13 (td, J = 7,5, 1,0 Hz, 1H), 7,01 (dd, J = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 5,96 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 2,58 (s, 6H), 1,40 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz, δ ppm) 14,22, 14,87, 69,56, 113,63, 121,27, 122,80, 123,97, 124,99, 127,44, 130,14, 130,98, 131,69, 138,50, 142,62, 144,40, 147,74, 155,21, 155,57. ESI-MS: [M+H]⁺ için teorik m/z değeri 476,1952 ve deneysel m/z değeri 476,1937, Δ: 5,3 ppm.

3.1.2.3. 13 nolu molekülün sentezi

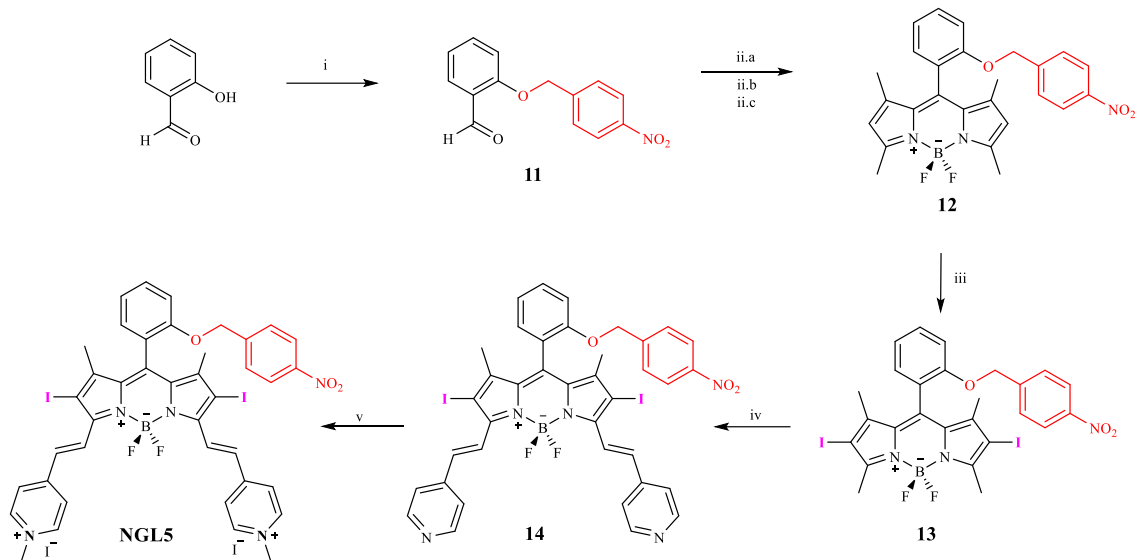
12 nolu molekül (435 g, 0,92 mmol) 100 mL etanol içince çözündü, 2,2 eşdeğer iyodin (2 mmol, 511 mg) ve iyodik asit (335 mg) eklendi. Reaksiyon karışımı 60°C'de 15 dakika karıştırıldı. Ürün oluşumu TLC ile belirlendikten sonra reaksiyon sodyum tiyosülfat ile sönmüldü. Etanol uçuruldu ve reaksiyon karışımı diklorometan (DKM) ve su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak DKM:hekzan (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 13 nolu molekülü kırmızı katı halde ve %45 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 8,10 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,53 – 7,42 (m, 1H), 7,30 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 2,67 (s, 6H), 1,39 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156,85, 155,23, 144,85, 143,99, 131,66, 131,48, 130,05, 129,74, 127,74, 127,46, 124,82, 124,09, 123,90, 123,27, 122,97, 114,25, 113,96, 69,93, 16,77, 16,65. HRMS (ESI): [M+H]⁺ için teorik m/z değeri 726,9812 ve deneysel m/z değeri 726,97751, Δ: 5,08 ppm.

3.1.2.4. 14 nolu molekülün sentezi

13 nolu molekül (300 mg, 0,41 mmol) 5 mL benzen içinde çözüldü. 4 eşdeğer 4-piridin karboksaldehit (154 μ L, 1,64 mmol), asetik asit (0,4 mL) ve piperidin (0,4 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 90°C'ye ısıtıldı ve Dean-Stark aparatı kullanılarak reflaks edildi. Yeşil-mavi ürün oluşumu TLC ile takip edildi. Reaksiyon soğutuldu ve karışımı diklorometan (DKM) ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak etilasetat:metanol (95:5, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 14 molekülü mavi-yeşil katı halde ve %27 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 8,62 (d, J = 6,1 Hz, 4H), 8,05 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 16,7 Hz, 2H), 7,77 (d, J = 16,7 Hz, 2H), 7,52 – 7,46 (m, 2H), 7,44 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,17 – 7,10 (m, 2H), 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,13 (s, 2H), 1,40 (s, 6H), ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 154,10, 149,44, 148,81, 146,66, 145,35, 142,57, 142,54, 135,81, 132,57, 130,78, 128,72, 126,46, 123,47, 122,85, 122,09, 121,62, 120,50, 113,03, 68,80, 16,03. HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ için teorik m/z değeri 906,0421 ve deneysel m/z değeri 906,04729, Δ : 5,73 ppm.

3.1.2.5. NGL-5 molekülünün sentezi

14 nolu molekül (40 mg, 0,44 mmol) 2 mL dimetilformamit içinde çözüldü. İyodometan (0,5 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştı. DMF uçuruldu. Katı örnek etilasetat ile yıkanarak saflaştırıldı. NGL-5 molekülü koyu yeşil katı olarak ve %90 verimle elde edildi (Şekil 3.6). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,97 (d, J = 6,4 Hz, 4H), 8,35 (d, J = 6,3 Hz, 4H), 8,12 – 8,03 (m, 4H), 7,91 (d, J = 16,6 Hz, 2H), 7,66 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,52 – 7,35 (m, 4H), 7,28 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 4,34 (s, 6H), 1,45 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 155,04, 150,85, 149,69, 147,74, 147,37, 146,25, 145,25, 141,63, 134,85, 133,80, 132,83, 129,67, 128,50, 125,03, 123,79, 123,46, 123,41, 88,12, 69,72, 34,87, 17,21. HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ için teorik m/z değeri 467,54005 ve deneysel m/z değeri 467,53804, Δ : 4,30 ppm.



Şekil 3.6. NGL-5 ligandının sentez basamakları. Tepkime koşulu: i) 4-nitrobenzil bromür, K₂CO₃, DMF; ii.a) N₂, 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; ii.b) p-kloranil; ii.c) Et₃N, BF₃OEt₂; iii) HIO₃, I₂, EtOH, 60°C; iv) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, 90°C; v) CH₃I, DMF.

3.1.2.6. 15 nolu molekülün sentezi

2-Hidroksibenzaldehit (2,44 g, 20 mmol), trietilamin (4,2 mL) ve asetil klorür (2,14 mL) 25 mL DKM içinde çözüldü. Reaksiyon karışımı gece boyu oda sıcaklığında karıştı. Reaksiyon karışımı DKM ve sodyum bikarbonat içeren su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak DKM kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 15 molekülü sarı yağ halde ve %78 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 10,09 (s, 1H), 7,87 (dt, J = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 7,62 (tdd, J = 7,4, 1,8, 0,9 Hz, 1H), 7,42-7,37 (m, 1H), 7,17 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 2,38 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 188,9, 169,4, 151,7, 135,5, 131,5, 128,2, 126,6, 123,72, 21,0 ppm. HRMS (ESI): [M+H]⁺ için teorik m/z değeri 165,0552 ve deneysel m/z değeri 165,05459, Δ: 3,7 ppm.

3.1.2.7. 16 nolu molekülün sentezi

Öncelikle 150 mL DKM çözeltisinden 20 dakika boyunca N₂ gazı geçirildi. Daha sonra hızla 15 molekülü (1 g, 6 mmol), 2,2 eşdeğer 2,4-dimetil pirol (2,4 mL, 22,5 mmol) ve birkaç damla trifloroasetik asit eklendi. Balonun ağzı sıkıca kapatılıp 16 saat oda sıcaklığında karıştı. 1,5 eşdeğer p-kloranil (2,2 g, 9 mmol) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Daha sonra trietilamin (8 mL) ve boron triflorid dietil eterat (8 mL) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı DKM

ve su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak DKM kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 16 nolu molekül turuncu katı halde ve %20 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 7,51 (td, $J = 7,8, 1,8$ Hz, 1H), 7,36 (td, $J = 7,5, 1,2$ Hz, 1H), 7,33 – 7,21 (m, 2H), 5,97 (s, 6H), 2,09 (s, 6H), 1,47 (s, 6H) ppm, ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169,0, 155,7, 148,0, 143,1, 136,3, 131,1, 130,3, 129,9, 127,7, 126,5, 123,8, 121,3, 20,8, 14,6, 13,9 ppm. HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ için teorik m/z değeri 383,1742 ve deneysel m/z değeri 383,17283, Δ : 3,58 ppm.

3.1.2.8. 17 nolu molekülün sentezi

16 nolu molekül (360 mg, 0,942 mmol), iyodin (478 mg, 1,8 mmol) ve iyodik asit (331 mg, 1,8 mmol) 100 mL etanol içinde çözündü. Reaksiyon karışımı 60°C 'de 15 dakika karıştırıldı. Ürün oluşumu TLC ile belirlendikten sonra reaksiyon sodyum tiyosülfat ile söndüldü. Etanol uçuruldu ve reaksiyon karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak etilasetat:hekzan (1:3, v:v) kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırıldı. 17 molekülü kırmızı katı halde ve %45 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,58 (q, $J = 6,8, 6,1$ Hz, 1H), 7,41 (q, $J = 6,6, 6,1$ Hz, 1H), 7,33-7,28 (m, 2H), 2,67 (s, 6H), 2,12 (s, 3H), 1,51 (s, 6H), HRMS: $[\text{M}]$ için teorik m/z değeri 633,95970; deneysel m/z değeri: 633,95975; $\Delta = 0,08$ ppm.

3.1.2.9. 18 nolu molekülünün sentezi

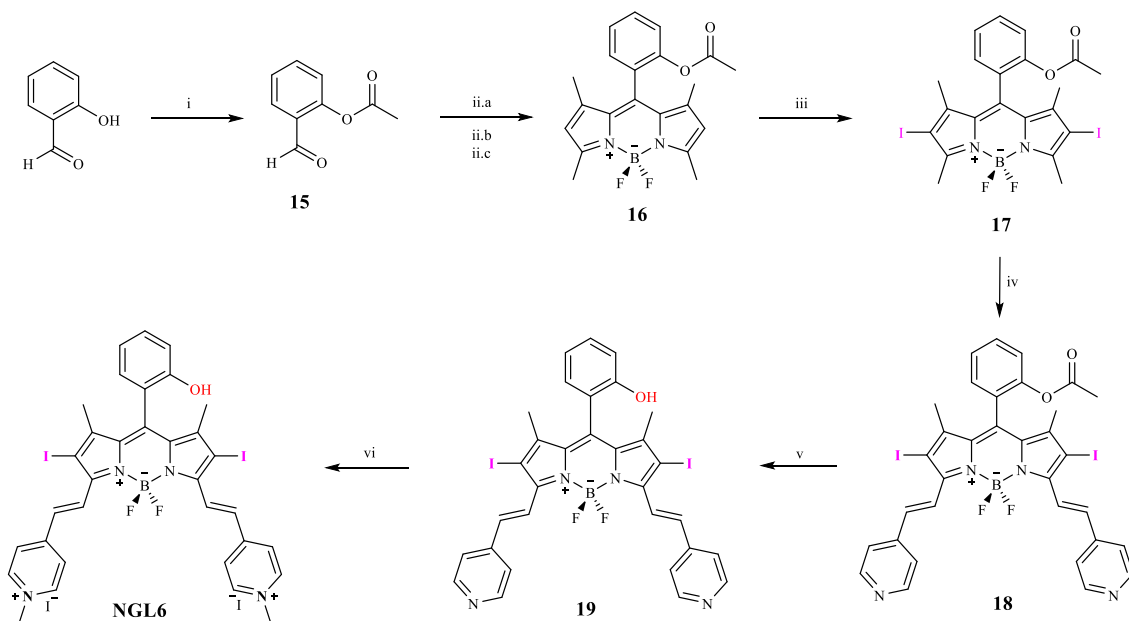
17 nolu molekül (65 mg, 0,11 mmol) 5 mL benzen içinde çözüldü. 4 eşdeğer 4-piridin karboksaldehit (40 μL , 0,44 mmol), asetik asit (0,4 mL) ve piperidin (0,4 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 90°C 'ye ısıtıldı ve Dean-Stark aparatı kullanılarak reflaks edildi. Yeşil-mavi ürün oluşumu TLC ile takip edildi. Reaksiyon soğutuldu ve karışımı DKM ve su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak etilasetat:metanol (95:5, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi yapıldı. Asetil biriminin kopması nedeniyle saf ürün elde edilemedi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,60 (d, $J = 5,2$ Hz, 4H), 8,07 (d, $J = 16,9$ Hz, 2H), 7,80 (d, $J = 16,6$ Hz, 2H), 7,49 (d, $J = 5,2$ Hz, 4H), 7,18 – 7,06 (m, 4H), diğer pikler çözücü altında kaldığı için okunamamıştır.

3.1.2.10. 19 nolu molekülün sentezi

18 nolu molekül (157 mg, 0,43 mmol), ve 2 mol eşdeğer potasyum hidroksit (48 mg, 0,9 mmol) tetrahidrofuran (THF): metanol (4:1, V:V) çözeltisinde çözüldü. Reaksiyon karışımı 16 saat oda sıcaklığında karıştı. Reaksiyon karışımı DKM ve sodyum bikarbonat içeren su ile ekstraksiyon edildi. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutuldu. Mobil faz olarak DKM kullanılarak silika kolon kromatografisiyle örnek saflaştırılmaya çalışıldı fakat bileşik bozunduğu için elde edilemedi.

3.1.2.11. NGL-6 nolu molekülün sentezi

19 nolu molekül (40 mg, 0,44 mmol) 2 mL dimetilformamit içinde çözüldü. İyodometan (0,5 mL) eklendi. Reaksiyon karışımı 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştı. DMF uçuruldu. Katı örnek etilasetat ile yıkanarak saflaştırıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. NGL-6 molekülünün sentez basamakları. Tepkime koşulu: i) trietilamin, asetil klorür, DKM; ii.a) N₂, 2,4-dimetil pirol, TFA, DKM; ii.b) p-kloranil; ii.c) Et₃N, BF₃OEt₂; iii) HIO₃, I₂, EtOH, 60°C; iv) 4-piridinkarboksaldehit, asetik asit, piperidin, 90°C; v) KOH, THF, MeOH; vi) CH₃I, DMF.

3.1.3. HDAC enzmini ile aktifleşen ligandın sentezi

3.1.3.1. 20 nolu molekülün sentezi

4-hidroksibenzen alkol (2,5 g, 20 mmol), 1,4-dibromobütan (2,4 mL, 20 mmol) ve potasyum karbonat (4,15 g, 30 mmol) 15 mL DMF içinde çözöldü. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında gece boyu karıştı. TLC ile ürün oluşumu gözlemlendikten sonra DKM:dH₂O ile ekstraksiyon edildi. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. Mobil faz olarak DKM:Hekzan (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 20 nolu molekül beyaz katı olarak %50 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,27 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 4,59 (s, 2H), 3,98 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,48 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,21 – 2,00 (m, 2H), 2,02 – 1,80 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158,24, 133,59, 128,53, 114,37, 66,87, 64,54, 33,54, 29,46, 27,88.

3.1.3.2. 21 nolu molekülün sentezi

20 nolu molekül (2 g, 7,72 mmol) ve 1,5 mol eşdeğer sodyum azid (0,76 g, 11,58 mmol) 10 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözöldü ve 60°C’de 3 saat karıştırdı. Eter ve su ile ekstraksiyon yapılarak saflaştırıldı. 21 nolu molekül sarı katı halde kantitatif olarak elde edildi. İleri saflaştırma yapılmadan sonraki sentez basamağına geçildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,27 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 4,58 (s, 2H), 3,98 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,35 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,97 – 1,71 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158,38, 133,43, 128,62, 114,47, 67,22, 64,77, 51,19, 40,76(dmso), 26,49, 25,74.

3.1.3.3. 22 nolu molekülün sentezi

21 nolu molekül (2 g, 9 mmol) ve trifenil fosfin (PPh₃, 3,54 g, 13,5 mmol) 15 mL THF içinde çözöndü. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika karıştıktan sonra 1 mL su eklendi ve 1 saat daha oda sıcaklığında karıştı. TLC ile ürün oluşumu gözlemlendi. THF rotary evaporatör ile uçuruldu. Mobil faz olarak DKM:Metanol (9:1, V:V) kullanarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 22 nolu molekül beyaz katı olarak %80 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,25 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 4,53 (s, 2H), 3,96 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,74 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,65 – 1,50 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158,61, 133,23, 128,61, 114,53,

67,80, 64,93, 41,91, 30,28, 26,67. QTOF-LC/MS: Teorik m/z değeri $(M+H)^+ = 196,1332$, deneysel $(M+H)^+ = 196,1353$, $\Delta = 10,7$.

3.1.3.4. 23 nolu molekülün sentezi

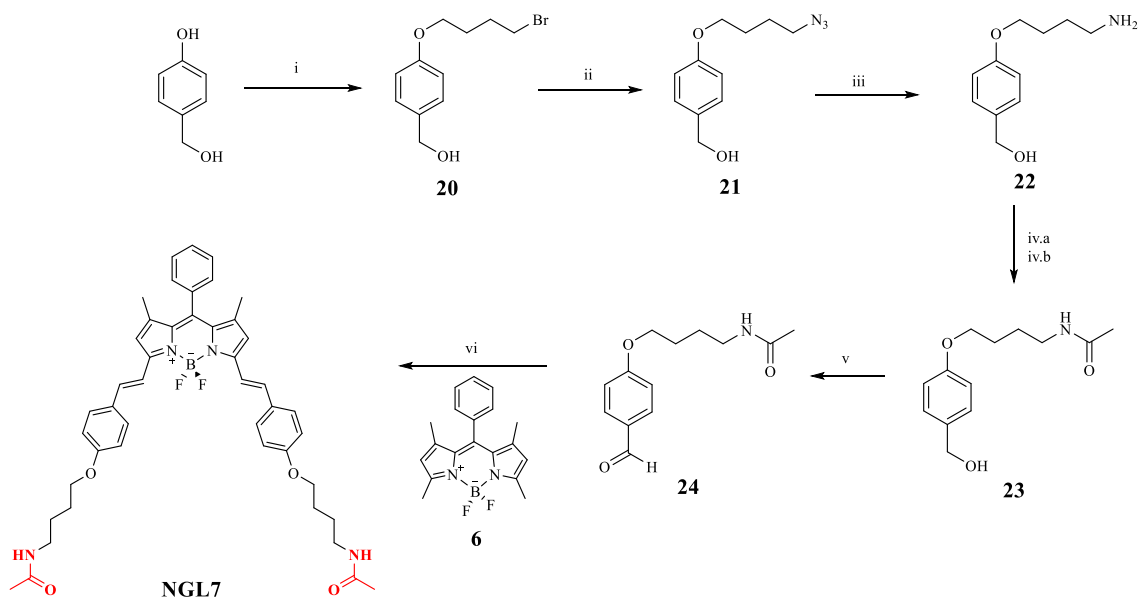
22 molekülü (150 mg, 0,77 mmol) 50 mL DKM içinde çözündü. 1,5 mol eşdeğer trietil amin (Et_3N , 108 μL) ve 1,5 eşdeğer asetil klorür ($AcCl$, 55 μL) damla damla eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında gece boyu karıştı. Sodyum bikarbonat içeren su ve DKM ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. NMR sonucuna göre hem amin hem de hidroksi fonksiyonel grubuna asetil bağlandığı gözlemlendi. Daha sonra elde edilen bütün madde (186 mg, 0,66 mmol) 1 ml THF:MeOH (4:1, v:v) içinde çözöldü ve 1,5 mol eşdeğer potasyum hidroksit (75 mg) eklenerek oda sıcaklığında 4 saat karıştırıldı. TLC ile ürün oluşumu gözlemlendikten sonra sodyum bikarbonat içeren su ve DKM ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. 23 nolu molekül beyaz-sarı katı olarak %55 verimle elde edildi. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 5,72 (b, 1H), 4,61 (s, 2H), 3,97 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 3,31 (td, $J = 7,0, 5,7$ Hz, 2H), 1,96 (s, 3H), 1,89 – 1,75 (m, 2H), 1,75 – 1,57 (m, 2H).

3.1.3.5. 24 nolu molekülün sentezi

23 nolu molekül (70 mg, 0,3 mmol) ve 1,2 mol eşdeğer piridinyum klorokromat (PCC, 78 mg, 0,36 mmol) 10 mL DKM içinde çözöndü. Oda sıcaklığında 3 saat karıştı. Sodyum bikarbonat içeren su ve DKM ile ekstraksiyon yapıldı. Mobil faz olarak DKM:Metanol (9,7:0,3, V:V) kullanarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 24 nolu molekül beyaz katı olarak %80 verimle elde edildi. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,88 (s, 1H), 7,82 (s, 2H), 6,98 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 5,58 (b, 1H), 4,07 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,34 (td, $J = 7,1, 5,9$ Hz, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,92 – 1,80 (m, 2H), 1,78 – 1,68 (m, 2H), ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190,82, 170,14, 163,96, 132,03, 129,95, 114,73, 67,76, 39,17, 30,94, 26,38, 23,37.

3.1.3.6. NGL-7 molekülünün sentezi

4 nolu molekül (40 mg, 0,12 mmol) ve 2 mol eşdeğer 24 nolu molekülü (57 mg, 0,24 mmol) 5 mL benzen içinde çözündü. Piperidin (400 μ L) ve asetik asit (200 μ L) eklendi ve 90°C’de ısıtılarak Dean-Stark aparatı ile reflaks edildi. Reaksiyonun rengi turuncudan mora döndüğünde ürün oluşumu TLC ile kontrol edildi. DKM:dH₂O ile ekstraksiyon edildi. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. Mobil faz olarak DKM:MeOH (95:5, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. NGL-7 molekülü mavi katı olarak %7 verimle elde edildi (Şekil 3.8). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,61 (d, J = 16,3 Hz, 2H), 7,57 (d, J = 8,8 Hz, 4H), 7,49 (dd, J = 5,2, 1,9 Hz, 3H), 7,38 – 7,31 (m, 2H), 7,21 (d, J = 16,3 Hz, 2H), 6,90 (d, J = 8,8 Hz, 4H), 6,62 (d, J = 1,1 Hz, 2H), 5,64 (s, 1H), 4,02 (t, J = 6,1 Hz, 4H), 3,33 (td, J = 7,0, 5,8 Hz, 4H), 1,98 (s, 6H), 1,91 – 1,79 (m, 2H), 1,79 – 1,64 (m, 2H), 1,43 (s, 6H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170,15, 159,69, 152,69, 141,85, 138,17, 135,73, 135,27, 133,19, 129,60, 129,07, 129,05, 128,91, 128,53, 117,52, 117,26, 114,78, 67,51, 39,31, 29,71, 26,63, 26,40, 23,38, 14,61. QTOF-LC/MS: Teorik m/z değeri (M-F)⁺ = 739,38254, deneysel (M-F)⁺ = 739,3821, Δ = 0,59; Teorik (M+H)⁺ = 759,38877, deneysel (M+H)⁺ = 739,3878; Teorik (M+Na)⁺ = 781,37071, deneysel (M+Na)⁺ = 739,3698.



Şekil 3.8. NGL-7 molekülünün sentez basamakları. Tepkime koşulu i) 1,4-dibromobütan, K₂CO₃, DMF; ii) NaN₃, DMSO, 60°C; iii) PPh₃, THF, H₂O; iv) Et₃N, AcCl, DKM; v) PCC, DKM; vi) 4, piperidin, asetik asit, 90°C.

3.1.3.7. 25 nolu molekülün sentezi

22 nolu molekül (3 g, 15,3 mmol) 20 mL THF içinde çözündü. Sodyum bikarbonat (2 g) 1 mL su içinde çözündükten sonra karışıma eklendi. Ditert butil dikarbonat (Boc_2O , 3,7 g, 16,87 mmol) karışıma eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında gece boyu karıştı. TLC ile ürün oluşumu gözlemlendikten sonra DKM:dH₂O ile ekstraksiyon edildi. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. Mobil faz olarak Etil asetat:Hekzan (1:2, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 25 nolu molekül beyaz katı olarak %80 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 6,87 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,66 (b, 1H), 4,61 (s, 2H), 3,97 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,19 (q, J = 6,7 Hz, 2H), 2,19 – 1,76 (m, 2H), 1,72 – 1,56 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158,49, 156,03, 133,15, 128,63, 114,48, 79,17, 67,50, 64,97, 40,26, 28,41, 26,79, 26,54. QTOF-LC/MS: Teorik m/z değeri ($\text{M}+\text{Na}^+$)⁺ 318,16758, deneysel değeri 318,16699, Δ = 1,9.

3.1.3.8. 26 nolu molekülün sentezi

25 nolu molekül (0,5 g, 1,7 mmol) ve piridinyum klorokromat (0,365 g, 1,7 mmol) 50 mL DKM içinde çözündü. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 1 saat karıştı. TLC ile ürün oluşumu gözlemlendikten sonra DKM:dH₂O ile ekstraksiyon edildi. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. Mobil faz olarak DKM:Hekzan (2:1, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 26 nolu molekül beyaz sıvı olarak %80 verimle elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,88 (s, 1H), 7,83 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,99 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,68 (b, 1H), 4,07 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,21 (q, J = 6,7 Hz, 2H), 1,95 – 1,77 (m, 2H), 1,78 – 1,64 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 190,87, 164,01, 156,04, 132,02, 129,85, 114,73, 79,23, 67,87, 40,17, 28,42, 26,77, 26,35.

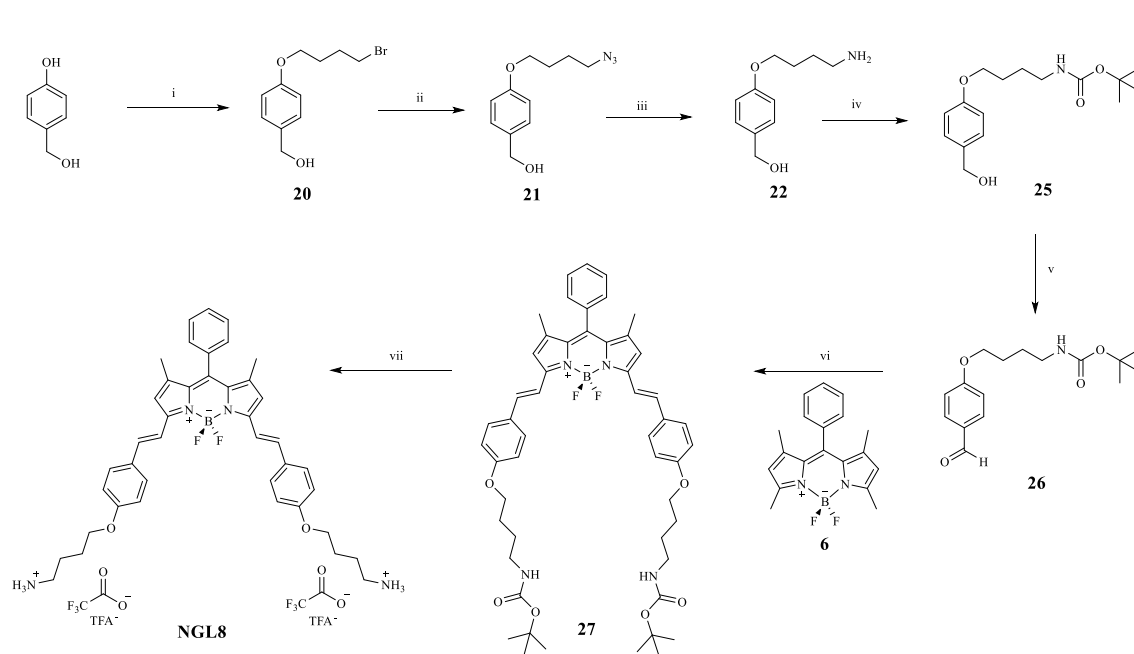
3.1.3.9. 27 nolu molekülün sentezi

26 nolu molekül (0,35 g, 1,2 mmol) ve 4 nolu molekül (0,2 g, 0,6 mmol) 5 mL benzen içinde çözündü. Piperidin (0,4 mL) ve asetik asit (0,4 mL) eklendi ve 90°C'de ısıtılarak Dean-Stark aparatı ile reflaks edildi. Reaksiyonun rengi turuncudan mora döndüğünde ürün oluşumu TLC ile kontrol edildi. DKM:dH₂O ile ekstraksiyon edildi. Organik faz sodyum sülfat ile kurulduktan sonra vakum altında uçuruldu. Mobil faz olarak etilasetat:hekzan (1:3, V:V) kullanılarak silika kolon kromatografisi ile

saflaştırıldı. 27 nolu molekül mavi katı olarak %80 verimle elde edildi. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,61 (d, $J = 16,6$ Hz, 2H), 7,57 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 7,49 (m, 3H), 7,36 – 7,30 (m, 2H), 7,21 (d, $J = 16,3$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 6,61 (s, 2H), 4,63 (b, 1H), 4,02 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,22 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,84 (dq, $J = 8,8, 6,4$ Hz, 2H), 1,69 (dq, $J = 9,9, 7,1$ Hz, 2H), 1,46 (s, 18H), 1,43 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159,73, 156,01, 152,68, 141,76, 138,06, 135,75, 135,29, 133,15, 129,50, 129,05, 129,02, 128,87, 128,53, 117,48, 117,17, 114,74, 79,18, 67,57, 40,29, 31,60, 28,44, 26,83, 22,66, 14,61.

3.1.3.10. NGL-8 molekülünün sentezi

27 nolu molekül (44 mg, 0,05 mmol) ve 0,5 mL trifloroasetik asit 5 mL DKM içinde çözündü. Oda sıcaklığında 4 saat karıştı. TLC ile ürün oluşumu kontrol edildikten sonra 2 mL toluen eklendi ve vakum altında uçuruldu. Bu işlem 2 kere tekrarlandı. NGL-8 molekülü mavi katı olarak %89 verimle elde edildi (Şekil 3.9). QTOF-LC/MS: Teorik m/z değeri $(\text{M}-\text{F})^+ = 655,3614$, deneysel $(\text{M}-\text{F})^+ = 655,3515$, $\Delta = 15,1$; Teorik $(\text{M}+\text{H})^+ = 675,3676$, deneysel $(\text{M}+\text{H})^+ = 675,3563$, $\Delta = 16,7$; Teorik $(\text{M}+\text{Na})^+ = 697,3501$, deneysel $(\text{M}+\text{Na})^+ = 697,3395$, $\Delta = 15,2$.



Şekil 3.9. NGL-8 molekülünün sentez basamakları. Tepkime koşulu: i) 1,4-dibromobütan, K_2CO_3 , DMF; ii) NaN_3 , DMSO, 60°C; iii) PPh_3 , THF, H_2O ; iv) NaHCO_3 , Boc_2O , THF; v) PCC, DKM; vi) 6, piperidin, asetik asit, 90°C; vii) TFA, DKM.

3.1.4. Açıl homoserin laktonların sentezi

3.1.4.1. AHL1 molekülünün sentezi

AHL1, AHL2 ve AHL3 bileşiklerinin sentezi Altveş v.d. 2025 makalemizde verilmiştir. α -Amino- γ -butyrolactone hydrobromide (200 mg, 1,1 mmol) 5 mL DKM ve 1 mL THF içinde çözündü. Trietilamin (139 μ L) ve n-hexanoyl chloride (71 μ L, 0,5 mmol) eklendi. Oda sıcaklığında gece boyu karıştı. DKM:H₂O ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı. İleri saflaştırma yapılmadı. Beyaz katı olarak AHL1 %31,6 verim ile elde edildi (Şekil 3.10). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,13 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 4,56 (ddd, J = 11,6, 8,6, 6,0 Hz, 1H), 4,47 (td, J = 9,1, 1,3 Hz, 1H), 4,29 (ddd, J = 11,3, 9,3, 5,9 Hz, 1H), 2,85 (dddd, J = 12,5, 8,6, 5,9, 1,3 Hz, 1H), 2,25 (td, J = 7,3, 0,9 Hz, 2H), 2,14 (dtd, J = 12,6, 11,4, 8,9 Hz, 1H), 1,79 – 1,52 (m, 2H), 1,32 (td, J = 4,9, 4,3, 1,9 Hz, 4H), 0,99 – 0,79 (m, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,65, 173,80, 66,12, 49,21, 36,15, 31,36, 30,57, 25,13, 22,37, 13,91.

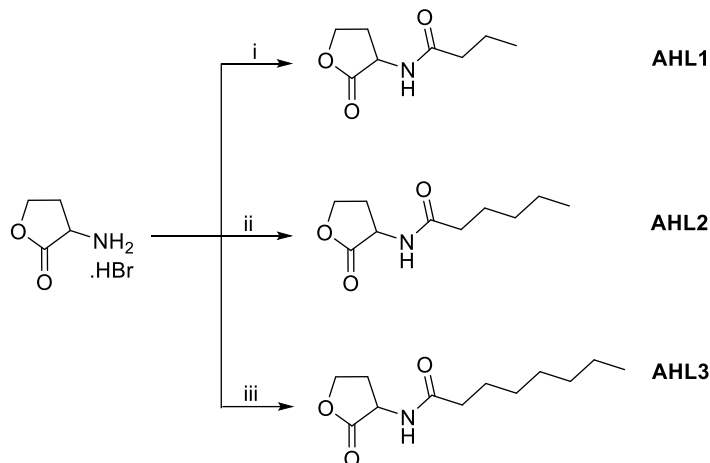
3.1.4.2. AHL2 molekülünün sentezi

α -Amino- γ -butyrolactone hydrobromide (200 mg, 1,1 mmol) 5 mL DKM ve 1 mL THF içinde çözündü. Trietil amin (139 μ L) ve n-Octanoyl chloride (86 μ L, 0,5 mmol) eklendi. Oda sıcaklığında gece boyu karıştı. DKM:H₂O ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı. İleri saflaştırma yapılmadı. Beyaz katı olarak AHL2 %27,7 verim ile elde edildi (Şekil 3.10). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,10 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 4,56 (ddd, J = 11,6, 8,6, 5,9 Hz, 1H), 4,47 (td, J = 9,0, 1,3 Hz, 1H), 4,29 (ddd, J = 11,3, 9,3, 5,9 Hz, 1H), 2,85 (dddd, J = 12,6, 8,6, 5,9, 1,3 Hz, 1H), 2,29 – 2,20 (m, 2H), 2,14 (dtd, J = 12,5, 11,4, 8,8 Hz, 1H), 1,85 – 1,54 (m, 2H), 1,42 – 1,13 (m, 8H), 0,98 – 0,80 (m, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,62, 173,80, 66,12, 49,23, 36,20, 31,65, 30,60, 29,17, 28,97, 25,44, 22,60, 14,06.

3.1.4.3. AHL3 molekülünün sentezi

α -Amino- γ -butyrolactone hydrobromide (200 mg, 1,1 mmol) 5 mL DKM ve 1 mL THF içinde çözündü. Trietil amin (139 μ L) ve n-Butyryl chloride (54 μ L, 0,5 mmol) eklendi. Oda sıcaklığında gece boyu karıştı. DKM:H₂O ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı. İleri saflaştırma yapılmadı. Beyaz katı olarak AHL3 %35 verim ile elde edildi (Şekil

3.10). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6,19 (s, 1H), 4,57 (ddd, $J = 11,6, 8,6, 6,0$ Hz, 1H), 4,47 (td, $J = 9,0, 1,3$ Hz, 1H), 4,29 (ddd, $J = 11,2, 9,3, 5,9$ Hz, 1H), 2,84 (dddd, $J = 12,5, 8,6, 5,9, 1,3$ Hz, 1H), 2,24 (td, $J = 7,3, 1,2$ Hz, 2H), 2,15 (dtd, $J = 12,5, 11,4, 8,8$ Hz, 1H), 1,69 (h, $J = 7,4$ Hz, 2H), 0,97 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 175,63, 173,64, 66,12, 49,20, 38,03, 30,53, 18,89, 13,68.



Şekil 3.10. AHL moleküllerinin sentez yolu. Tepkime koşulları: i) n-Butyryl chloride, Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$; ii) n-hexanoyl chloride, Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$; iii) n-octanoyl chloride, Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$.

3.2. G4 Ligandlarının Fotofiziksel Özellikleri

Tez kapsamında sentezlenen ligandların fotofiziksel özelliklerinin belirlenmesi için absorbans ve emisyon spektrumları ölçüldü. G4 ligandlarının Fosfat Salin Tamponu (PBS) içindeki çözünürlüğü farklı derişimlerde (5-50 μM) hazırlanan çözeltilerin absorbans spektrumları ölçülerek belirlendi. Maksimum absorbans değerlerinin derişime göre değişiminin lineeritesi moleküllerin çözünürlüğünün ölçütü olarak kabul edildi. Ligandların uygulama süresince stabilitelelerini belirlemek için ligandlar PBS içinde 25 μM derişimde hazırlandı ve 0, 2 ve 24 saat sonra absorbans ve emisyon değerleri ölçüldü. Emisyon ölçümü için HM3 ligandı 490 nm'den ve diğer tüm ligandlar 630 nm'den uyarıldı. Ayrıca molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ , molar extinction coefficient) Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplandı. Denklemden C değeri örneğin derişimini, l ölçüm alınan kuvartz küvetin ışık yolunu ve A ise maksimum absorbans değerini ifade etmektedir.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (3.1)$$

3.3. Ligandların G4 Yapısına Bağlanması Belirlenmesi

Sentezlenen ligandların G-kuadrupleks yapılarını stabilizasyonları Förster rezonans enerji transferi erime (FRET melting) yöntemi kullanılarak belirlendi. FRET metodu bir enerjiyle uyarılan donör ile bu enerjinin transfer edildiği akseptör arasındaki dipol-dipol rezonansıdır (Förster, 1948). Donör ile akseptör arasındaki uzaklık ne kadar yakınsa FRET o kadar yüksek verimle gerçekleşir. Fakat iki molekül arasındaki mesafe ortalama 10 nm'den fazlaysa FRET verimi azalır ve donör enerjisini akseptöre aktaramaz, donör emisyonu gözlemlenebilir. Bu yöntem sıcaklığın yavaşça artırılması ve donör emisyonunun takip edilmesiyle ligand-G4 yapısı arasındaki etkileşimin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Murat vd., 2011). G-kuadruplekse bağlanan ligandların yapıyı sağlamlaştırması ve yapının gevşemesi için daha yüksek sıcaklığın gerekli olması beklenmektedir. Bu amaçla G-kuadrupleks yapısı içeren ve içermeyen tek zincirli DNA parçasının donör olarak 5'-ucunda FAM (Carboxyfluorescein) ve akseptör olarak 3'-ucunda TAMRA (Tetramethylrhodamine) bağlı oligomerler kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Öncelikle 10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür içeren ve pH 7.2 olan tampon çözeltide 0.2 μ M derişimde oligomerler 95°C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra gece boyu oda sıcaklığında bırakılarak G4 yapısının oluşumu tetiklendi. Daha sonra farklı derişimde (1, 2, 5, 10 μ M) ligand eklendi. Hazırlanan örnekler qPCR cihazına (Bio-rad CFX96 Real Time System) yerleştirildi ve başlangıçta örnekler 25°C'de 5 dakika bekletildi, sonrasında 95°C'ye ulaşana kadar sıcaklık dakikada 1°C artırıldı. Donör (FAM) 492 nm'de uyarıldı ve 516 nm'deki emisyonu takip edildi. Üç tekrarlı yapılan deney sonuçlarının ortalaması alınıp 0 ile 1 değerleri arasında normalize edilerek grafik oluşturuldu. Normalizasyon değeri 0,5'e karşılık gelen sıcaklık (ΔT_m) kontrol ve deney grubu arasında karşılaştırıldı.

Çizelge 3.1. FRET deneyinde kullanılacak oligomerlerin özellikleri (Chen v.d., 2022).

Oligomer Adı	5' /3' modifikasyonu	5'-3' sekans	Uzunluk (baz)
h-TELO	FAM/TAMRA	AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G	22
c-MYC	FAM/TAMRA	TGG GGA GGG TGG GGA GGG TGG GGA AGG	27
c-KIT	FAM/TAMRA	AGG GAG GGC GCT GGG AGG AGG G	22
h-TERT	FAM/TAMRA	GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GGA GGG GTC GGG ACG GGG CGG GG	44
BCL2	FAM/TAMRA	AGG GGC GGG CGC GGG AGG AAG GGG GCG GGA GCG GGG CTG	39
ss-DNA	FAM/TAMRA	CAA AAA TTT TTG CAA AAA TTT TTG	24

3.4. Ligandların G-Kuadrupleks DNA'ya Bağlanma Katsayısının Belirlenmesi

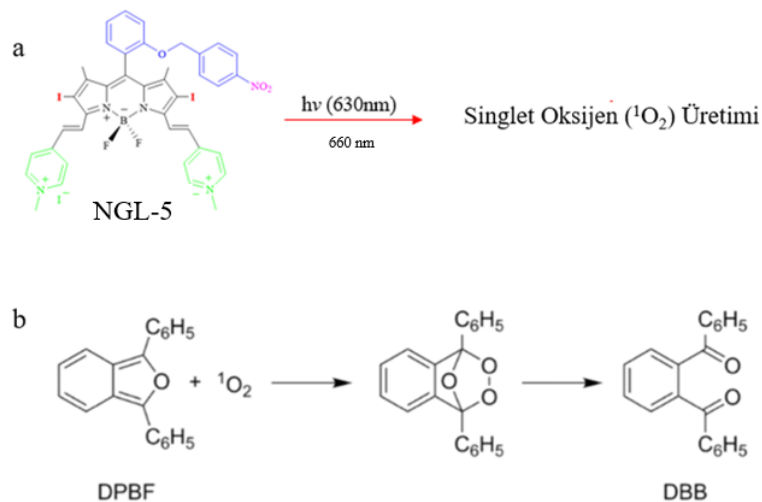
Son konsantrasyonu 0.5 μM olan ligand, FRET tamponu içinde (10 mM sodyum kakodilat, 0.1 M LiCl, pH 7,2) hazırlandı ve seri konsantrasyon artışı (0,05-1 μM) ile G4 yapısı içeren oligomerler ve G4 yapısı içermeyen ssDNA eklendi, absorbansı 300-800 nm arasında ölçüldü. NGL-4'ün c-MYC oligomerine bağlanma katsayısı Eşitlik (3.2)'de verilen Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak hesaplandı. Denklemde K_d değeri $1/K_a$ 'yı ifade etmekte olup Benesi-Hildebrand grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. ΔA absorbans değişimi, A_o ise başlangıç absorbans değerini ifade eder (Uyar v.d. 2023).

$$1/\Delta A = 1/(K_a \cdot \Delta A_o) [\text{DNA}] + 1/\Delta A_o \quad (3.2)$$

3.5. Singlet Oksijen Üretiminin Belirlenmesi

L1 ligandının ışık varlığında singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) üretmesi beklenmektedir. Bunu belirlemek için singlet oksijen varlığında oksitlenerek dibenzoilbenzene (DBB) dönüşen ve absorbansı değişen difenil izobenzofuran (DPBF) bileşiği kullanılarak bu bileşiğin absorbansı takip edildi (Şekil 3.11). İlk olarak DPBF (50 μM), DMSO çözeltisinde çözüldükten sonra belli aralıkta hem karanlıkta hem ışık varlığında ölçüm alınıp ligandsız ortamda ışığın DPBF üzerinde etkisinin olmadığı gösterildi. Daha sonra hem ligand hem DPBF içeren çözelti aynı şekilde hem karanlıkta hem ışık varlığında, sabit uzaklıkta absorbans ölçümü alındı. Işık kaynağı olarak 630 ve 660 nm LED lamba kullanıldı. (Bright LED Electronics Corp. sırasıyla BL-BJG344V-1-AA-AV ve BL-BD033R4V-1 modelleri). Singlet oksijen kuantum verimini hesaplamak için metilen mavisi referans olarak kullanılarak Eşitlik (3.3) ile hesaplandı. Denklemde Φ kuantum verimini, R referansı, S örneği, A absorbans değerini ve S ise zaman göre absorbans değişim grafiğinin eğimini temsil etmektedir.

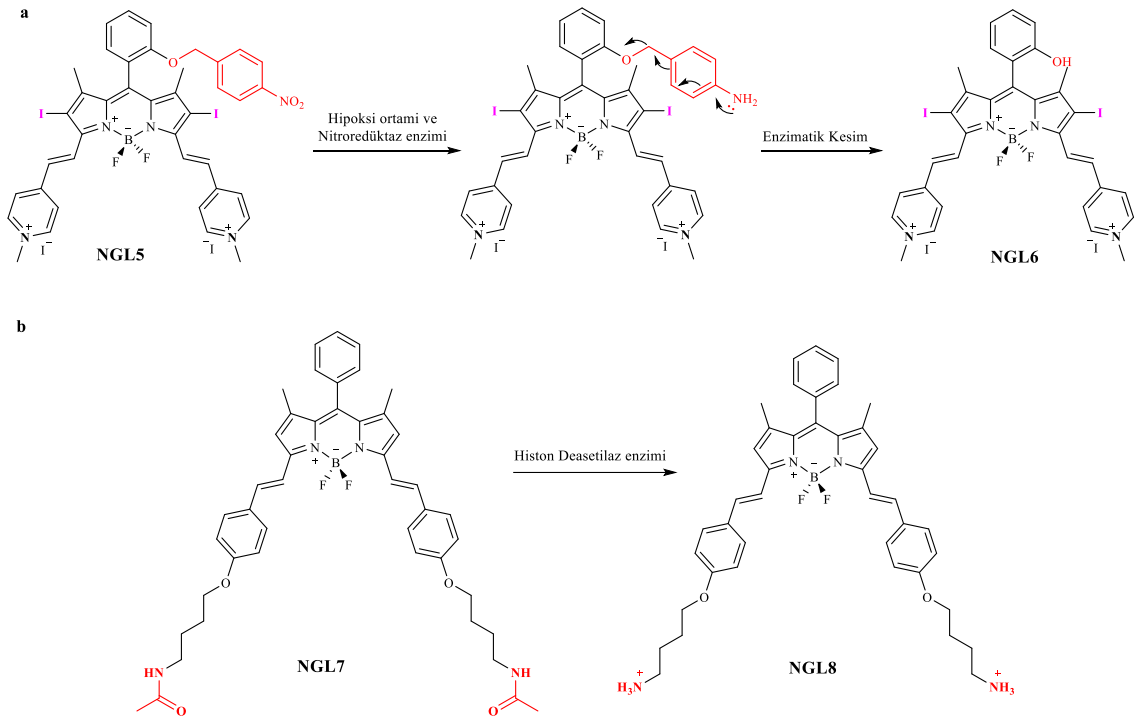
$$\Phi_S = \Phi_R (A_R/A_S) (S_S/S_R) \quad (3.3)$$



Şekil 3.11 a. NGL-5 ligandının ışık varlığında singlet oksijen üretimi b. DPBF molekülünün singlet oksijen varlığında DBB'ye oksidasyonu (Ercin v.d., 2021).

3.6. Aktifleşen Ligandlarının Enzimatik Kesimi

NGL-5 ligandındaki nitrobenzil biriminin indirgenerek aktif formun oluştuğunu göstermek için nitroredüktaz enzimi uygulandı (Şekil 3.12). Bunun için 1 mM NGL-5, nitroredüktaz enzimi (4 mg/mL) ve NADH (100 μ M) distile suda karıştırdıktan sonra 37°C'de 1 gün inkübe edildi. NGL-7 ligandı ise histon deasetilaz (200 nM) PBS içinde uygulandı ve 37°C'de 1 gün inkübe edildi. Örnekler asetonitril içinde çözüldü ve HPLC (Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC System) cihazında analizi yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril:su:asetik asit (80:20:0.1 V:V) ve C18 (Thermo Scientific™, Accucore™, CatNo:17126-102130) kolonu kullanıldı.



Şekil 3.12. Aktifleşebilen ligandların aktifleşme mekanizması. a) NGL-5 ligandı hipoksik ortamda nitroredüktaz enzimi ile indirgenerek NGL-6 ligandına dönüşür. b) NGL-7 ligandının asetil birimleri histon deasetilaz enzimi ile amonyum katyonuna sahip NGL-8 ligandına dönüşür.

3.7. Hipoksi Ortamının Oluşturulması

Hipoksi ortamı oluşturmak için hem oksijence fakir gaz karışımı hem de kobalt klorür (CoCl_2) kullanıldı. MCF7 (insan meme kanseri), A549 (insan akciğer kanseri), B16-F10 (fare melanoma), RAW 264.7 (fare makrofaj) hücre hatları kullanıldı. Hücreler ilk olarak %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) ve %0,1 genitamisın (Sartorius) içeren HG-DMEM (Sigma) besiyerinde 37°C , %5 CO_2 inkübatörde (Nüve EC 160) büyütüldü. Daha sonra hipoksi grubu hipoksi kabına (Billups-Rothenberg, Inc.) alındı ve özel gaz karışımı (0,5% O_2 , 5% CO_2 ve 94,5% N_2) 20 litre/dakika akış hızıyla 10 dakika uygulayarak hipoksi oluşturuldu. Hücreler 37°C 'de 1, 4, 6 ve 24 saat hipoksi ortamında inkübe edildi. Farklı derişimlerde (50, 100, 150, 200, 250 μM) CoCl_2 eklenerek hipoksi ortamı oluşturuldu ve hücreler 24 ve 48 saat 37°C 'de inkübe edildi. Hücreler RNA izolasyonu yapılmak için toplandı. cDNA sentezi yapıldı ve qPCR tekniği kullanılarak Hif1 α gen anlatımının analizi yapılarak uygun hipoksi ortamı daha sonraki deneyler için seçildi.

3.8. Ligandların Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması

MCF7 (insan meme kanseri), A549 (insan akciğer kanseri), B16-F10 (fare melanoma), RAW264.7 (fare makrofaj), Hep3B (insan karaciğer kanseri), HTC 116 (mikrosatelit kararsız insan kolon kanseri), SW480 (mikrosatelit kararlı insan kolon kanseri), HUVEC (insan normal göbek kordonu endoteli), L929 (fare normal fibroblastı) hücre hatları, DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde 37°C, %5 CO₂ inkübatörde (Nüve EC 160) inkübe edildi. Hücre sayısı Neubauer lamında (Isolab) Eşitlik (3.4)'e göre belirlendi.

$$\text{Hücre Sayısı} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10^4 \text{ hücre/mL} \quad (3.4)$$

Son konsantrasyonu 5x10⁴ hücre/mL (5x10³ hücre/kuyu) olacak şekilde 96 kuyulu plakaya 4 tekrarlı ekim yapıldı, 1 gün inkübe edildi.

A549 hücre hattı için hipoksi ortamı 200 µM kobalt klorür (CoCl₂) eklenerek oluşturuldu ve 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Ko-kültür için *P. aeruginosa* (PAO suşu), Nutrient Broth (Merck) besiyerinde ve 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. A549 hücreleri yıkandı ve genitamisin içermeyen besiyeri eklendi. *P. aeruginosa* stoğundan 1x10⁶ hücre olacak şekilde A549 hücreleri olan kuyulara eklendi ve aynı anda farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 µM) hazırlanan NGL-4 ligandı normoksi grubuna direkt, hipoksi grubuna ayrıca CoCl₂ ile eklendi ve 37°C'deki inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Besiyeri atıldı ve kuyular PBS ile yıkandı, %0,2 genitamisinli besiyeri eklendi, 20 saat inkübe edildi. Ayrıca B16-F10 ve RAW264.7 hücre hatları ve ko-kültürüne farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 µM) hazırlanan NGL-4 uygulandı, 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi.

MCF7 hücre hattı için hipoksi ortamı 100 µM CoCl₂ eklenerek oluşturuldu ve 37°C'deki inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Besiyerleri boşaltıldı ve farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 µM) hazırlanan NGL-5 ligandı normoksi grubuna doğrudan, hipoksi grubuna ayrıca 100 µM CoCl₂ ile beraber eklendi ve 37°C'deki inkübatörde 20 saat inkübe edildi. Işık grubu için 660 nm dalga boyundaki LED ışık kaynağı plakanın altından ve 10 cm mesafeden, 30 dakika uygulandı.

A549, MCF-7, Hep3B, HTC116, SW480, HUVEC, L929, B16-F10 ve RAW264.7 hücre hatları NGL-7 ligandı için kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 µM) hazırlanan NGL-7 ligandı eklendi ve 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi.

Besiyerleri boşaltıldı ve son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) taze besiyerinde hazırlanıp karanlıkta plaka kuyularına eklendi. 3 saat 37°C’de inkübe edildi. Besiyerleri boşaltılıp 200 µL DMSO eklendi ve 10 dk 37°C’de inkübe edildi. 570 nm’de absorbanları mikroparka okuyucusu (Thermo Scientific, Multiskan Skyhigh Microplate Reader) ile ölçüldü. Absorban değerlerinin ortalaması alındı, kontrol grubuna göre normalize edilerek canlılık yüzdesi excel programında hesaplandı ve grafik çizildi.

3.9. Ligandların Gen Anlatımına Etkisi

MCF7 (insan meme kanseri), A549 (insan akciğer kanseri), B16-F10 (fare melanoma), RAW264.7 (fare makrofaj), Hep 3B2.1-7 (insan karaciğer kanseri), HTC 116 (insan kolon kanseri), SW480 (insan kolon kanseri), Huvec (insan normal göbek kordonu endoteli), L929 (fare normal fibroblastı) hücre hatları, DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde 37°C, %5 CO₂ inkübatörde (Nüve EC 160) inkübe edildi. Hücre sayısı Neubauer lamında (Isolab) Denklem 4’e göre belirlendi. Son konsantrasyonu 3x10⁴ hücre/mL (5x10⁵ hücre/kuyu) olacak şekilde 6 kuyulu plakaya 3 tekrarlı ekim yapıldı, 1 gün inkübe edildi.

A549 hücre hattı için hipoksi ortamı 200 µM kobalt klorür (CoCl₂) eklenerek oluşturuldu ve 37°C’deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Ko-kültür için *P. aeruginosa*, Nutrient Broth (Merck) besiyerinde ve 37°C’deki inkübatörde büyütüldü. A549 hücreleri yıkandı ve genitamisin içermeyen besiyeri eklendi. *P. aeruginosa* stoğundan 1x10⁶ hücre olacak şekilde A549 hücreleri olan kuyulara eklendi ve aynı anda 5 µM NGL-4 ligandı normoksi grubuna direkt, hipoksi grubuna ayrıca CoCl₂ ile eklendi ve 37°C’deki inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Besiyeri atıldı ve kuyular PBS ile yıkandı, %0,2 genitamisinli besiyeri eklendi, 20 saat inkübe edildi.

B16-F10 ve RAW264.7 ko-kültürü için özel insört plaka kullanıldı. Plakanın alt tabanına B16-F10 hücresi, insört içine ise RAW 264.7 hücresi ekildi. Besiyerleri boşaltıldı ve 5 µM NGL-4 ligandı eklendi ve 37°C’deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi.

MCF7 hücre hattı için hipoksi ortamı 100 µM kobalt klorür eklenerek oluşturuldu ve 37°C’deki inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Besiyerleri boşaltıldı ve 5 µM NGL-5 ligandı normoksi grubuna doğrudan, hipoksi grubuna ayrıca 100 µM CoCl₂ ile beraber eklendi ve 37°C’deki inkübatörde 20 saat inkübe edildi. Işık grubu için 660 nm dalga boyundaki LED ışık kaynağı plakanın altından ve 10 cm mesafeden, 30 dakika uygulandı.

HTC116, SW480, HUVEC, hücre hatları NGL-7 ligandı için kullanıldı ve sadece normoksida çalışıldı. 5 ve 20 μ M NGL-7 ligandı eklendi ve 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi.

RNA izolasyonu için A.B.T.TM RNA Purification Kit kullanıldı ve üreticinin talimatları doğrultusunda izolasyon gerçekleştirildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin (%0,25 EDTA, Gibco) ile toplandı. 1 mL Buffer P eklendi, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 μ L kloroform eklendi, karıştırıldı, vortekslendi, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dk 12000 g +4°C'de santrifüj edildi. Şeffaf olan üst kısım dikkatlice yeni bir ependorfa alındı. (Alt pembe bölüm protein, orta beyaz bölüm DNA, üst şeffaf bölüm RNA). 1 mL Buffer RB eklendi, karıştırıldı. Lizat kolon ependorfa aktarıldı. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. Bütün lizat bitene kadar bu işlem tekrarlandı. 500 μ L Wash Buffer I eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. 500 μ L Wash Buffer II eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. Boş kolon 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. 50 μ L nükleazsız su eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Örnekler -80°C'de saklandı. cDNA sentezinden önce örneklerin nanadrop (Nabi) ile miktarları ve saflıkları ölçüldü.

cDNA sentezi için NucleoGene cDNA Sythesis Master Mix (5X) kullanıldı ve üreticinin talimatları doğrultusunda sentez gerçekleştirildi. 1000 ng total RNA ile çalışıldı. Hacimleri nükleazsız su ile 16 μ L'ye tamamlandı. 65°C'de 5 dk inkübe edildi. 4 μ L master miks eklenerek hacimleri 20 μ L'ye tamamlandı. 25°C'de 5 dk, 50°C'de 60 dk ve 85°C'de 5 dk inkübe edildi. Örnekler 20 kat seyreltildi, -20°C'de saklandı.

Gen ekspresyon analizi NucleoGene qPCR Sybr Green Master Mix (2X) kullanarak CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRAD) cihazında yapıldı. Fare ve insan hücrelerinde β -aktin (ACT β) referans gen olarak kullanıldı, *P. aeruginosa* için referans gen olarak proD kullanıldı. Genlere ait primer dizileri Çizelge 3.2'de verildi. Deney 4 tekrarlı yapıldı. Sonuçların 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} değeri hesaplanarak Gaphpad Prisim 8 programında t-test analizi veya One-Way ANOVA yapıldı.

Çizelge 3.2. PCR analizinde kullanılan primerlerin sekansı.

	Gen	Primer 1 (5' to 3')	Primer 2 (5' to 3')
İNSAN	ACTβ	CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
	TBP1	TGTATCCACAGTGAATCTTG GTTG	GGTTCGTGGCTCTCTTATCCTC
	GAPDH	GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTT
	HIF1α	TATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGC	CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG
	BCL2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
	cMYC	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG
	hTERT	ATGCGACAGTTCGTGGCTCA	ATCCCCTGGCACTGGACGTA
	VEGFA	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA	GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA
	CDH1	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
	WNT1	CTGTCCTGCCTCCTCATC	GGACCCAGCACAAATAAATAGTT
	TWIST	CGCCCCGCTCTTCTCCTCT	GACTGTCCATTTTCTCCTTCTCTG
	SNAIL	TGCCCTCAAGATGCACATCCGA	GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC
	VIM	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
	PD-L1	TGCCGACTACAAGCGAATTACTG	CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG
	IL-1β	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
	IL-6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
	IL-8	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT
	MUC2	ACTCTCCACACCCAGCATCATC	GTGTCTCCGTATGTGCCGTTGT
	MUC5A	CCACTGGTTCATATGGCAACACC	GCCGAAGTCCAGGCTGTGCG
	MUC5B	CTGCTACGACAAGGACGGAAAC	AAGGCTGTGAGCGCACTGGATG
	HDAC6	GCCTCAATCACTGAGACCATCC	GGTGCCTTCTTGGTGACCAACT
	HDAC2	CTCATGCACCTGGTGTCCAGAT	GCTATCCGCTTGTCTGATGCTC
FARE	HLA-B	CAGTTCGTGAGGTTTCGACAG	CAGCCGTACATGCTCTGGA
	HLA-E	TTCCGAGTGAATCTGCGGAC	GTCGTAGGCGAACTGTTTCATAC
	HLA-F	TGGCCCTGACCGATACTTG	GCAGGAATTGCGTGTCGTC
	ACTβ	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG
	HIF-1α	CCTGCACTGAATCAAGAGGTTGC	CCATCAGAAGGACTTGCTGGCT
	HDAC6	TCGCTGTCTCATCCTACCTGCT	GTCAAAGTTGGCACCTTCACGG
	BCL-2	CCTGTGGATGACTGAGTCCACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
	VEGFA	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC
	IL-1β	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
	IL-6	TACCACTICACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATOGTTGTTC
	IL-10	CTATGCTGCCTGCTCTTACTG	GGGAAGTGGGTGCAGTTATT
	CCL1	GCTTACGGTCTCCAATAGCTGC	GCTTTCTCTACCTTTGTTTCAGCC
	CCL2	GCTACAAGAGGATCACCAGCAG	GTCTGGACCCATTCTTCTTGG
	CCL5	CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC	ACACACTTGGCGGTTCTTCGA

Çizelge 3.2.(devam) PCR analizinde kullanılan primerlerin sekansı.

FARE	PDL1	TGCGGACTACAAGCGAATCACG	CTCAGCTTCTGGATAACCCTCG
	MHC-1	AGACACAGAAAGCCAAGGG	CACTTCACAGCCAGAGATCAC
	CTSB	AGTCAACGTGGAGGTGTCTGCT	GTAGACTCCACCTGAAACCAGG
	TGF- β	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
<i>P. aeruginosa</i>	proD	GGGCGAAGAAGGAAATGGTC	CAGGTGGCGTAGGTAGAGAA
	rpsI	CCTCGTACATCGGTGGTGAAG	CCCTGCTTACGGTCTTTGACAC
	lasI	TGTTCAAGGAGCGCAAAGG	ATGGCGAAACGGCTGAGTT
	lasR	AGCGACCTTGATTCTCGAAG	CGAAGAAGCTCGTGCTGCTTTC
	rhII	TGCTCTCTGAATCGCTGGAA	GTTTGCGGATGGTCGAACTG
	rhIR	TTGCTGAGCGTGCTTTCC	AGGATGATGGCGATTTC

3.10. Ligandların Hücre Göçüne Etkisi

MCF7 insan meme kanseri hücre hattı DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. 5x10⁵ hücre 6-kuyulu plakaya 3 tekrarlı ekildi, 1 gün inkübe edildi ve hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Hipoksi koşulu için 100 μ M kobalt klorür eklendi, 4 saat inkübe edildi. Daha sonra normoksi ve hipoksi deney gruplarına 5 μ M NGL-5 besiyerine eklendi, 20 saat inkübe edildi. Işık deney grubuna 10 cm mesafeden 660 nm ışık alttan 30 dakika boyunca uygulandı. Sarı (200 μ L) pipet ucu ile plaka tabanına çizik çizildi. Çiziklerin 24 ve 48 saat sonra görüntüsü alındı. ImageJ programı ile çizik alanı hesaplandı ve kontrole kıyasla analizi yapıldı.

3.11. Hücre Akış Sitometrisi

MCF7 insan meme kanseri hücre hattı DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. 5x10⁵ hücre 6-kuyulu plakaya 3 tekrarlı ekildi, 1 gün inkübe edildi ve hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Hipoksi koşulu için 100 μ M kobalt klorür (CoCl₂) eklendi, 4 saat inkübe edildi. Daha sonra normoksi ve hipoksi deney gruplarına 5 μ M NGL-5 besiyerine eklendi, 20 saat inkübe edildi. Işık deney grubuna 10 cm mesafeden 660 nm ışık alttan 30 dakika boyunca uygulandı. Bütün deney grupları 1 gün inkübe edildi. Daha sonra hücreler tripsin kullanılarak toplandı, %4 paraformaldehid oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak fiksasyon yapıldı. %0,5 Tween-20 oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak membran geçirgenliği artırıldı. %10 FBS oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. 8-OHdG antikoru (sc-

39387, Santa Cruz Biotechnology) son konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde eklendi, gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Beckman Coulter CytoFLEX S akış sitometri cihazı kullanılarak örnekler FITC (488 nm lazer) kanalında takip edildi. Sonuçlar FlowJo X programında analiz edildi.

G-kuadrupteks ligandlarının hücre kültüründe G-kuadrupteks yapısına bağlandığını belirlemek için uygun antikorlar kullanılarak mikroskop görüntüleme ve hücre akış sitometrisi yöntemleri kullanıldı. B16 hücresi DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde ve %5 CO₂, 37°C’deki inkübatörde büyütüldü. Görüntüleme için 12-kuyulu plakanın kuyularına lamel yerleştirildi ve 5x10⁴ hücre/kuyu, hücre akış sitometrisi için 6-kuyulu plakaya 5x10⁶ hücre/kuyu ekildi ve 1 gün inkübe edilerek hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Hipoksi koşulu için 150 µM kobalt klorür (CoCl₂) eklendi, 1 gün inkübe edildi. NGL-4 5 ve 20 µM eklendi, 37°C’de inkübe edildi. Pozitif kontrol için G4 yapısına bağlandığı bilinen TMPyP4 molekülü 5 µM derişimde kullanıldı. 5 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri atılıp kuyular PBS ile yıkandı. %4 paraformaldehid oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak fiksasyon yapıldı. %0.5 Tween-20 oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak membran geçirgenliği artırıldı. %10 FBS oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. Anti-DNA G4 1H6 primer antikor (Sigma-Aldrich, Cat: MABE1126) 1:200 seyreltme ile eklendi. Gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Kuyular 2 kere PBS ile yıkandı. Goat anti-mouse IgG (H+L) FITC sekonder antikor (Invitrogen, Cat:31569) 1:1000 eklendi. 2 saat +4°C’de inkübe edildi. Kuyular 2 kere PBS ile yıkandı. Hücreler PBS içinde süspanse edildi ve analizi yapıldı.

3.12. Floresan Mikroskopu Görüntüleme

Görüntüleme için 12-kuyulu plakanın kuyularına lamel yerleştirildi ve 5x10⁴ hücre 1 gün inkübe edilerek hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Hipoksi koşulu için 150 µM kobalt klorür eklendi, 1 gün inkübe edildi. NGL-4 molekülü 5 ve 20 µM eklendi, 37°C’de inkübe edildi. Ligand 5 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri atılıp kuyular PBS ile yıkandı. %4 paraformaldehid oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak fiksasyon yapıldı. %0,5 Tween-20 oda sıcaklığında 30 dakika uygulanarak membran geçirgenliği artırıldı. %10 FBS (fetal bovin serum) oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. Anti-DNA G4 1H6 primer antikor (Sigma-Aldrich, Cat:MABE1126) 1:200 seyreltme ile eklendi. Gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Kuyular 2 kere PBS ile yıkandı. Goat anti-mouse IgG (H+L) FITC sekonder antikor (Invitrogen, Cat:31569) 1:1000 eklendi. 2 saat +4°C’de inkübe

edildi. Kuyular 2 kere PBS ile yıkandı. Mikroskop görüntüleme için Zeiss microscopy, Axiocam 305 camera cihazı kullanıldı. DAPI (uyarma dalga boyu 353 nm ve emisyon dalga boyu 465 nm) ve FITC (uyarma dalga boyu 495 nm ve emisyon dalga boyu 519 nm) kanalları kullanıldı.

3.13. Koloni Oluşumu Analizi

HTC116 hücre hattı DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. 1×10^4 hücre 6-kuyulu plakaya 3 tekrarlı ekildi, 2 gün inkübe edildi ve hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. NGL-7 ligandı 5 ve 20 μ M ve HDAC6 inhibitörü 1 μ M derişimde deney gruplarına eklendi, 2 gün inkübe edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı ve toplam 8 gün boyunca inkübasyon gerçekleşti. Daha sonra kuyular boşaltılıp PBS ile yıkandı. Saf metanol eklenerek 30 dakika soğukta fiksasyon yapıldı, kuyular PBS ile yıkandı. %0,5 kristal violet eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, kuyular PBS ile yıkandı. Kuyuların fotoğrafı dijital kamera ile çekildikten sonra ImageJ programı kullanılarak koloniler sayıldı.

3.14. Transkriptom Analizi

B16-F10 hücre hattı DMEM (4500 mg/L glukoz, %10 FBS, %0,1 genitamisin) besiyerinde ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. 5×10^5 hücre 6-kuyulu plakaya 3 tekrarlı ekildi, 1 gün inkübe edildi. NGL-7 ligandı 5 ve 20 μ M derişimde eklendi ve 1 gün inkübe edildi. RNA izolasyonu için A.B.T.TM RNA Purification Kit kullanıldı ve üreticinin talimatları doğrultusunda izolasyon gerçekleştirildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin (%0,25 EDTA, Gibco) ile toplandı. 1 mL Buffer P eklendi, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 μ L kloroform eklendi, karıştırıldı, vortekslendi, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dk 12000 g +4°C'de santrifüj edildi. Şeffaf olan üst kısım dikkatlice yeni bir ependorfa alındı. (Alt pembe bölüm protein, orta beyaz bölüm DNA, üst şeffaf bölüm RNA). 1 mL Buffer RB eklendi, karıştırıldı. Lizat kolon ependorfa aktarıldı. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. Bütün lizat bitene kadar bu işlem tekrarlandı. 500 μ L Wash Buffer I eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. 500 μ L Wash Buffer II eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. Boş kolon 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. 50 μ L nükleazsız su eklendi. 3 dk 12000g +4°C'de santrifüj edildi. 1000 ng total RNA 3 tekrarlı olarak hazırlandı. Sonraki işlemler RefGen firması tarafından yapılmıştır. RNA

safliklari ölçüldü. mRNA kütüphanesi poli-A kuyruğu esas alınarak hazırlandı ve dizileme yapıldı. Biyoinformatik analiz için FASTQC aracı kullanıldı. Normalizasyon sonrasında, gruplar arası anlatımı değişen genleri belirlemek için edgeR R paketi ve Quasi-Likelihood modeli kullanılmıştır. Gen ontoloji analizinde TopGO paketi ve Kolmogorov-Smirnov (KS) istatistiksel testi kullanılmıştır. Yolak analizlerinde clusterProfiler paketi kullanılmıştır.

3.15. Minimum İnhibisyon Derişiminin Belirlenmesi

Pseudomonas aeruginosa (PAO suşu), Nutrient Broth (Merck) besiyerinde ve 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. *P. aeruginosa* stoğundan 1×10^6 hücre olacak şekilde bakteri 96 kuyulu plakaya 4 tekrarlı ekim yapıldı ve aynı anda farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 μ M) hazırlanan NGL-4 ligandı ve AHL molekülleri eklendi, 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Daha sonra bakteri canlılığı 600 nm'deki absorbansları mikrolaka okuyucusu (Thermo Scientific, Multiskan Skyhigh Microplate Reader) ile ölçüldü. Absorbans değerlerinin ortalaması alındı, kontrol grubuna göre normalize edilerek canlılık yüzdesi excel programında hesaplandı ve grafik çizildi.

3.16. Biofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Pseudomonas aeruginosa (PAO suşu), Nutrient Broth (Merck) besiyerinde ve 37°C'deki inkübatörde büyütüldü. *P. aeruginosa* stoğundan 1×10^6 hücre olacak şekilde bakteri 96 kuyulu plakaya 4 tekrarlı ekim yapıldı ve aynı anda farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 μ M) hazırlanan NGL-4 ligandı ve AHL molekülleri eklendi, 37°C'deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Kristal violet (%0,1) 125 μ L eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular PBS ile 4 kere yıkandı ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında kurutuldu. Asetik asit (%30) 150 μ L eklendi ve 100 μ L temiz plakaya aktarıldı. Biofilm oluşumu 550 nm'deki absorbansları mikrolaka okuyucusu (Thermo Scientific, Multiskan Skyhigh Microplate Reader) ile ölçüldü. Absorbans değerlerinin ortalaması alındı, kontrol grubuna göre normalize edilerek canlılık yüzdesi excel programında hesaplandı ve grafik çizildi.

3.17. Piyosiyanin Üretimi

Pseudomonas aeruginosa (PAO suşu), Nutrient Broth (Merck) besiyerinde ve 37°C’deki inkübatörde büyütüldü. *P. aeruginosa* stoğundan 1×10^6 hücre olacak şekilde bakteri 15 mL falkon tüplere 2 tekrarlı ekim yapıldı ve aynı anda farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 μ M) hazırlanan NGL-4 ligandı ve AHL molekülleri eklendi, 37°C’deki inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Falkon tüpler santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz falkona alındı ve kloroform eklendi, karıştırıldı. Tekrar santrifüj edildi. Alttaki mavi segment temiz falkona alındı ve 0.2 M hidroklorür asit eklendi, karıştırıldı. Santrifüj edildi pembe segment 96 kuyulu plakaya alındı. Piyosiyanin miktarının belirlenmesi için 520 nm’deki absorbansları mikrolaka okuyucusu (Thermo Scientific, Multiskan Skyhigh Microplate Reader) ile ölçüldü. Piyosiyanin miktarı aşağıdaki Eşitlik (3.5) kullanılarak hesaplandı (Altves vd., 2025).

$$[\text{Piyosiyanin Derişimi}] (\mu\text{g/mL}) = \text{Örnek Absorbansı} (A_{520}) \times 17,072 \quad (3.5)$$

3.18. İstatiksel Analiz

Bu tez çalışmasında gerçekleştiren bütün deneyler en az 3 tekrarlı yapıldı. Tekrarların ortalama değerleri ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterildi. İstatiksel analiz için GraphPad Prism 9 programında öğrenci t-testi veya tek yönlü ANOVA analizi kullanıldı. Analiz sonuçlarında p değeri 0,05'ten küçük veya buna eşit olan karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. G-kuadrupleks Ligandların Sentezi

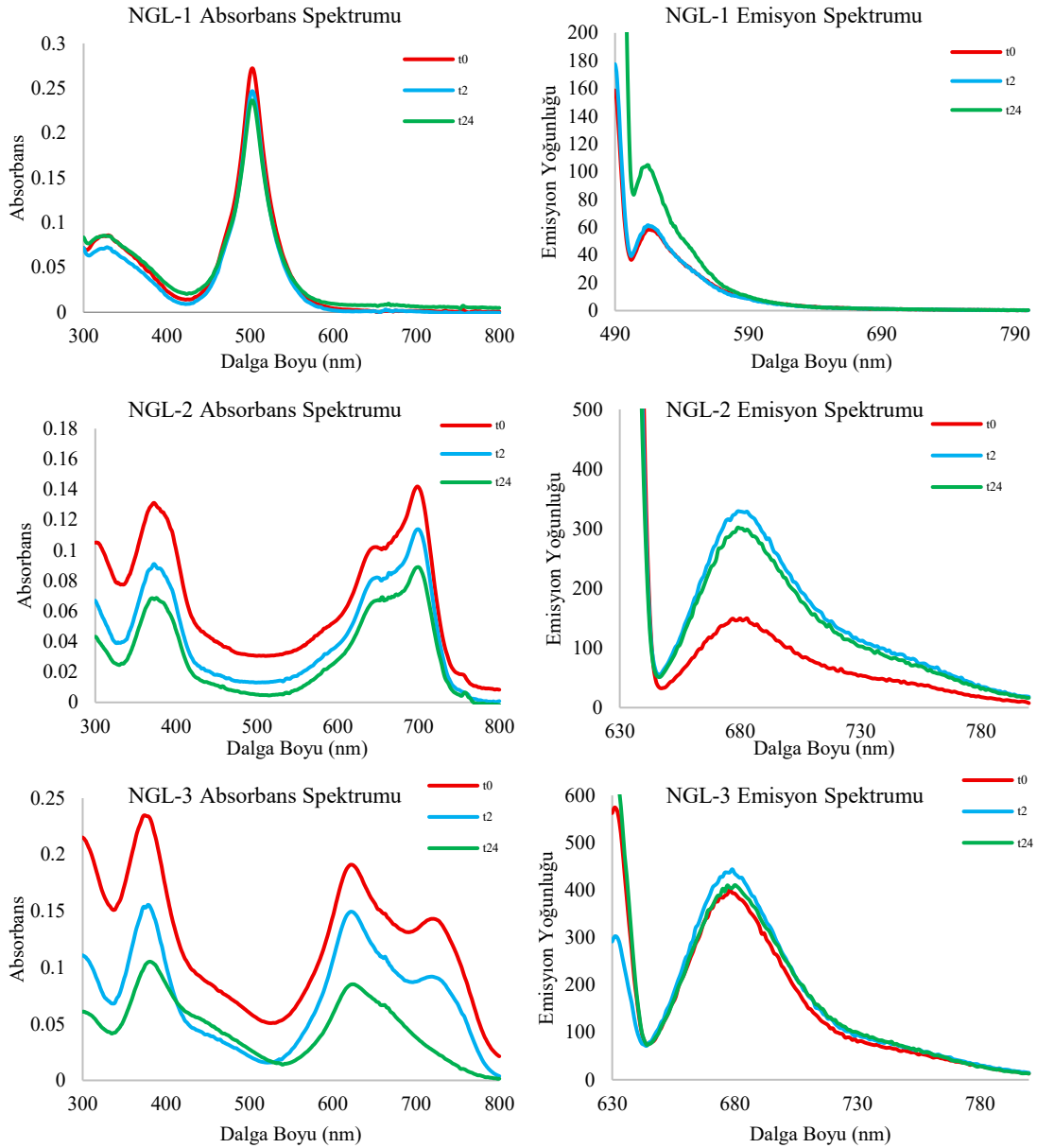
Tez çalışmasında sentezlenen bütün potansiyel G-kuadrupleks ligandlarında BODIPY (boron dipirrometen) ana gövdesi kullanıldı ve ana gövdeye farklı modifikasyonlar eklenerek çeşitlendirildi. NGL-1’de meso-pozisyonda bir pozitif yüklü metil-piridinyum, NGL-2’de meso-pozisyonda fenil benzil eter ve 3,5-pozisyonda distiril yapıda iki pozitif yüklü metil-piridinyum, NGL-3’te meso-pozisyonda fenil ve 3,5-pozisyonda distiril yapıda iki pozitif yüklü metil-piridinyum ve 2,6-pozisyonda iyot atomları yer almaktadır. NGL-4’te meso, 3,5- pozisyonlarında toplamda üç pozitif yüklü metil-piridinyum bulunmaktadır. NGL-5’de meso-pozisyonda 4-nitrobenzil fenil ve 3,5-pozisyonda distiril yapıda iki pozitif yüklü metil-piridinyum ve 2,6-pozisyonda iyot atomları yer alırken NGL-6’da meso-pozisyonda fenol ve 3,5-pozisyonda distiril yapıda iki pozitif yüklü metil-piridinyum ve 2,6-pozisyonda iyot atomları vardır. Son olarak, NGL-7’de meso-pozisyonda fenil ve 3,5-pozisyonda p-tolioksi-*N*-butil asetamid, NGL-8’de meso-pozisyonda fenil ve 3,5-pozisyonda p-tolioksi-*N*-butil aminium bulunur (Şekil 3.1).

Sentezlenen ligandların ve ara basamaklardaki her bir molekülün saflaştırılması yapıldı. ¹H ve ¹³C Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrometrisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri (HRMS) analizleriyle karakterizasyonu yapıldı. Elde edilen karakterizasyon verileri tezin EKLER kısmında verilmiştir.

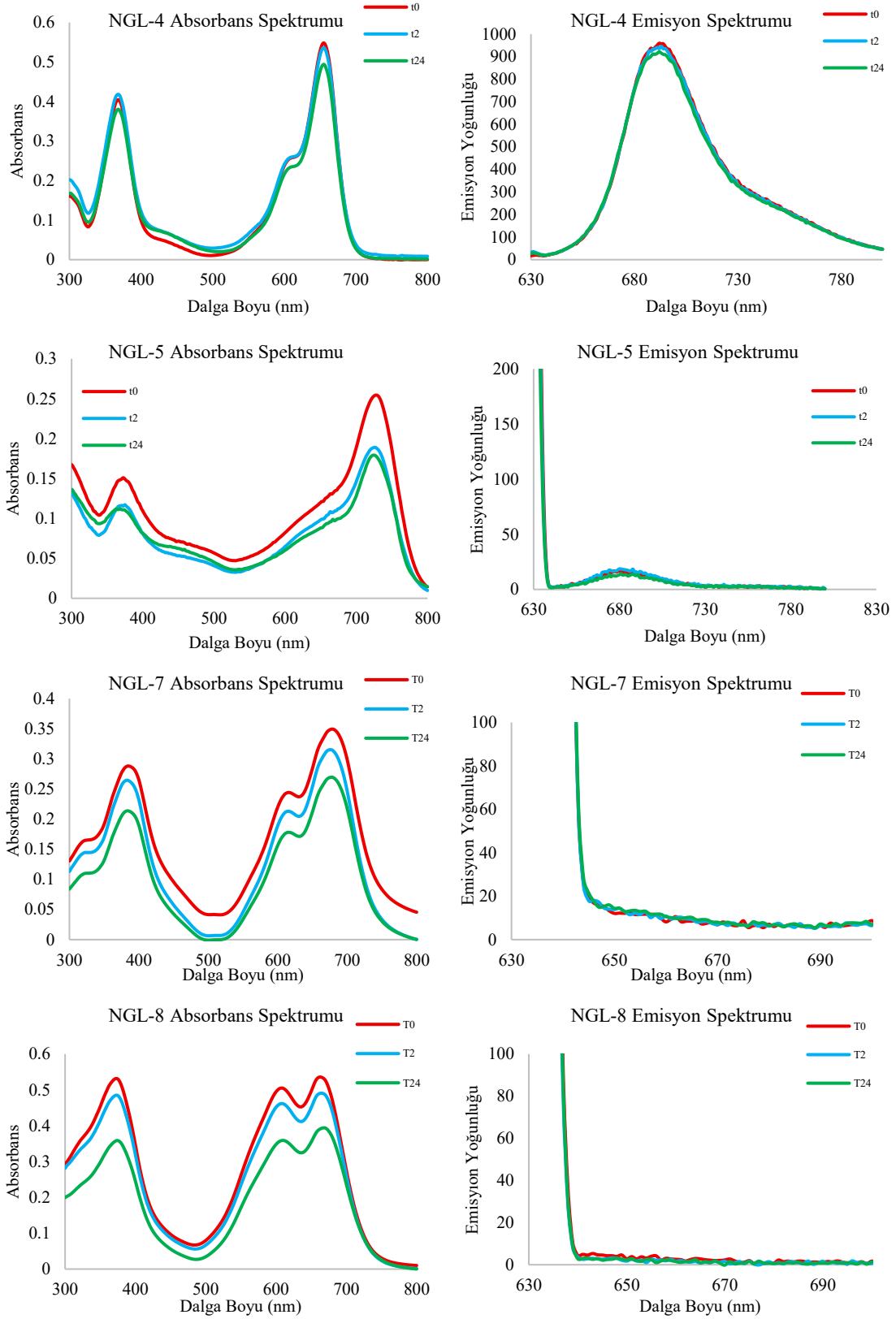
4.2. G-kuadrupleks Ligandların Fotofiziksel Özellikleri

Sentezlenen BODIPY-temelli G4 ligandları fotofiziksel özellikleri PBS (pH:7.4) içinde incelendi (Şekil 4.1). Sadece NGL-1’in absorbans değeri 504 nm, diğer moleküller 650 nm civarındadır. 3,5-pozisyonundaki distiril yapıda eklenen sübstitüentler BODIPY ana gövdesinin konjugasyonu arttırarak batokromik kaymaya neden olmuştur. Emisyon spektrumlarına bakıldığında NGL-7 ve NGL-8 moleküllerinde hiç emisyon gözlenmezken NGL-1, NGL-2, NGL-3, NGL-5 ve NGL-6 moleküllerinde çok az emisyon değeri ve NGL-4 molekülünde ise en fazla emisyon değeri tespit edildi (Çizelge 4.1). Oda sıcaklığında, PBS içinde, 2 ve 24 saat kararlılık için absorbans ve emisyon spektrumlarına bakıldığında en kararlı molekülün NGL-4 olduğu görüldü ve diğer moleküllerde çok az kararsızlık veya zamanla çökmeye bağlı absorbans değişimi görüldü. Ligandların 5-50 µM derişim aralığında absorbans spektrumları incelendiğinde PBS

içinde derişimin absorbans ile lineer bir korelasyona sahip olduğu tespit edilmiştir ve bu veriden yola çıkarak bu tamponda ve bu derişim aralığında yüksek oranda çözündüğü belirlenmiştir (Şekil 4.2).



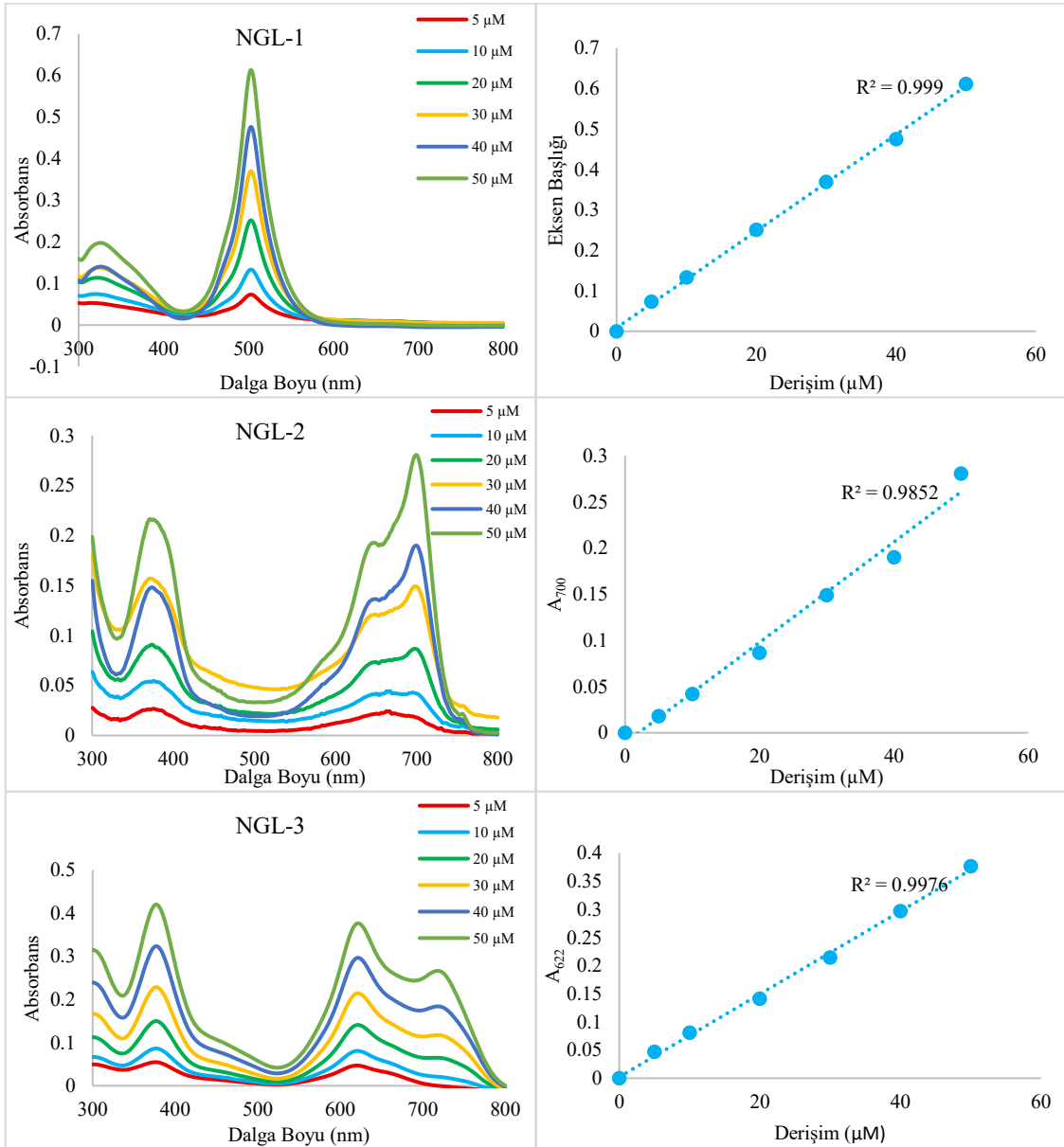
Şekil 4.1. G-kuadrupleks ligandlarına (25 μ M) ait absorbans ve emisyon spektrumları. NGL-1 488 nm, NGL-2, NGL-3, NGL-4, NGL-5, NGL-7, NGL-8 630 nm'den uyarılmıştır. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7,4) kullanıldı.



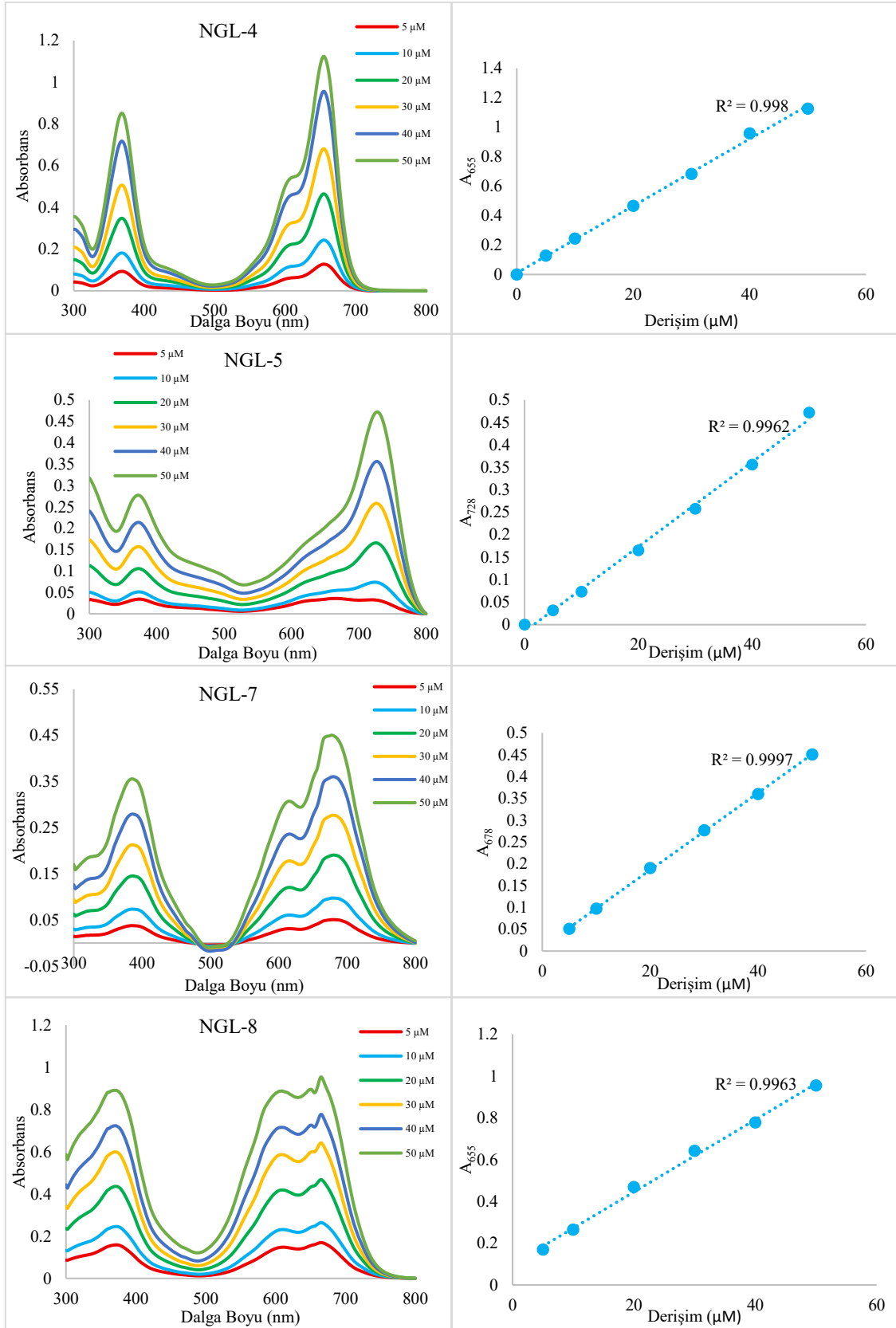
Şekil 4.1.(devam) G-kuadrupleks ligandlarına (25 μ M) ait absorbans ve emisyon spektrumları. NGL-1 488 nm, NGL-2, NGL-3, NGL-4, NGL-5, NGL-7, NGL-8 630 nm'den uyarılmıştır. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7,4) kullanıldı.

Çizelge 4.1. G-kuadrupleks ligandlarına ait absorpsiyon, emisyon, molar ekstinksiyon katsayısı değerleri. NGL-1 488 nm, NGL-2, NGL-3, NGL-4, NGL-5, NGL-7, NGL-8 630 nm'den uyarılmıştır. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7,4) kullanıldı.

Ligand	Absorpsiyon ($\lambda_{\text{maksimum}}$)	Emisyon ($\lambda_{\text{maksimum}}$)	Molar Ektinksiyon Katsayısı (ϵ)
NGL-1	504 nm	514 nm	$30600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-2	700 nm	683 nm	$14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-3	622 nm	678 nm	$18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-4	655 nm	692 nm	$56200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-5	728 nm	683 nm	$23600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-7	665 nm	670 nm	$19500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
NGL-8	678 nm	734 nm	$20800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$



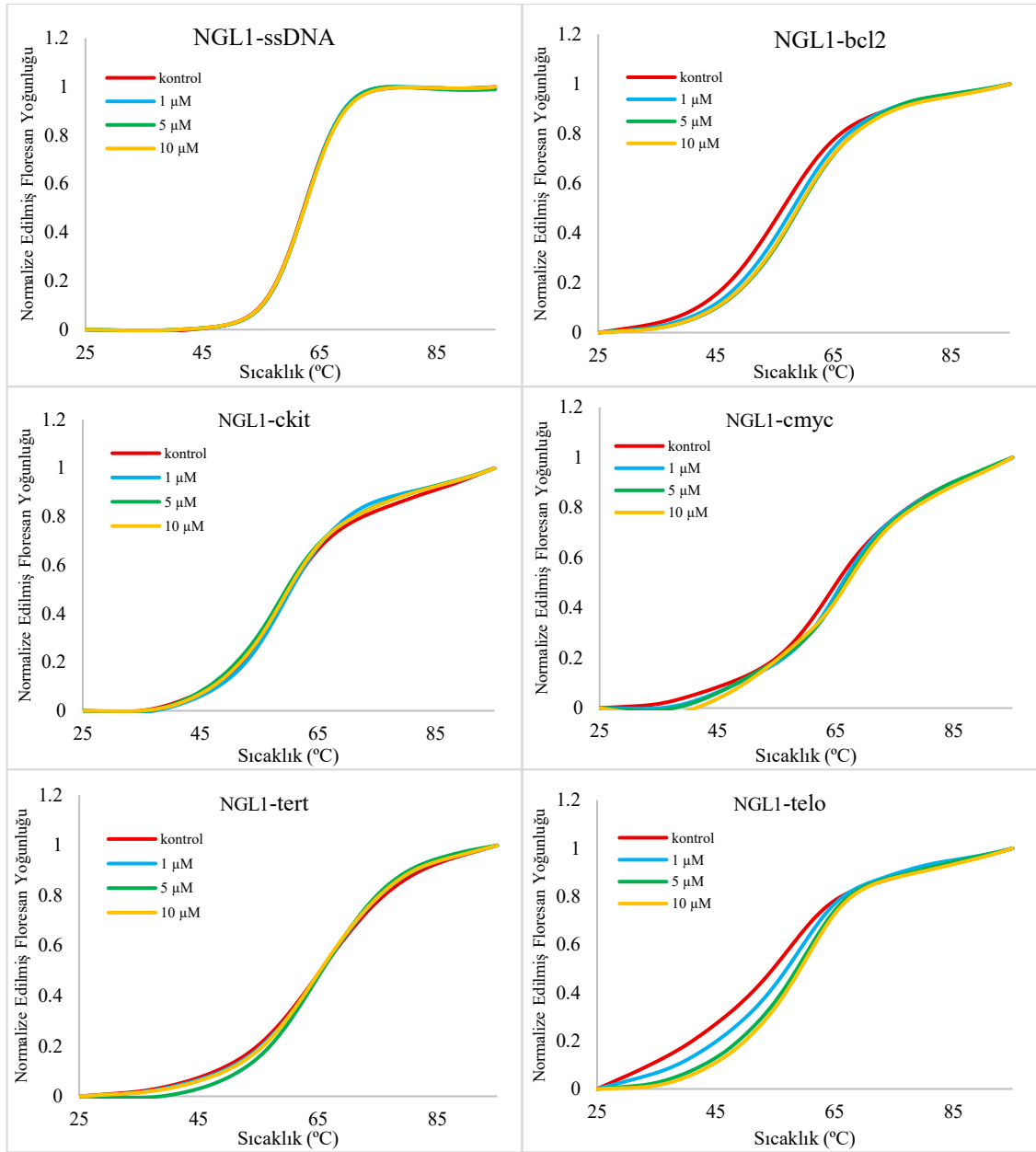
Şekil 4.2. G-kuadrupleks ligandlarına (5-50 μM) ait absorpsiyon spektrumu ve grafikleri. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7,4) kullanıldı.



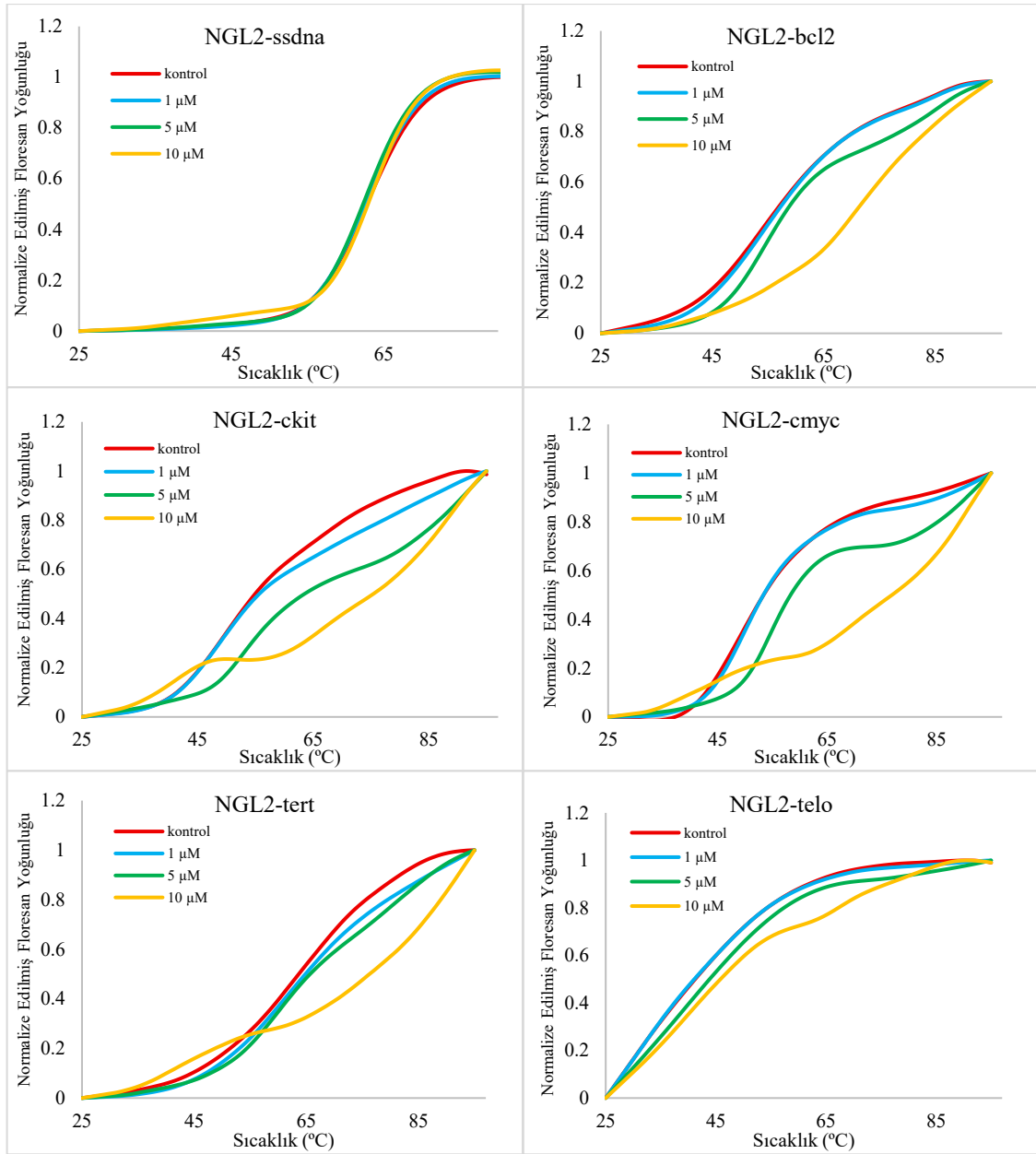
Şekil 4.2.(devam) G-kuadrupleks ligandlarına (5-50 μM) ait absorbans spektrumu ve grafikleri. Tampon çözelti olarak PBS (pH: 7,4) kullanıldı.

4.3. Ligandların G-kuadrupleks Yapısına Bağlanmasının Belirlenmesi

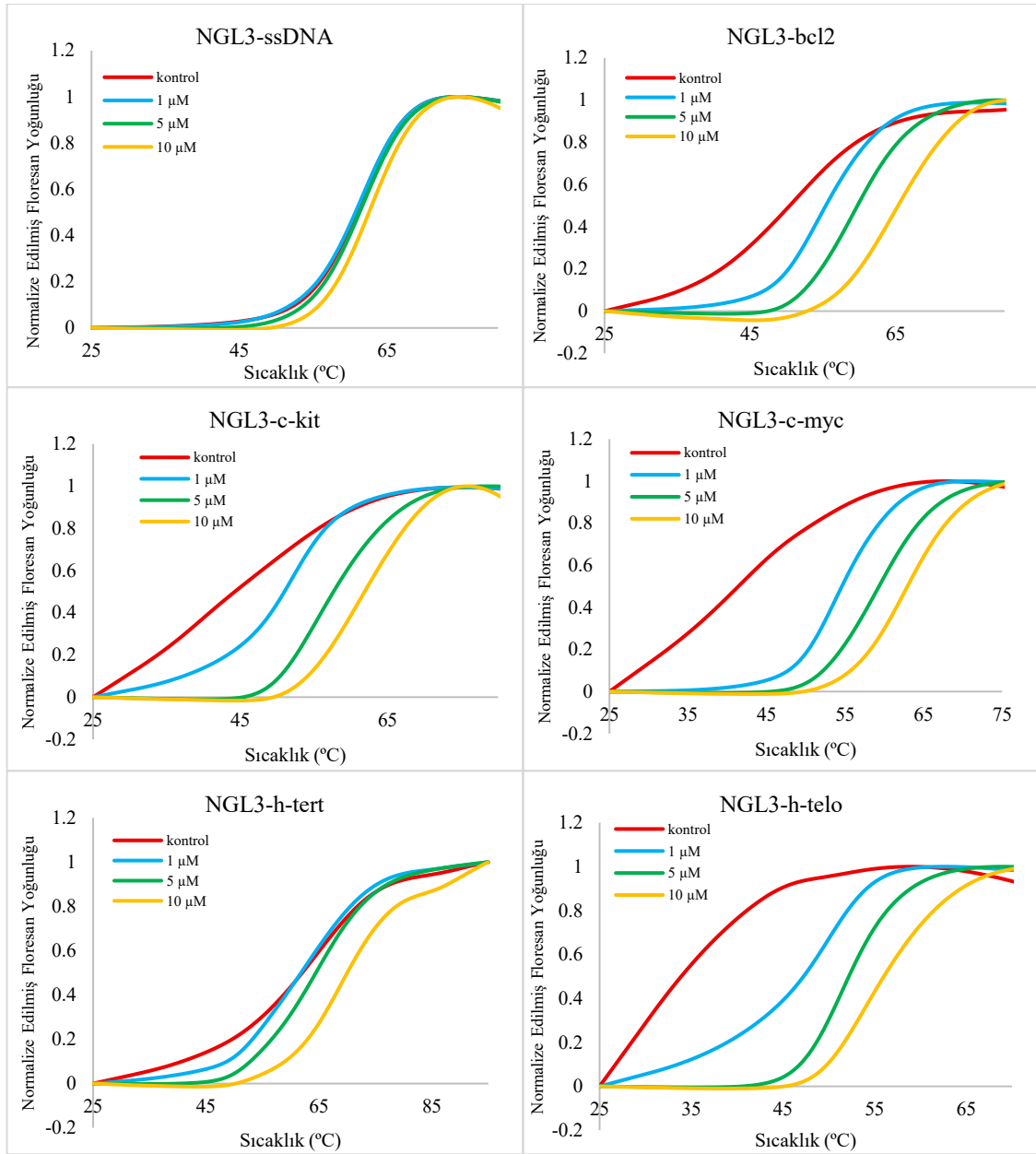
Ligandların G-kuadrupleks yapısına bağlanarak yapının kararlılığını arttırmasının belirlenmesi için FRET DNA erime deneyi yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 5 ve 10 μM) ligandlar ve 0.2 μM G-kuadrupleks içeren (bcl-2, c-myc, c-kit, h-tert ve h-telo) ve içermeyen (ss-DNA) oligomerler FRET tamponunda (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7.2) kademeli olarak sıcaklık artışına maruz bırakıldı. Normalize edilen sonuçların grafiği çizildi. Elde edilen sonuçlardan 0.5 normalize değere karşılık gelen T_m değerleri kontrol grubuna kıyaslanarak ΔT_m değerleri hesaplandı ve G4 ligandları arasında karşılaştırma yapıldı (Çizelge 4.2). G-kuadrupleks yapısı bulunmayan tek-zincirli DNA (ss-DNA) oligomerine sentezlenen G4 ligandlarının ilgisi olmamıştır. Sadece NGL-8'de doz artışına bağlı bir bağlanma tespit edildi. G-kuadrupleks yapısı bulunan DNA oligomerlerine karşı sentezlenen bütün G4 ligandlarının ilgisi vardır. G4 yapısını kararlılığına sıcaklığa karşı en fazla arttıran NGL-4 molekülüdür. 5 μM konsantrasyonda bcl-2, c-myc, c-kit, h-tert ve h-telo oligomerleri için sırasıyla ΔT_m değeri 20,16, 9,66, 19,5, 17,66 ve 15,3 derecedir. Ligandın üç pozitif yüke sahip olmasından dolayı sentezlenen diğer G4 ligandlara oranla DNA'nın negatif yüklü fosfodiester omurgası ile kovalent olmayan etkileşimlerde bulunarak yapıyı daha kararlı kıldığı düşünülmektedir. HDAC enzimi ile aktifleşen G4 ligandının ise pasif formu NGL-7'nin G4 yapısı bulunan oligomerlere karşı hiç ilgisinin olmaması üzerinde pozitif yük bulunmaması ve böylece DNA'ya bağlanmaması literatürle uyumludur. Aktif formu NGL-8 ise pozitif yük kazanarak G4 DNA'yı kararlı kılmıştır. NGL-8 ve NGL-7 arasındaki ΔT_m değeri kıyaslandığında bcl-2, c-myc, c-kit, h-tert ve h-telo oligomerleri için sırasıyla 23,23, 24,0, 12,5, 13,0 ve 24,5 derecedir. Çalışma grubumuzun daha önceki çalışmasında sentezlenen G4 ligandına oranla bu tez çalışmasında sentezlenen HDAC enzimi ile aktifleşen G4 ligandının G4 yapısını daha fazla kararlı kıldığı, aktif-inaktif stabilizasyon farkının çok daha fazla olduğu belirlendi belirlendi (Uyar vd., 2023).



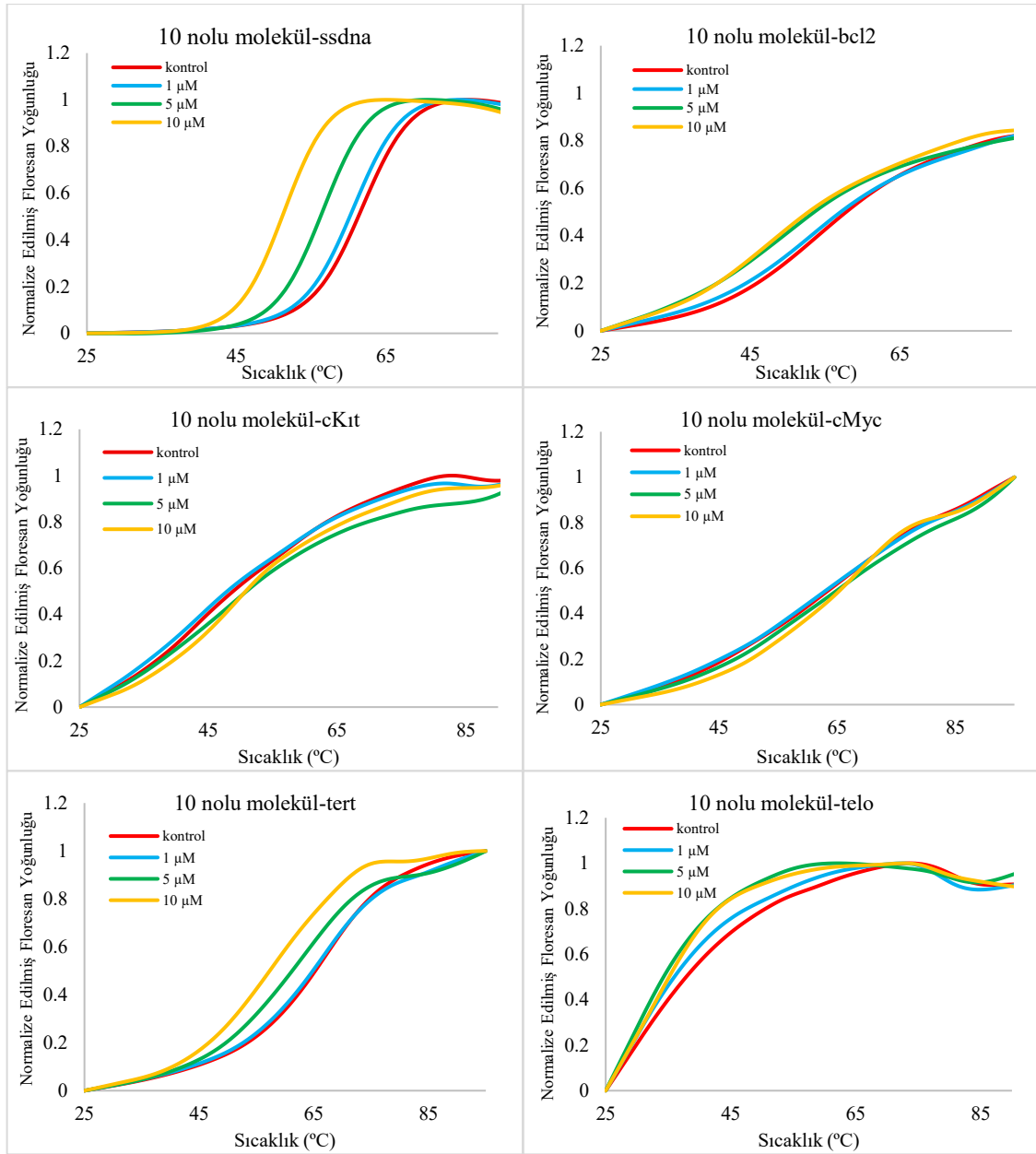
Şekil 4.3. NGL-1'in FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μM) ve oligomer (0,2 μM) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



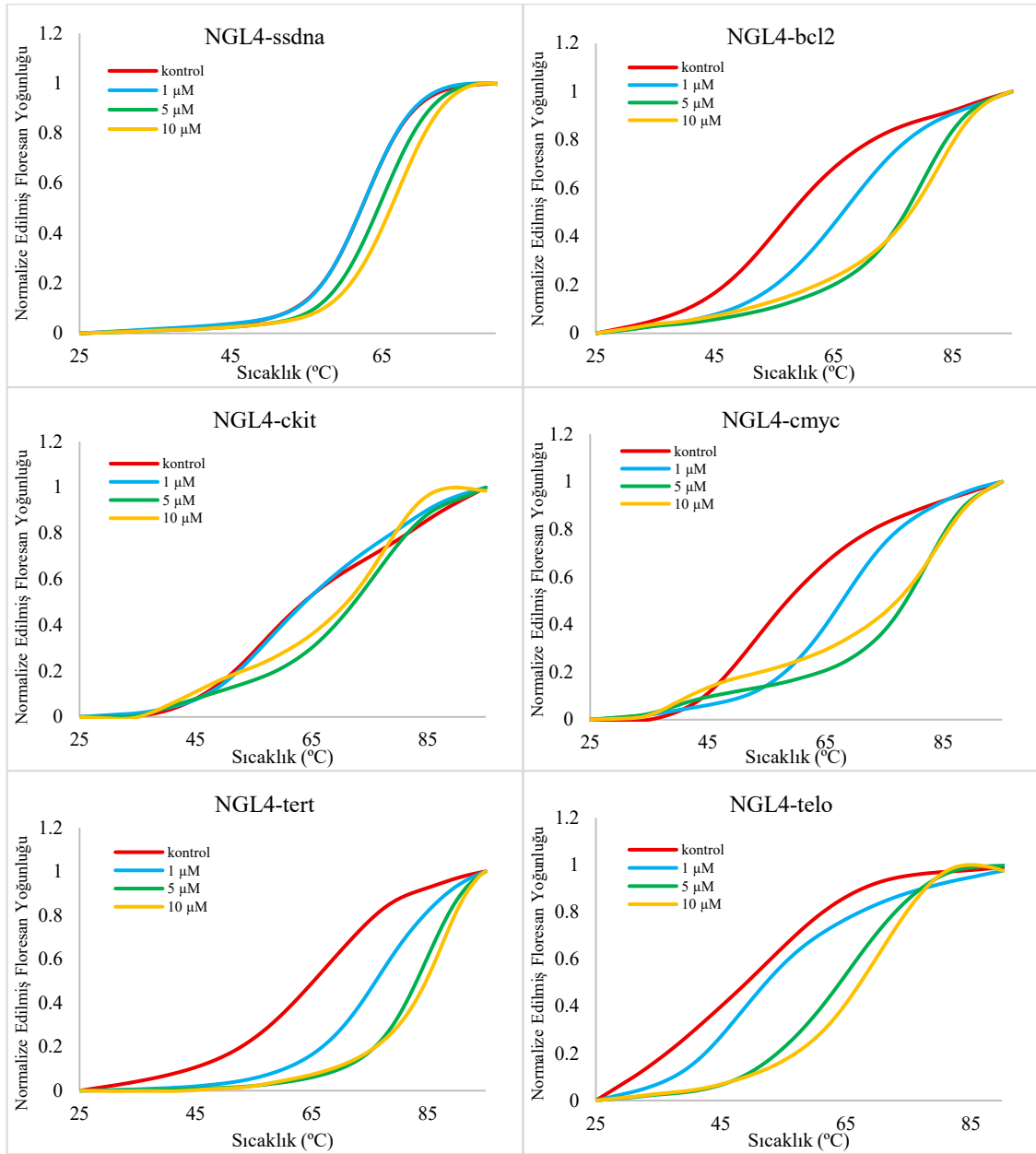
Şekil 4.4. NGL-2'nin FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 µM) ve oligomer (0,2 µM) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



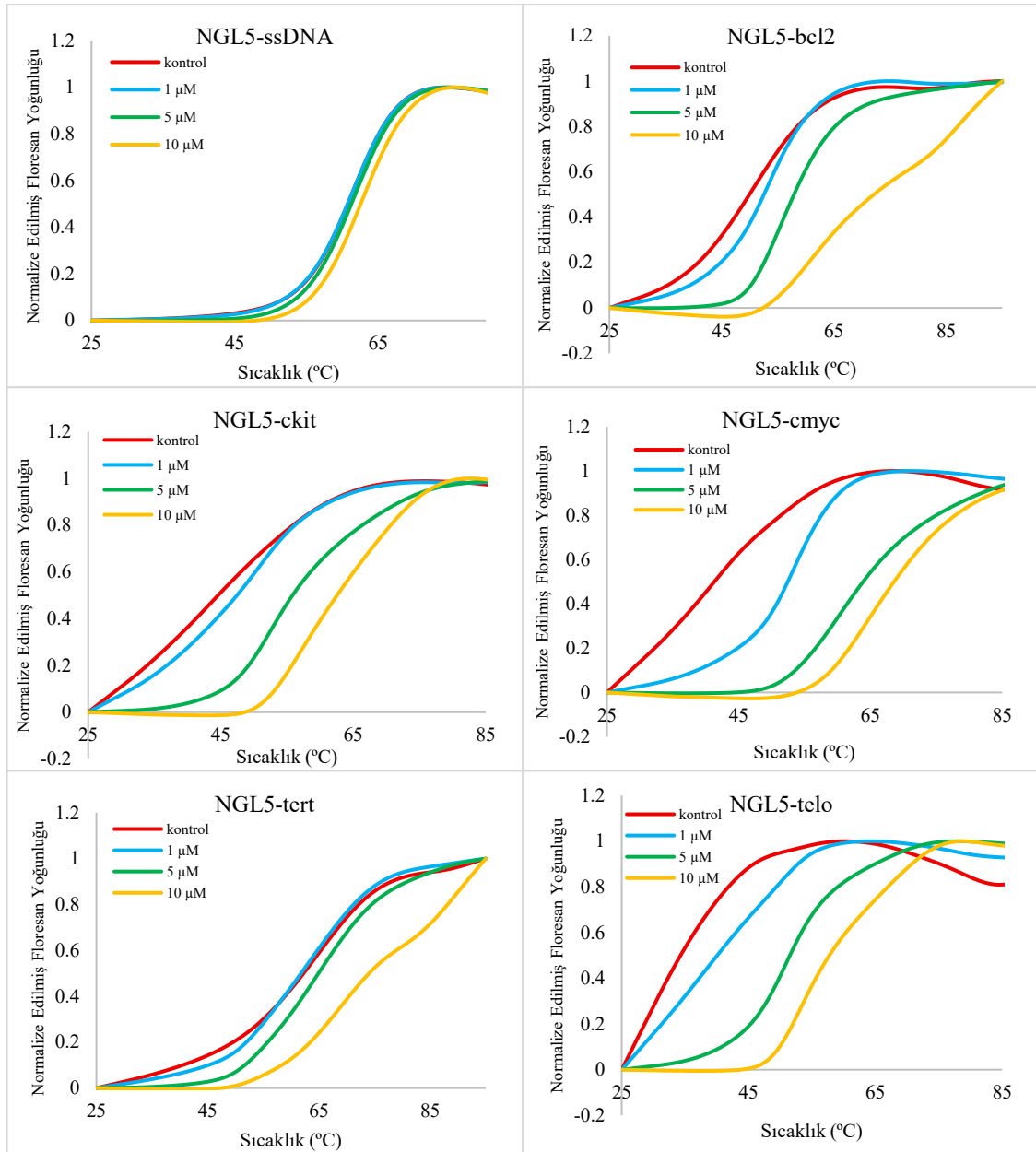
Şekil 4.5. NGL-3'ün FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μ M) ve oligomer (0,2 μ M) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



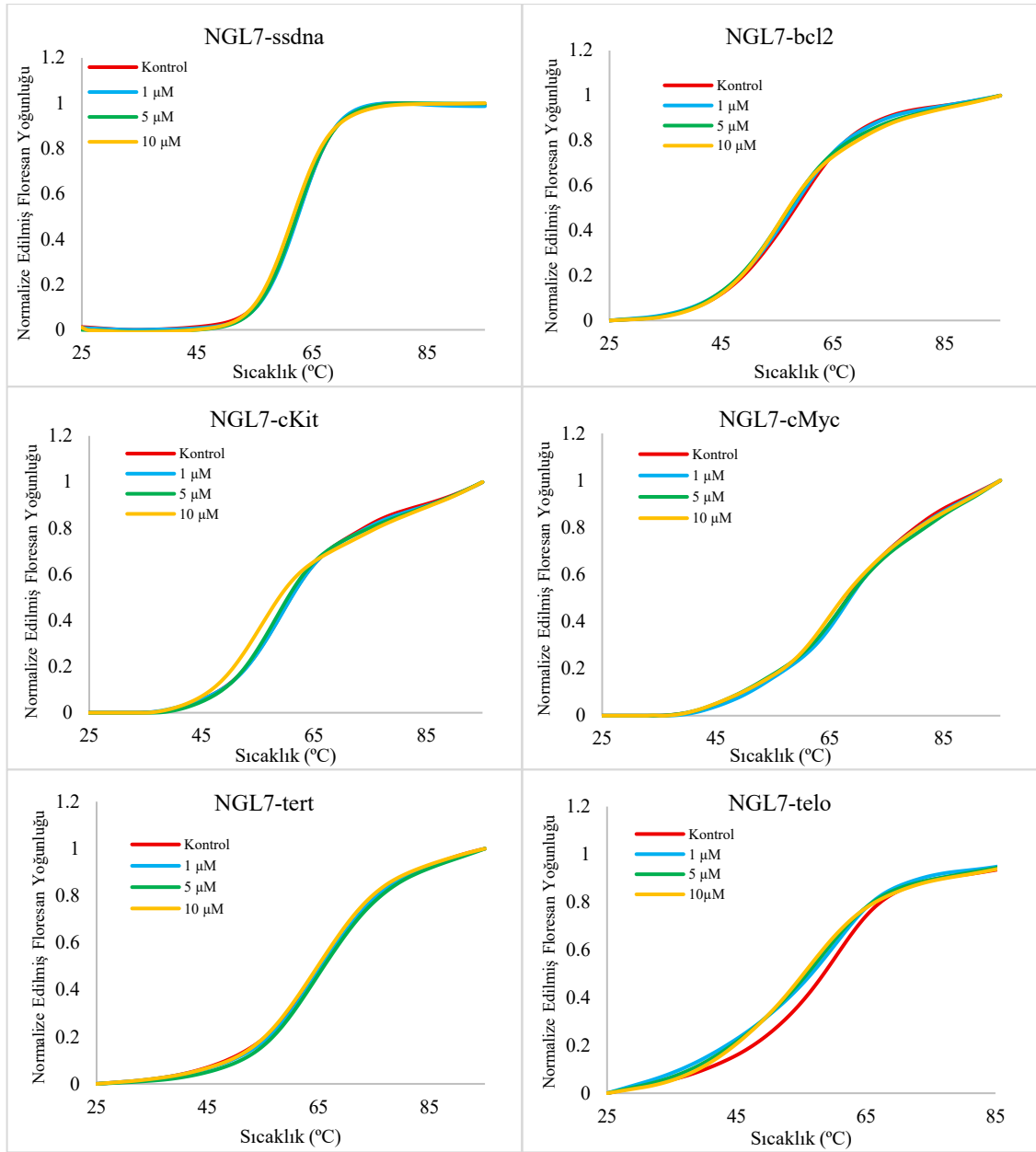
Şekil 4.6. 10 nolu molekülün FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μM) ve oligomer (0,2 μM) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



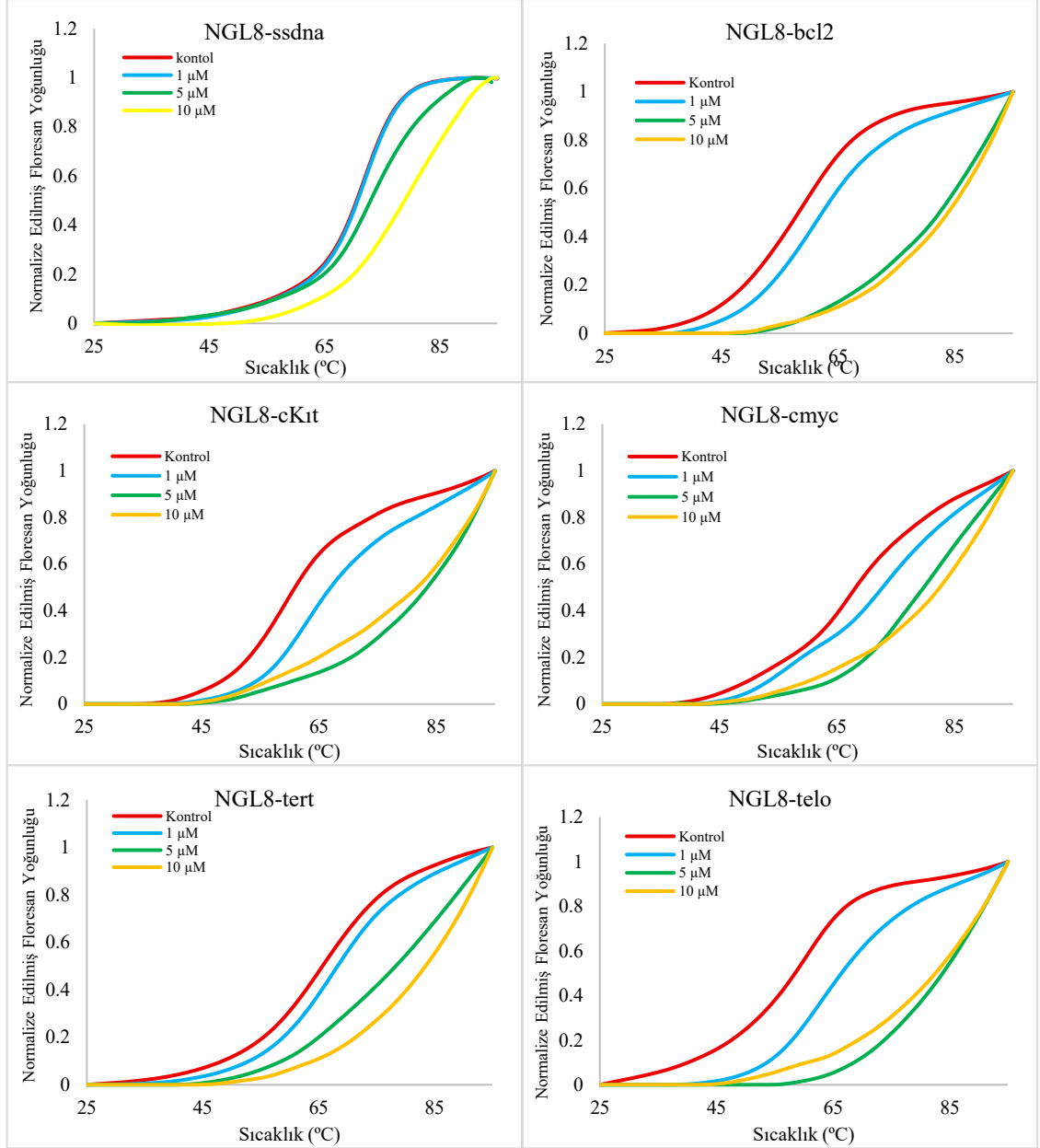
Şekil 4.7. NGL-4'ün FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 µM) ve oligomer (0,2 µM) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



Şekil 4.8. NGL-5'in FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μ M) ve oligomer (0,2 μ M) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



Şekil 4.9. NGL-7'nin FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μ M) ve oligomer (0,2 μ M) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.



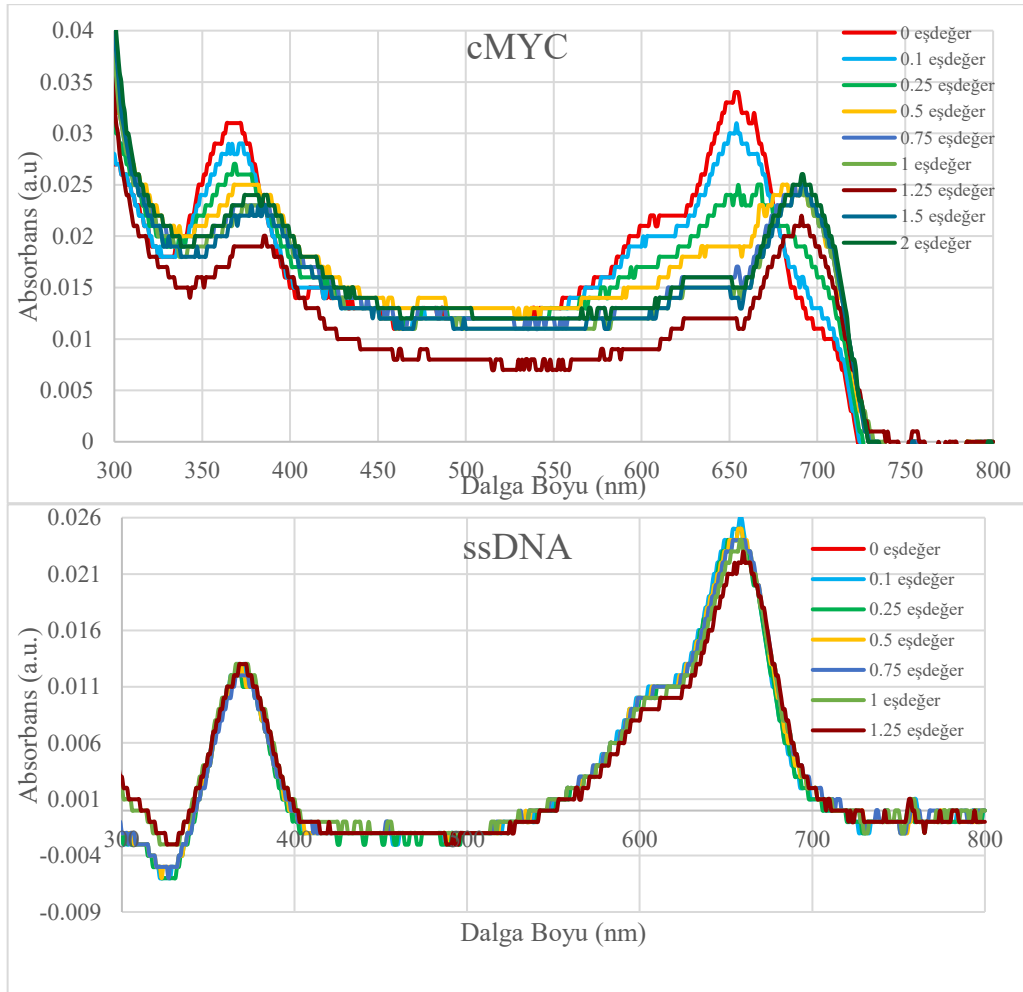
Şekil 4.10. NGL-8'in FRET DNA erime eğrileri. Ligand (1, 2, 5 ve 10 μM) ve oligomer (0,2 μM) FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) içinde kullanıldı.

Çizelge 4.2. G4 ligandlarının (5 μM) normalizasyon değeri 0,5'e karşılık gelen sıcaklık (ΔT_m) değerleri.

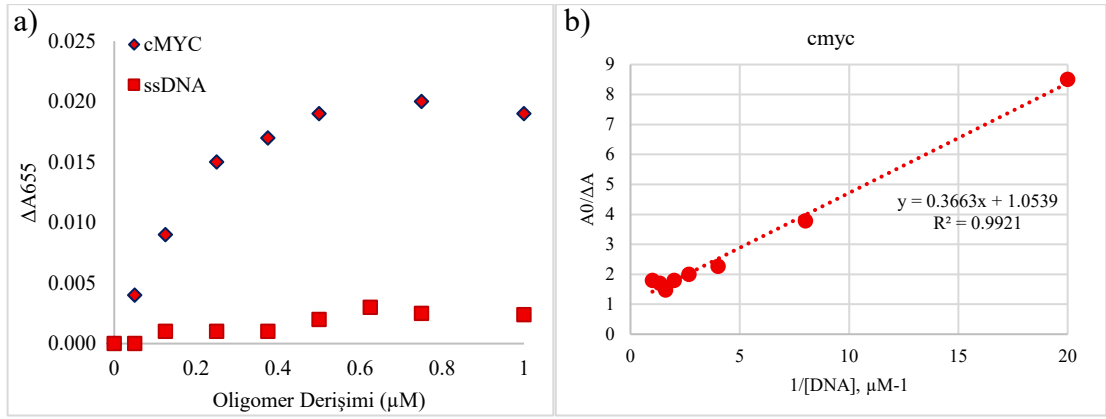
	ssDNA	BCL2	cKIT	cMYC	hTERT	telo
NGL-1	0,16 $\pm$ 0,24	2,66 $\pm$ 0,47	-0,83 $\pm$ 0,23	1,83 $\pm$ 0,24	-0,16 $\pm$ 0,85	4,3 $\pm$ 0,47
NGL-2	-0,16 $\pm$ 0,23	2,26 $\pm$ 1,03	8,3 $\pm$ 1,8	4,5 $\pm$ 0,7	2 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 0,47
NGL-3	0,16 $\pm$ 0,23	9,16 $\pm$ 0,23	13 $\pm$ 0,4	17,5 $\pm$ 0,81	2,3 $\pm$ 0,47	18,16 $\pm$ 0,23
NGL-4	2,76 $\pm$ 0,32	20,16 $\pm$ 1,65	9,66 $\pm$ 2,49	19,5 $\pm$ 1,47	17,66 $\pm$ 0,47	15,3 $\pm$ 0,47
NGL-5	0,66 $\pm$ 0,23	8 $\pm$ 0,1	11,16 $\pm$ 0,23	22,5 $\pm$ 0,4	3 $\pm$ 0,4	17,16 $\pm$ 0,23
NGL-7	-0,33 $\pm$ 0,23	-1,5 $\pm$ 0,4	-0,16 $\pm$ 0,23	0,16 $\pm$ 0,23	0,66 $\pm$ 0,47	-2,66 $\pm$ 0,62
NGL-8	19,3 $\pm$ 0,23	23,25 $\pm$ 0,25	24 $\pm$ 0,1	12,5 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 0,1

4.4. Ligandların G-Kuadrupleks DNA'ya Bağlanma Katsayısının Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenmiş, farklı modifikasyonlara, konjugasyona ve yük sayısına sahip olan G4 ligandlarının G4 yapısına bağlanması ve buna bağlı stabilizasyonu FRET DNA erime deneyiyle belirlenmiş ve sonuçlar önceki bölümde sunulmuştur. G4 yapısına en yüksek ilgiyle bağlanan NGL-4 için bağlanmanın derecesini belirlemek için ileri deneyler tasarlandı. Bu amaçla G4 yapısına bağlanma katsayısı UV-Vis absorbans spektrometrisi kullanılarak gerçekleştirilen titrasyon deneyi ile araştırıldı. Promotöründe G4 yapısı içeren c-MYC genine ait DNA dizisi bu amaçla seçildi. NGL-4 sabit tutularak c-myc oligomeri eklendiğinde spektrumun batokromik kayma gösterdiği ve pik değerinin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.12). NGL-4'ün c-MYC oligomerine bağlanma katsayısı Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.13). Bağlanma sabiti $2,88 \mu\text{M}^{-1}$ olarak bulundu. G4 yapısı oluşturmeyan rastgele sekansa sahip ssDNA oligomeri ile deney gerçekleştirildiğinde ise spektral değişimin oldukça az olduğu görüldü.



Şekil 4.11. NGL-4 ($5 \mu\text{M}$) ile c-myc ve ssDNA oligomerlerinin titrasyon grafiği. FRET tamponu (10 mM sodyum kakodilat, 100 mM lityum klorür, pH 7,2) kullanıldı.



Şekil 4.12. a) NGL-4'ün c-MYC ve ds-DNA oligomeri titrasyonuna bağlı olarak 655 nm'deki absorbanans değişimi. b) NGL-4 ile c-MYC oligomerinin titrasyon eğrisinin Benesi-Hildebrand çizimi.

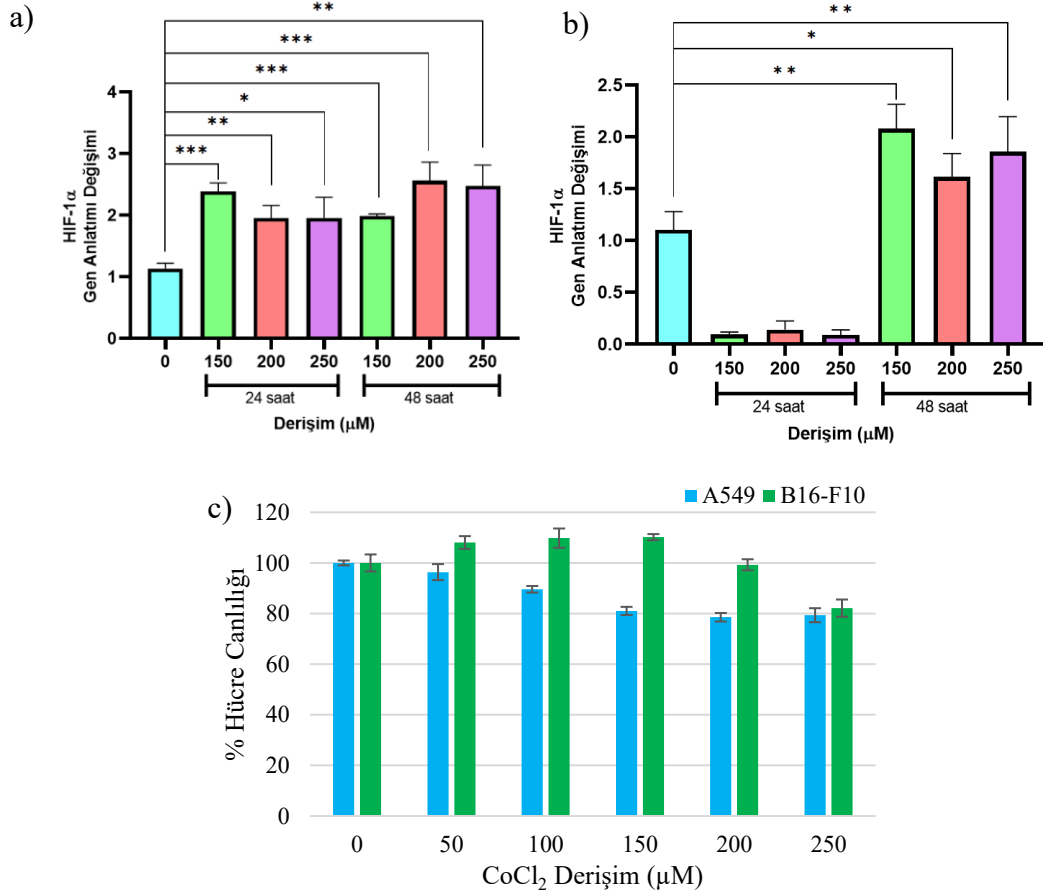
4.5. Üç Pozitif Yüklü G4 Ligandı NGL-4'ün Kanser ve Mikroçevresine Etkisi

Tez kapsamında sentezlenen G-kuadrupleks ligandlarının G-kuadrupleks DNA'ya olan ilgisi incelendiğinden G4 yapısına en fazla kararlılık kazandıran BODIPY ana gövdeli, distiril yapıda ve üç pozitif yüke sahip NGL-4 ile ileri hücre kültürü deneyleri yapılmasına karar verildi. Hücre akış sitometrisi ve floresan mikroskobu kullanılarak, G4-spesifik antikorlar ile NGL-4'ün hücre içinde G4 yapısına olan ilgisi incelendi. Normal oksijen seviyesine sahip normoksi ortamı ve düşük oksijen seviyesinde ortaya çıkan hipoksi ortamı taklit edilerek bu ortamlarda çeşitli kanser hücre hatlarında NGL-4'ün hücre canlılığına ve gen anlatımına olan etkisi gözlemlendi. İnsan akciğer (A546), fare melanoma (B16-F10) kanser hücre hatları ile yapılan çalışmaların yanı sıra makrofaj hücresi ve *P. aeruginosa* kullanılarak farklı ko-kültür ortamı ile tümör mikroçevresi oluşturuldu. Böylece NGL-4'in hem kanser hücresinde hem de tümör mikroçevresi içindeki kanser, makrofaj veya bakteri hücrelerinde kanser gelişimi, immün sistem tepkisi, enfeksiyon ve inflamasyon yanıtı araştırıldı.

4.5.1. Hipoksi ortamın oluşturulması

Kanser mikroçevresinin fiziksel özelliklerinden biri olan hipoksi ortamın oluşturulması için kobalt (II) klorür kullanıldı ve hipoksi ortamı taklit edildi. Öncelikle farklı derişimde (150, 200, 250 μM) ve sürede (24, 48 saat) $CoCl_2$ uygulanarak uygun doz seçildi ve sonraki hücre kültürü deneylerinde belirlenen bu doz uygulandı. Hipoksi ortamının oluştuğunun tespiti için HIF-1 α gen anlatımındaki değişim takip edildi. Sonuçlara göre A549 hücre hattında HIF-1 α gen anlatımı her deney grubunda en az 2 kat arttı. 48 saat 200 μM $CoCl_2$ uygulandığında en fazla artış (2,56 kat) gözlemlendi (Şekil 4.13).

Elde edilen bu sonuçlar dikkate alınarak, sonraki hücre kültürü deneylerinde hipoksi ortamı oluşturmak için 48 saat 200 μM CoCl_2 uygulanmasına karar verildi. B16-F10 hücre hattında ise 24 saatlik CoCl_2 uygulanmasına HIF-1 α gen anlatımı olmazken 48 saat sonunda 2 kat artış gözlemlendi. Hipoksi ortamı oluşturmak için 48 saat 150 μM CoCl_2 uygulanmasına karar verildi.

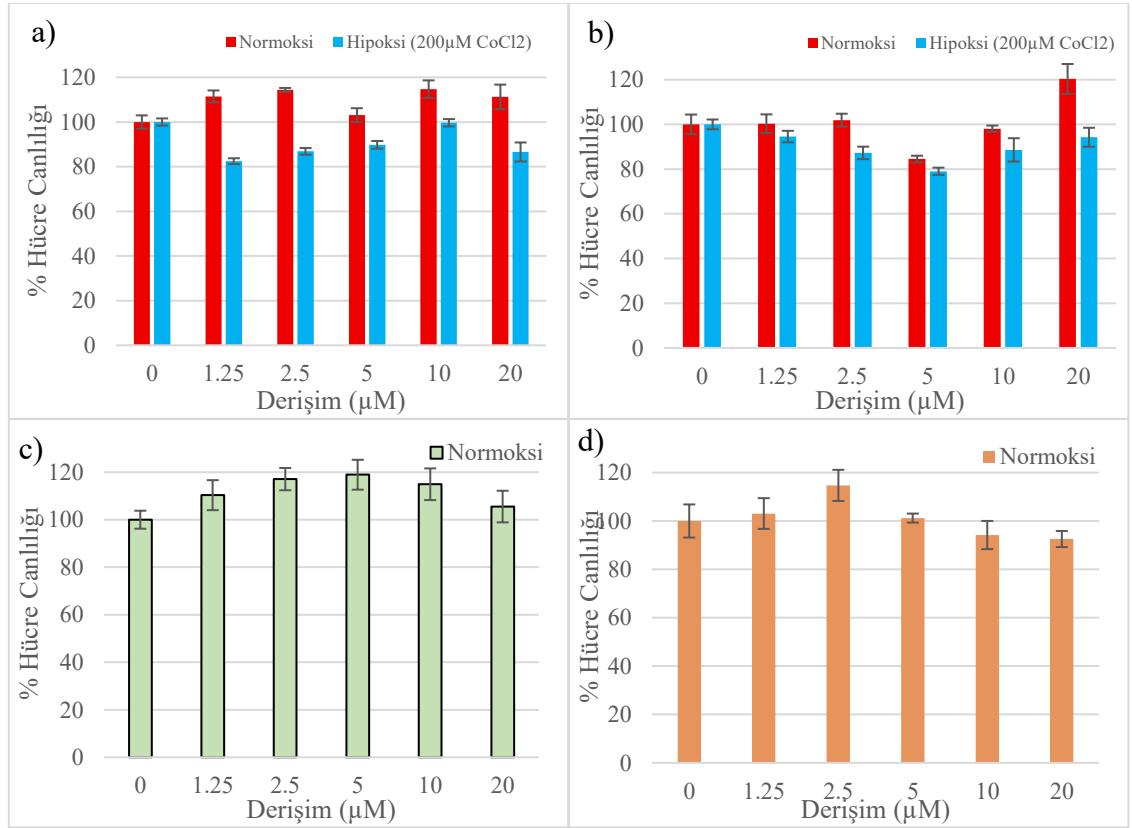


Şekil 4.13. A549 ve B16-F10 hücre hatlarında HIF-1 α gen anlatımının farklı CoCl_2 (0-250 μM) ve sürelerdeki (24 ve 48 saat) değişimi ve CoCl_2 hücre canlılıkları üzerine etkisi. a) A549 hücre hattı, b) B16-F10 hücre hattı, c) CoCl_2 uygulamasının (0-250 μM) A549 ve B16-F10 hücre canlılığına etkisi. Referans gen olarak ACT β kullanılmıştır, $n \geq 3$.

Ayrıca kobalt klorürün hücrelere sitotoksik etkisi MTT testi ile araştırıldı. Farklı derişimde (25, 100, 150, 200, 250 μM) CoCl_2 uygulanmış ve uygulanmamış örnekler 24 süreyle inkübe edildikten sonra MTT eklenerek hücre canlılığı takip edildi (Şekil 4.13). Sonuçlara göre A549 hücre hattında 150 μM ve sonraki derişimlerde %20 hücre ölümü tespit edilmesine rağmen yarı öldürücü dozu (IC_{50}) 250 μM derişimin üzerindedir. Elde edilen veriler, uygulama dozunda canlılığın büyük ölçüde korunduğunu göstermektedir.

4.5.2. NGL-4 ligandının hücre canlılığına etkisi

Üç pozitif yüklü G4 ligandı NGL-4'ün hücre canlılığına olan toksik etkisi farklı kanser hücrelerinde test edildi. A549 insan akciğer karsinoma hücre hattı ile A549- *P. aeruginosa* ko-kültürü normoksi ve 200 μM CoCl_2 ile tetiklenen hipoksi ortamında incelendi. NGL-4'ün 24 saatlik uygulama sonuçlarına göre A549 hücre hattında normoksi ortamında toksik olmadığı ve hipoksi ortamında ise normoksi ortamına göre biraz toksik olduğu belirlendi. B16-F10 fare melanoma hücre hattında ve RAW264.7 fare makrofaj hücresinde uygulanan doz aralığında toksik etki gözlenmedi. NGL-4'ün IC_{50} değeri 20 μM derişimin üzerindedir (Şekil 4.14). İleri hücre kültürü çalışmalarında FRET DNA erime testi sonuçlarında G4 yapısını kararlı tutan 5 μM derişimin kullanılmasına karar verildi.

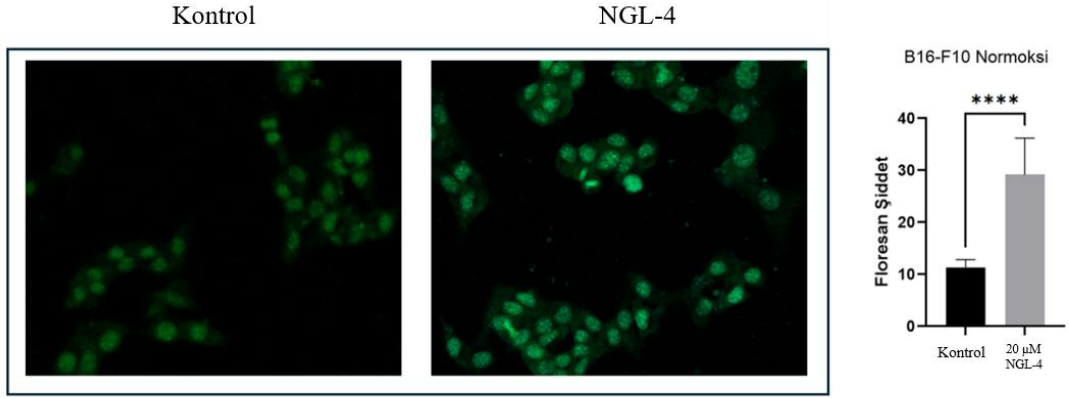


Şekil 4.14. NGL-4'ün (0-20 μM) hücre canlılığına etkisi. a) A549 hücre hattı, b) A549- *P. aeruginosa* ko-kültürü, c) B16-F16 hücre hattı, d) RAW264.7 hücre hattı. (n $\geq$ 3)

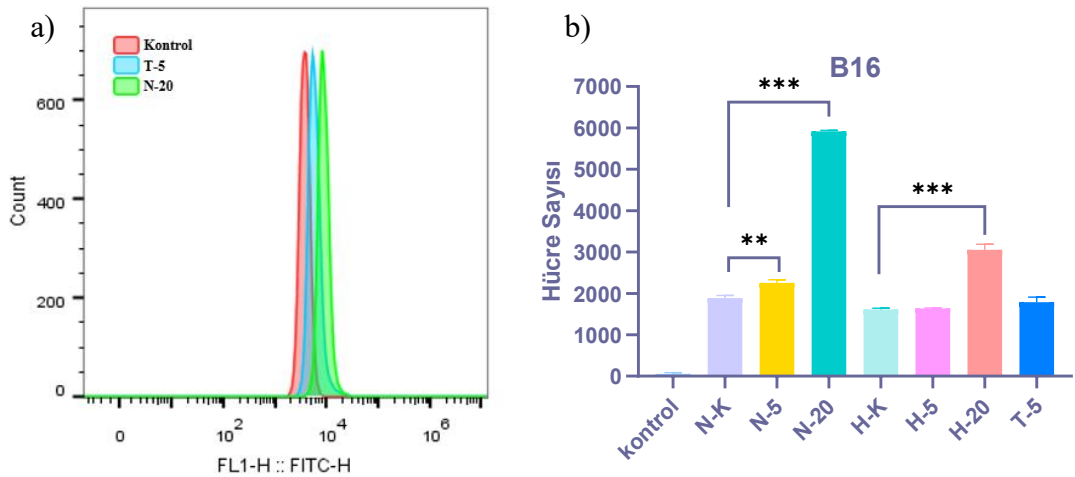
4.5.3. NGL-4 ligandının G-kuadrupleks stabilizasyonunun *in vitro* analizi

G-kuadrupleks yapısının tez çalışmasında sentezlenen BODIPY temelli ligandlarla kararlı hale geldiği daha önce FRET DNA erime ve UV-Vis absorbans değişimi testleriyle gösterildi. Bu deneylere ek olarak, anti-G4 antikoru ile floresan

mikroskobu ve akış sitometrisi yöntemleri kullanılarak hücre içinde ligandın G4 kararlılığına etkisi incelendi. Antikor uygulanmamış B16-F10 hücresi negatif kontrol ve literatürde G4 yapısına bağlandığı bilinen TMPyP4 molekülü ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlara göre, normoksi mikroçevresinde B16-F10 hücrelerinde NGL-4 uygulaması sonrası anlamlı olarak yaklaşık 3 kat floresan sinyalinde artış elde edildi (Şekil 4.15). Aynı koşullarda NGL-4'ün derişimi arttıkça G4 yapı kararlılığını arttırdığı akış sitometri analizlerinde de tespit edildi (Şekil 4.16). Bu durum NGL-4'ün hücre içine girerek G4 yapısının stabil kalmasında rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca akış sitometri analizleri değerlendirildiğinde, tez çalışmasında sentezlenen yeni BODIPY temelli NGL-4'ün aynı derişimde (5 μ M) G4 yapısına bağlandığı bilinen TMPyP4 ligandına göre normoksi ortamda G4 yapısını daha kararlı kıldığı tespit edildi.



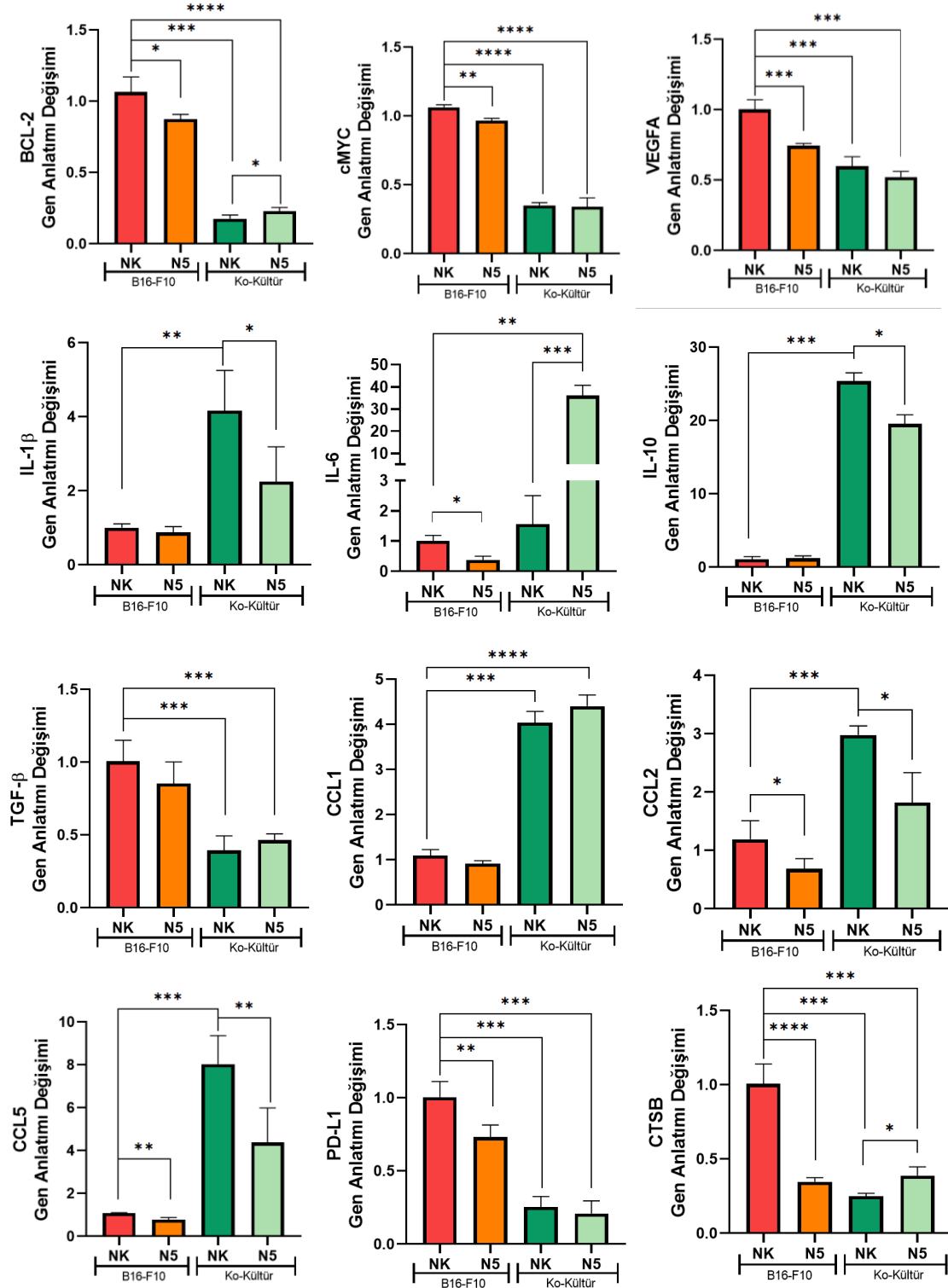
Şekil 4.15. Normoksi koşullarında B16-F10 hücre hattında NGL-4 uygulaması ile hücrede G4 yapısı oluşumunun floresan mikroskop ile analizi. Deney 20 μ M NGL-4 uygulanarak FITC etiketli Anti-G4 antikor ile gerçekleştirilmiştir.



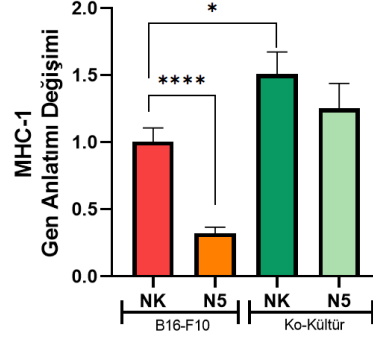
Şekil 4.16. B16-F10 hücre hattında NGL-4 (5 ve 20 μ M) ligandının G4 yapı kararlılığına olan etkisi. a) Akış sitometrisi histogramı, b) Antikor pozitif hücre sayısı. Hipoksi ortamı için 150 μ M CoCl₂ kullanıldı. Kontrol: antikor uygulanmamış örnek, N-K: normoksi kontrol, N-5: Normoksi 5 μ M NGL-4, N-20: Normoksi 20 μ M NGL-4, H-K: Hipoksi kontrol, H-5: Hipoksi 5 μ M NGL-4, H-20: Hipoksi 20 μ M NGL-4, T-5: Normoksi 5 μ M TMPyP4 (pozitif kontrol) deney gruplarını temsil etmektedir.

4.5.4. NGL-4 ligandının immün sistem üzerine etkisi

Promotör bölgesinde G4 yapısı olan BCL-2, cMYC ve VEGFA onkogenlerinin gen anlatımı incelenerek NGL-4'ün kanser gelişimindeki etkisi araştırıldı. Buna göre B16-F10 hücre hattında NGL-4 uygulanmış grupta kontrol grubuna kıyasla G4 yapısı barındıran BCL-2, cMYC ve VEGFA gen anlatımında anlamlı bir azalma meydana geldi (Şekil 4.17). Makrofaj hücresi ile ko-kültürdeki B16-F10 hücrelerinde ise değişim gözlenmedi. Pro-inflamatuar (IL-1 β , IL-6) ve anti-inflamatuar (IL-10, TGF- β) sitokinleri incelendiğinde IL-1 β , IL-10 ve TGF- β değişim olmazken, IL-6 gen anlatımında 2,7 kat azalma oldu. Ko-kültürdeki B16-F10 hücrelerinde ise IL-1 β ve IL-10 gen anlatımında sırasıyla 1,85 ve 1,3 kat azalma, IL-6 gen anlatımında 23 kat artma gözlemlendi (Şekil 4.18). Kanser gelişimi ve immün sistem düzenlenmesinden sorumlu kemokinler CCL1, CCL2 ve CCL5 kanser hücreleri tarafından tümör mikroçevresine salınarak kanser hücresinin immün sistem hücrelerinden kaçarak proliferasyonunu artırır. Ko-kültürde RAW264.7 makrofaj hücresiyle etkileşimde olan (hücresel temas olmadan ortak besiyer içinde olan) ve olmayan B16-F10 kanser hücresinde kemokin üretimi NGL-4 varlığında transkripsiyonel olarak baskılandığı gözlemlendi. T hücrelerin baskılanmasında bir kontrol noktası olarak işlev gören PD-L1/PD-1 yolağı kanser hücresinin immün sistemden kaçmasına yol açar. NGL-4 uygulanmış grupta ve ko-kültürde PD-L1 gen anlatımındaki azalma kanser hücresinin T hücresi tarafından tanınmasına ve ortadan kaldırılmasına destekleyici rol oynar. Katepsin B (CTSB), sistein proteaz enzimidir ve tümörle ilişkili proteinleri parçalayarak antijen sunumuna uygun hale getirir (Deng vd., 2022). NGL-4'ün CTSB gen anlatımını 3 kat azalttığı fakat ko-kültürdeki B16-F10 kanser hücresinde bu genin anlatımını 1,5 kat arttırdığı belirlendi. Sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin tanınmasından sorumlu membran reseptörlerinden MHC-1 gen anlatımı NGL-4 uygulamasıyla 3 kat azaldığı gözlemlendi. Bu durum, Katepsin B aşağı regülasyonu ile antijen sunumunda artmayı teşvik edebilirken MHC-I'in azalmasına bağlı olarak da kanser hücresinin sitotoksik CD8⁺ T hücresi tarafından tanınmasına engel olabilir.



Şekil 4.17. B16-F10 hücresi ve RAW264.7 ile ko-kültüründeki B16-F10 hücresinin gen anlatımı değişimi. 5 μ M NGL-4, ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).



Şekil 4.17.(devam) B16-F10 hücresi ve RAW264.7 ile ko-kültüründeki B16-F10 hücresinin gen anlatımı değişimi. 5 μ M NGL-4, ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

Fare makrofaj hücresi RAW264.7 ve B16-F10 fare melanoma hücre hattı ile indirekt ko-kültür ortamında bulunan RAW264.7 hücrelerinin NGL-4 varlığında tümör immünitesine olan etkisi transkripsiyonel olarak araştırıldı. Bu deney kuyulara yerleştirilen insertlerle hücrelerin ayırık tutularak madde alışverişinin ise yapıldığı bir ortamda gerçekleştirildi. Temas halinde olmayan, sinyal alışverişi yapabilen kanser ve makrofaj hücrelerine G4 ligandının etkisi incelendi.

MYC transkripsiyon faktörü doğrudan PD-L1 gen promotörüne bağlanarak gen anlatımını aktive eder (Nirala, 2025). NGL-4 ile elde edilen bulgular iki genin anlatımındaki değişimin korelasyon gösterdiğine işaret etmektedir. Ligand fare melanom hücresinde iki gende de az miktarda fakat istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebep olmuştur. Makrofaj hücresinin varlığı B16-F10 melanom hücresinde her iki genin de anlatımında azalmaya sebep olmuştur.

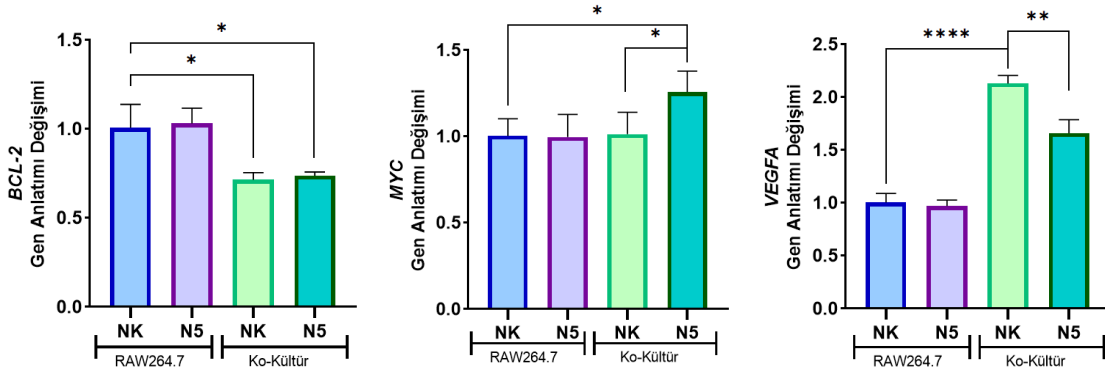
Promotör bölgesinde G-kuadrupleks yapısının olduğu bilinen BCL-2, MYC ve VEGFA onkogenlerinde RAW264.7 hücrelerinde kontrol ile deney gruplarında arasında fark görülmedi. Bu durum normal hücrelerde kanser hücrelerine kıyasla daha az G4 yapısının bulunmasından kaynaklanabilir. Ko-kültür ortamındaki RAW264.7 hücresinde NGL-4 uygulamasının MYC üzerinde 1,25 kat artış ve VEGFA üzerinde ise 1,28 kat azalış görüldü. MYC, hücre büyümesi ve farklılaşmasından sorumlu VEGFA, TGF- β , HIF-1 α gibi genleri kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. MYC gen artışına rağmen VEGFA gen anlatımındaki azalma NGL-4'ün gen anlatımındaki baskılama etkisine işaret olabilir.

Pro-inflamatuar (IL-1 β , IL-6) ve anti-inflamatuar (IL-10, TGF- β) sitokinleri ko-kültür dışındaki hücrede değişim olmazken ko-kültürdeki hücrelerde sırasıyla 1,48, 1,2, 1,5 ve 1,2 kat azalış görüldü. Makrofaj kaynaklı IL-1 β ve IL-10 azalması MDSC ve NK

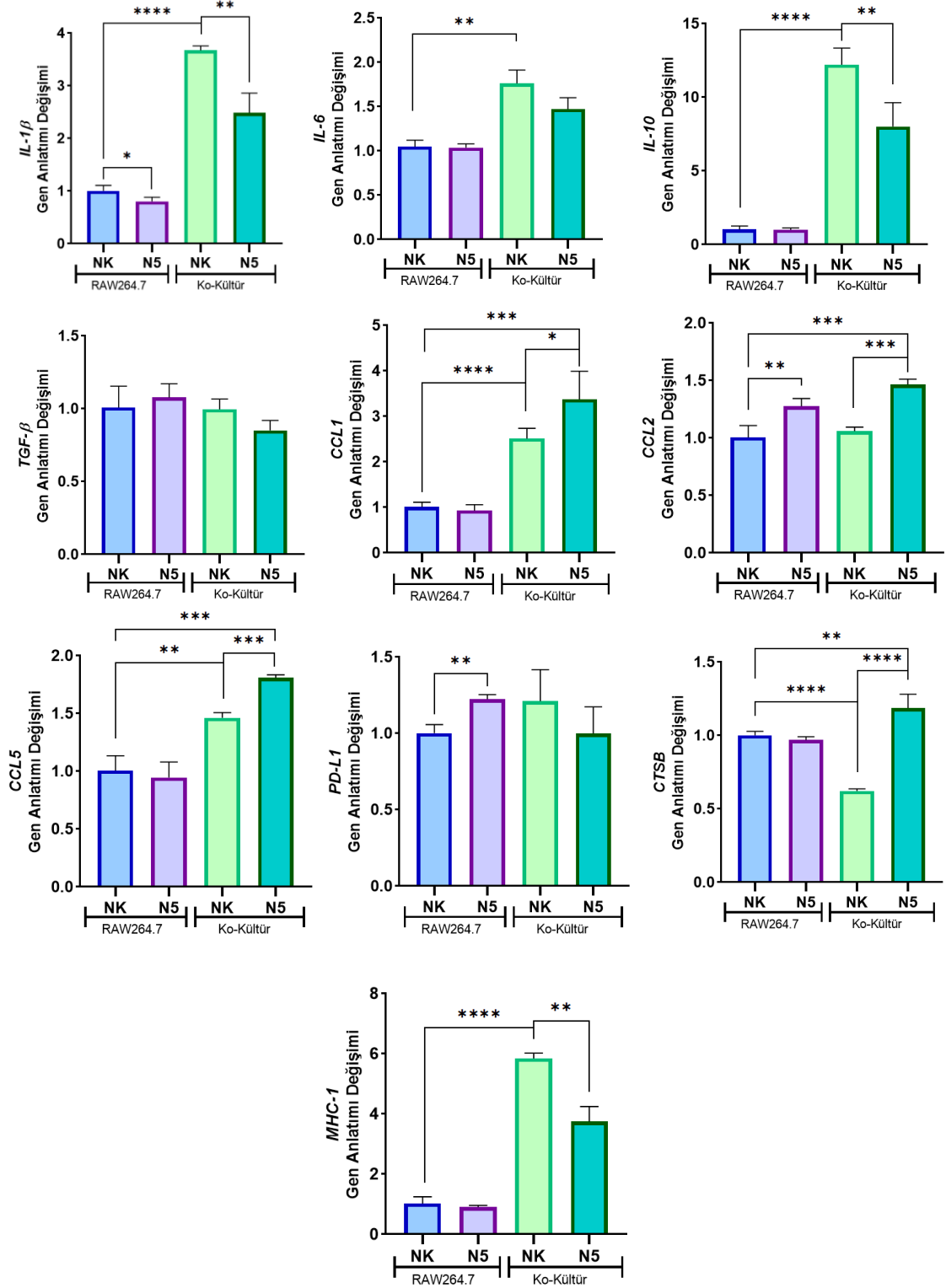
hücrelerin TMÇ'ye çekilmesini önlemeye ve sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin aktivasyonuna ve metastaz, anjiyogenezin engellenmesine yardımcı olabilir (Garlanda vd., 2025, Raskova vd., 2022).

CCL1, CCL2 ve CCL5 kemokinlerinin gen anlatımı ko-kültürdeki hücrelerde sırasıyla 1,3, 1,4 ve 1,2 kat artma görüldü. CCL gen anlatımındaki artış Treg, MDSC hücreleri gibi tümör ilerlemesini destekleyen hücrelerin TMÇ'ye çekilmesini kolaylaştırır. Makrofajların M2 polarizasyonu geçirmesine neden olur ve böylece immünbaskılamayı destekler (Kadomoto vd., 2021, Huang vd., 2020). Aynı zamanda fare mesane kanseri ve fare akciğer kanserinde yapılan çalışmalar CCL5 kemokin salgısının sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin TMÇ'ye çekilmesinde rol oynadığını göstermektedir (Sun vd., 2023, Franciszkiewicz vd., 2012). RAW 264.7 makrofajda NGL-4 ligandının kemokin sentezini artırması TMÇ'yi baskılanmış soğuk bölgeden immün aktif durumda sıcak bölgeye çevirebilen potansiyel bir immün-modülatör etki sağlayabilir.

PD-L1 membran reseptörü gen anlatımı ko-kültür dışındaki hücrede 1,2 kat artarken ko-kültür içindeki hücrede 1,2 kat azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. CTSB gen anlatımı ko-kültür dışındaki hücrede değişmezken ko-kültürdeki hücrede 2 kat artmıştır. MHC-1 gen anlatımı ise ko-kültürdeki hücrelerde 1,6 kat azalmıştır.



Şekil 4.18. RAW264.7 hücresi ve B16-F10 ile ko-kültüründeki RAW264.7 hücresinin gen anlatımı değişimi. 5 µM NGL-4, ACTβ referans gen olarak kullanıldı. (n ≥ 3).



Şekil 4.18.(devam) RAW264.7 hücresi ve B16-F10 ile ko-kültüründeki RAW264.7 hücresinin gen anlatımı değişimi. 5 μ M NGL-4, ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

4.5.5. NGL4 ligandının inflamasyon üzerine etkisi

Kanser hastalarında bağışıklık sisteminin zayıflaması onları bakteriyel veya viral enfeksiyonlara karşı hassaslaştırır ve radyoterapi, kemoterapi veya invaziv cerrahi müdahaleler patojenlere karşı dirençlerini daha da azaltır. Yapılan çalışmalar tümör içi mikroorganizmaların kanser proliferasyonuna, immünbaskılamaya veya ilaç direncine neden olduğunu göstermektedir. Fakat çoklu ilaç alımının getirdiği uygun dozun belirlenmesi, ilaç kombinasyonlarının etkileşimleri gibi sorunlarla hastanın yükünün artması tedaviye olumlu sonuç vermesini engelleyebilir. Bu durum hem antikanser hem de antimikrobiyal özelliklere sahip tek ajan geliştirilmesine olan ihtiyacı gerekli kılar. Bu ajanlar kanser gelişimini önlerken aynı zamanda ortamda bulunan patojenlerin etkisini ortadan kaldırarak kanser ve enfeksiyonun birlikte tedavi edilmesine olanak tanır. Tez kapsamında sentezlenen NGL-4'ün *P. Aeruginosa* ile oluşturulan tümör mikroçevresinde hem kanser hücresi hem de bakteri üzerindeki patojen ve inflamasyon tepkisi ilgili yollaklarda bulunan genlerin anlatımı üzerinden araştırıldı.

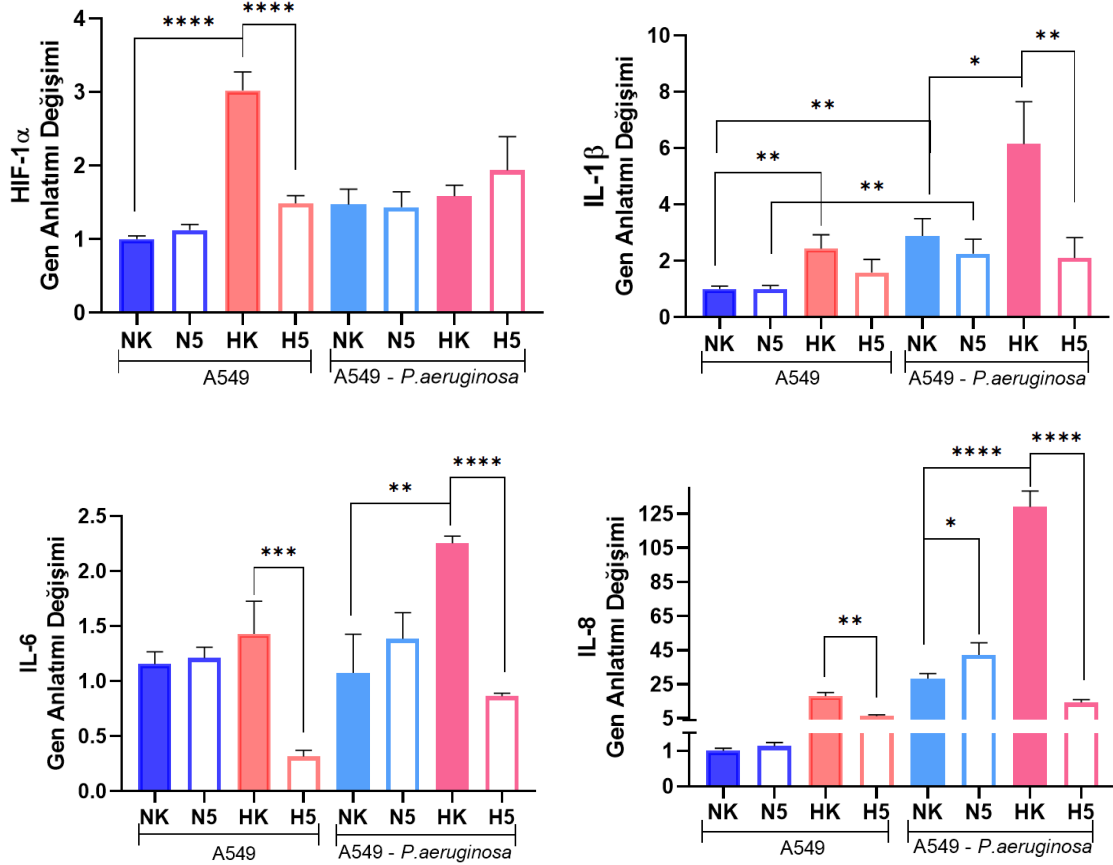
A549 insan akciğer karsinoma hücre hattı ile *P. aeruginosa* arasındaki ko-kültür normoksi ve hipoksi koşullarında ayrı ayrı incelendi. Öncelikle hipoksi ortamın belirteci olan HIF-1 α gen anlatımı hipoksi ortamında, A549 hücresinde normoksi ortama göre 3 kat arttı ve NGL-4 uygulandığında ile yaklaşık 2 kat azalışın tespit edilmesi G4 ligandının G4 DNA'yı kararlı kılarak gen anlatımını baskıladığını göstermektedir (Şekil 4.19). Fakat enteresan biçimde ligand uygulanmamış ko-kültürde normoksi ve hipoksi ortamında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi. Ko-kültürde hipoksi oluşumunun bakteri metabolizmasına bağlı olarak inhibe edilmiş olabileceği değerlendirildi (Legendre vd., 2012).

Yapılan pek çok çalışma kronik enfeksiyon ve bunun sonucunda devamlı veya durdurulamayan inflamasyonun kanser gelişimini desteklediğini göstermiştir (Mantovani, 2005). Bu durum kanser hastalarının zaten zayıflamış bağışık sistemine daha fazla stres biriktirmektedir ve tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir. NGL-4'ün inflamasyon üzerindeki etkisi pro-inflamasyon sitokinleri IL-1 β , IL-6 ve IL-8 ile yapılan mRNA seviyesindeki değişim ile gösterildi. A549 hücre hattında normoksi ortamında değişim olmazken hipoksi ortamında ciddi bir artış ve 5 μ M NGL-4 uygulamasında IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gen anlatımında sırasıyla 1,5, 4,5 ve 2,8 kat azalma tespit edildi. *P. aeruginosa* ile enfekte edilen A549 hücrelerinde ise NGL-4'ün kontrol grubuna kıyasla normoksi ortamında IL-1 β gen anlatımında azalma olurken IL-6 ve IL-8 gen anlatımında

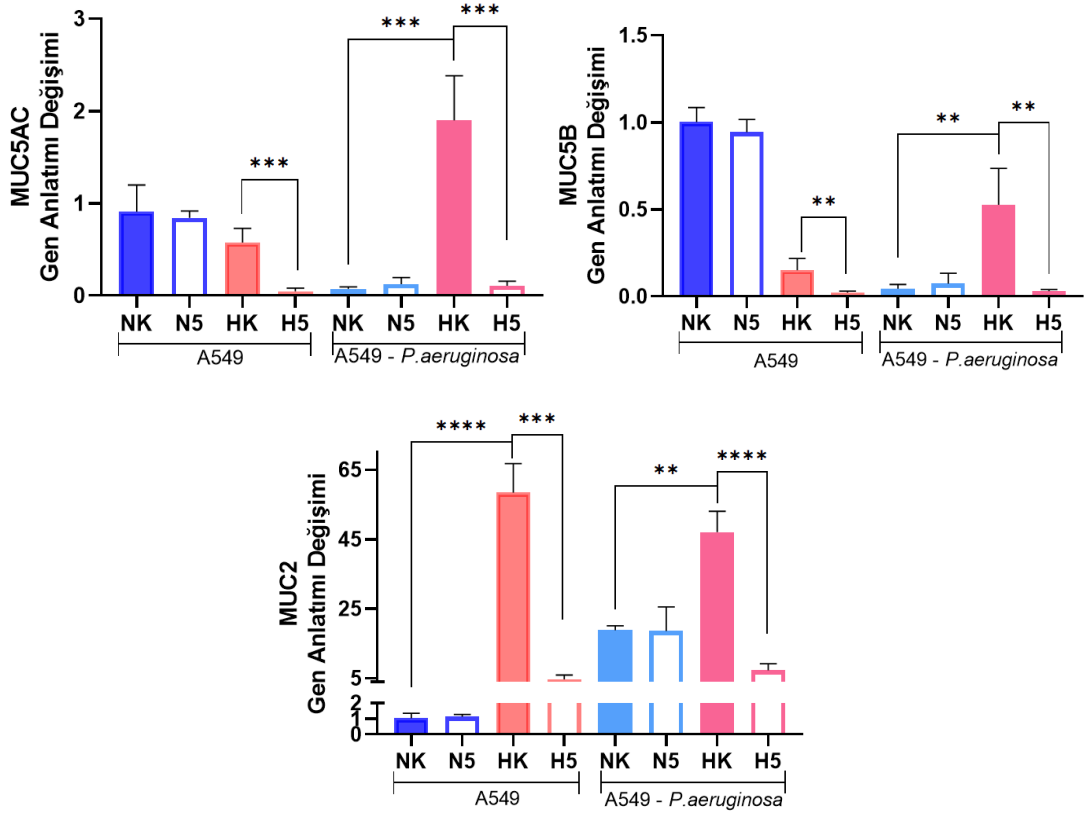
artma oldu. İnflamasyon sırasında pro-inflamasyon sitokinlerinin salgılanması ve nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) aktivasyonu HIF-1 α proteinin degradasyonunu önlemektedir (Malkov vd., 2021, Rius vd., 2008). Hipoksi ortamında pro-inflamasyon sitokinleri enfekte olan A549 hücrelerinde önemli miktarda artarken NGL-4 uygulaması ile IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gen anlatımında sırasıyla 2,9, 2,6 ve 9 kat azalma tespit edildi. Enfekte olan A549 hücrelerinde pro-inflamasyon sitokinlerinin artışı sitokin fırtınası meydana getirerek kronik inflamasyona yol açar ve kanser gelişimini destekleyebilir. Fakat NGL-4'ün sitokin fırtınasını önlemesi kronik inflamasyonu durdurma potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde CAR-T kanser terapi uygulamalarında sitokin salımını kontrol etmek için IL-6'nın hedeflenmesi ve çeşitli klinik fazlarda IL-6 baskılayıcı antikorların test ediliyor oluşu tez çalışması kapsamında elde edilen G4 ligandı uygulaması ile IL-6 baskılamasının transkripsiyonel değerini artırmaktadır (Yi vd., 2024, Kishimoto ve Kang, 2022).

Solunum, gastrointestinal yollarında bulunan epitel hücreler mukusla kaplıdır. Mukus, patojenler ve toksinlere karşı koruyucu bir bariyer sağlar. Enfeksiyon, astım, KOAH ve kistik fibrozis gibi hastalıklara mukus salgısı değişir ve hastalık takibi için bir belirteç görevi görebilir. Mukusun temel bileşenlerinden olan glikoproteinler MUC (musin) gen ailesi tarafından kontrol edilir. MUC1, MUC2, MUC5B gibi bir kısım musinin farklı kanserlerde anlatımında değişim olduğu saptanmıştır. MUC2 artışının enfeksiyonu artırarak inflamasyona bağlı kanser gelişimini tetikleyebileceği, artan musin katmanının immunoterapötik ilaçların etkisini azaltabileceği düşünülmektedir (Kufe, 2009). Ligandların musin yolağına olan etkisini anlamak maksadıyla *P. aeruginosa* ile enfekte olan ve olmayan A549 kanser hücrelerinde MUC5AC, MUC5B ve MUC2 gen anlatımındaki değişim incelendi. Enfekte olmayan A549 kanser hücrelerinde normoksi ortamında değişim olmazken hipoksi ortamında MUC5AC ve MUC5B gen anlatımında 5 μ M NGL-4'ün etkisiyle anlamlı azalma vardır. MUC2 gen anlatımında hipoksi kontrol grubunda normaksi kontrol grubuna kıyasla 58,45 kat artış varken NGL-4 grubunda bu artış 12,4 kat azalarak MUC2 gen anlatımı baskılanmıştır. *P. aeruginosa* ile enfekte olan A549 kanser hücrelerinde ise normoksi grubunda enfekte olmayan A549 kanser hücrelerindeki gibi değişim olmazken hipoksi kontrol grubunda MUC5AC, MUC5B ve MUC2 gen anlatımında sırasıyla 26,6, 11,7 ve 2,4 kat artış vardır (Şekil 4.19). NGL-4 uygulanmış deney gruplarında MUC5AC, MUC5B ve MUC2 gen anlatımında sırasıyla 18, 17,6 ve 6,45 kat azalma gözlemlendi. Sonuçlara göre NGL-4 musin üretimini transkripsiyonel düzeyinde önemli ölçüde baskılamıştır. Enfeksiyon, astım, kronik

bronşit ve kistik fibröz gibi aşırı mukus üretimine neden olan hastalıklarda mukus miktarının azaltılması ve bu sayede ilaç penetrasyonunun artmasına NGL-4'ün yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde kanser ilaçlarının etkinliğini artırma, enfeksiyona bağlı kanser gelişimindeki artışın engellenme potansiyeli mevcuttur. Ayrıca sitokinlerin musin sentezini tetiklediği çalışmalar literatürde bulunur (Chen vd., 2003, Song vd., 2003). Bu tez çalışmasında da normoksi koşula kıyasla hipoksi koşulda *P. aeruginosa* ile enfekte olan A549 kanser hücresinde IL-1 β , IL-6 ve IL-8 sitokinleri ve MUC5AC, MUC5B ve MUC2 musinlerinin gen anlatımı artmış ve NGL-4 uygulaması bu artışı baskılamıştır.



Şekil 4.19. *P. aeruginosa* ile enfekte olan ve olmayan A549 hücre hattında NGL-4 ligandının gen anlatımına etkisi. NK: Normoksi kontrol; N5: Normoksi 5 μ M NGL-4; HK: Hipoksi kontrol; H5: Hipoksi 5 μ M NGL-4 deney gruplarını temsil etmektedir. Ko-kültür içindeki A549 hücreleri 4 saat *P. aeruginosa* ile enfekte edildi. ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

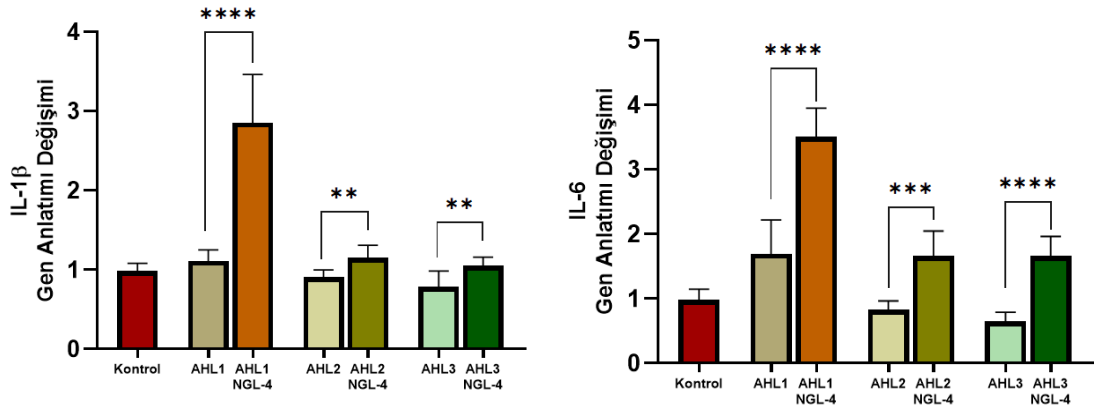


Şekil 4.19.(devam) *P. aeruginosa* ile enfekte olan ve olmayan A549 hücre hattında NGL-4 ligandının gen anlatımına etkisi. NK: Normaksi kontrol; N5: Normoksi 5 μ M NGL-4; HK: Hipoksi kontrol; H5: Hipoksi 5 μ M NGL-4 deney gruplarını temsil etmektedir. Ko-kültür içindeki A549 hücreleri 4 saat *P. aeruginosa* ile enfekte edildi. ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

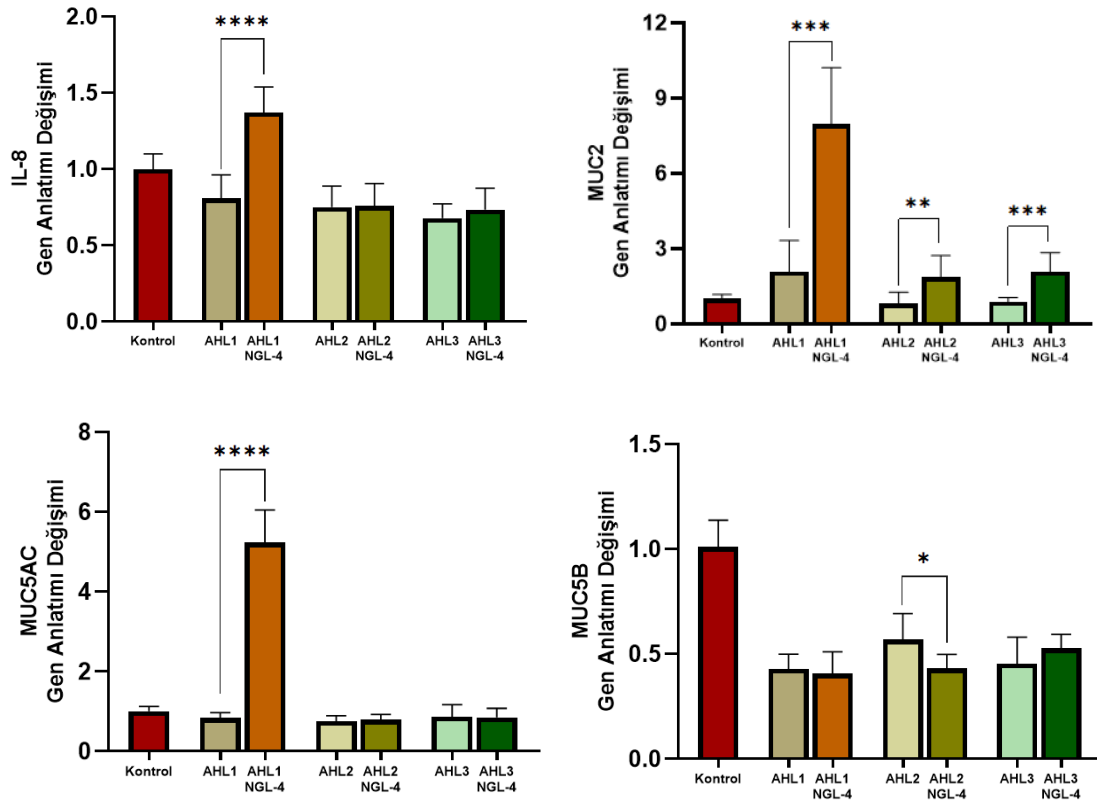
4.5.6. NGL-4 ligandının quorum sensing üzerindeki etkisi

Quorum sensing (çoğunluk algılama), bakteriler arasındaki otoindükleyici adı verilen moleküller aracılığıyla yönetilen bir haberleşme yöntemidir. Bakteri popülasyonu arttıkça ortamda otoindükleyiciler birikir ve bunun sonucunda bakteri popülasyonu senkronize hareket etmeye başlayarak virülans faktörlerin sentezi, biofilm oluşumu, spor oluşumu, antibiyotik direncinin gelişmesi meydana gelir (Rutherford vd., 2012). Gram-negatif bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* otoindükleyici molekül olarak açıl-homoserin laktonlar (AHL) kullanır ve ortamda AHL birikimi quorum sensing tetikler. Tez çalışmasının bu bölümünde A549 insan akciğer karsinoma hücre hattı ile *P. aeruginosa* ko-kültürüne dört-karbonlu (AHL1), altı-karbonlu (AHL2) ve sekiz-karbonlu (AHL3) açıl-homoserin laktonları eklenerek quorum algılama tetiklendi. Daha sonra bu koşullarda NGL-4 uygulanarak NGL-4-ün quorum algılama üzerindeki etkisi araştırıldı (Şekil 4.20).

P. aeruginosa ile enfekte olan A549 hücreleri incelendiğinde IL-1 β gen anlatımında sadece AHL'lerin etki etmediği, AHL'ler ile eş zamanlı NGL-4 uygulamasının ise AHL1'de 2,8 kat artış olduğu gözlemlendi. IL-6 gen anlatımında AHL1'in artırdığı, AHL2 ve AHL3'ün azalttığı, eş zamanlı NGL-4 uygulamasının ise bütün gruplarda artışa sebep olduğu görülmüştür. Özellikle AHL1'de 3,5 kat artış olduğu belirlendi. IL-8 gen anlatımını AHL1 ve NGL-4 uygulanmış örnekte 1,4 kat arttığı ve diğer gruplarda az bir düşüş olmasına rağmen NGL-4'ün bu genin anlatımına etkisi olmadı. Mukus sentezinden sorumlu genlerden MUC2 ve MUC5AC anlatımı AHL1 ve NGL-4 uygulanmış örnekte sırasıyla 8 ve 5 kat artmıştır. MUC5B gen anlatımını ise AHL'lerin en az 2 kat azalttığı ama NGL-4'ün etkisinin olmadığı görüldü. Sonuç olarak dört-karbonlu AHL1 ile tetiklenmiş quorum sensing sonucu A549 hücresinde NGL-4 varlığı pro-inflamatuvar sitokinlerin ve musin sentezinden sorumlu genlerin anlatımını arttırdığı belirlendi. Bu sayede NGL-4'ün quorum algılama sinyal bileşiklerinin fazla olduğu (bakteri yükünün fazla olduğu) durumda enfeksiyona karşı koruyucu bir rolü olabileceği düşünülmektedir. AHL1 varlığında NGL-4, musin üretimini destekleyerek fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır.



Şekil 4.20. *P. aeruginosa* ile enfekte olan A549 hücrelerinde gen anlatımı değişimi. A549 hücreleri 4 saat *P. aeruginosa* ile enfekte edildi. 5 μ M derişimde AHL1, AHL2, AHL3 ve NGL-4 uygulandı. ACT β referans gen olarak kullanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları istatistiksel olarak anlamlıdır. (n $\geq$ 3).

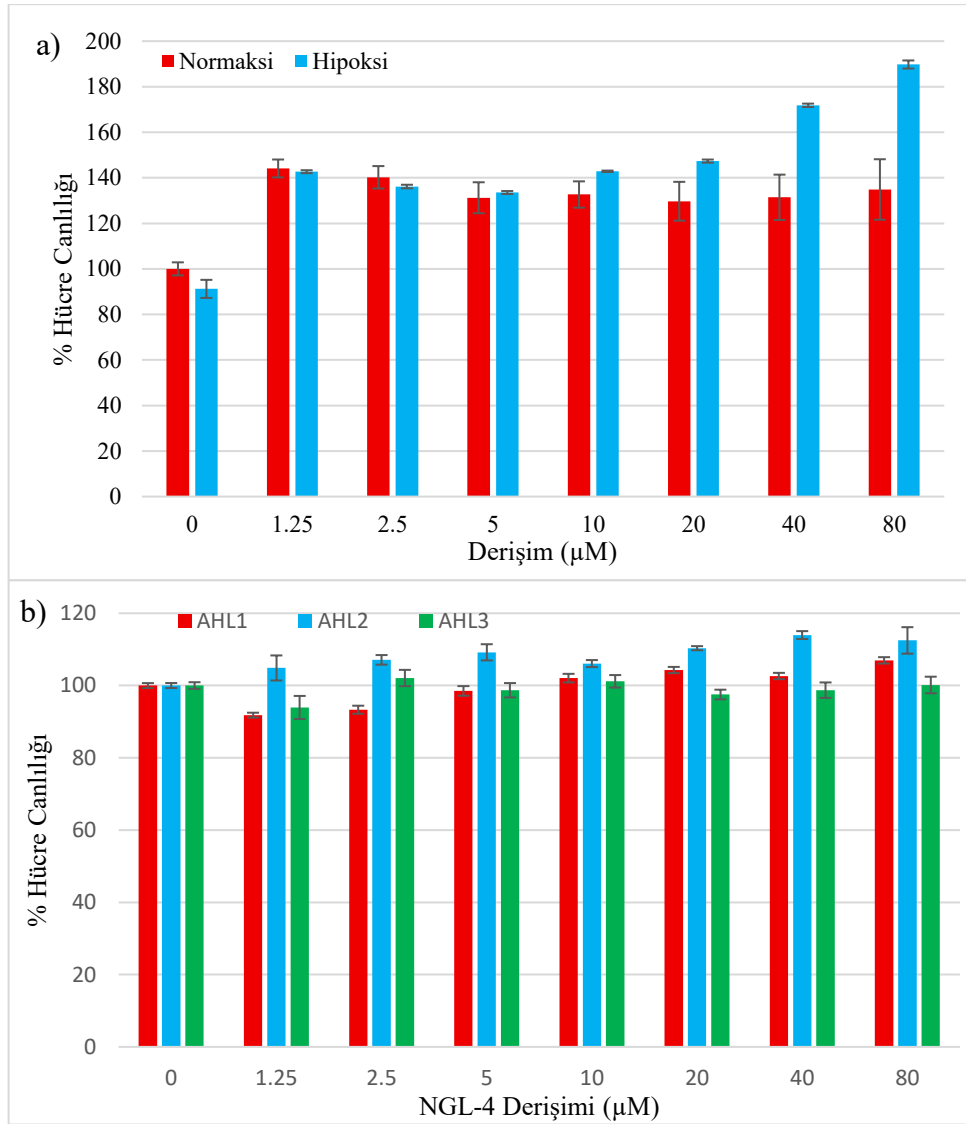


Şekil 4.20.(devam) *P. aeruginosa* ile enfekte olan A549 hücrelerinde gen anlatımı değişimi. A549 hücreleri 4 saat *P. aeruginosa* ile enfekte edildi. 5 μ M derişimde AHL1, AHL2, AHL3 ve NGL-4 uygulandı. ACT β referans gen olarak kullanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları istatistiksel olarak anlamlıdır. (n $\geq$ 3).

4.5.7. NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'un canlılığına etkisi

NGL-4 ligandının *P. Aeruginosa*'nın canlılığı minimum inhibisyon derişimi (MIC) ile belirlendi. Bunun için farklı derişimlerde NGL-4, bakteri kültürüne eklendi ve absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlara göre NGL-4'ün *P. aeruginosa* üzerinde toksik etkisi bulunmamaktadır (Şekil 4.21).

Ayrıca AHL molekülleri ile quorum sensing tetiklenen bakteri kültüründe de NGL-4'ün toksisite üzerine etkisi araştırıldı. Bileşiğin toksik etkisi gözlenmedi.

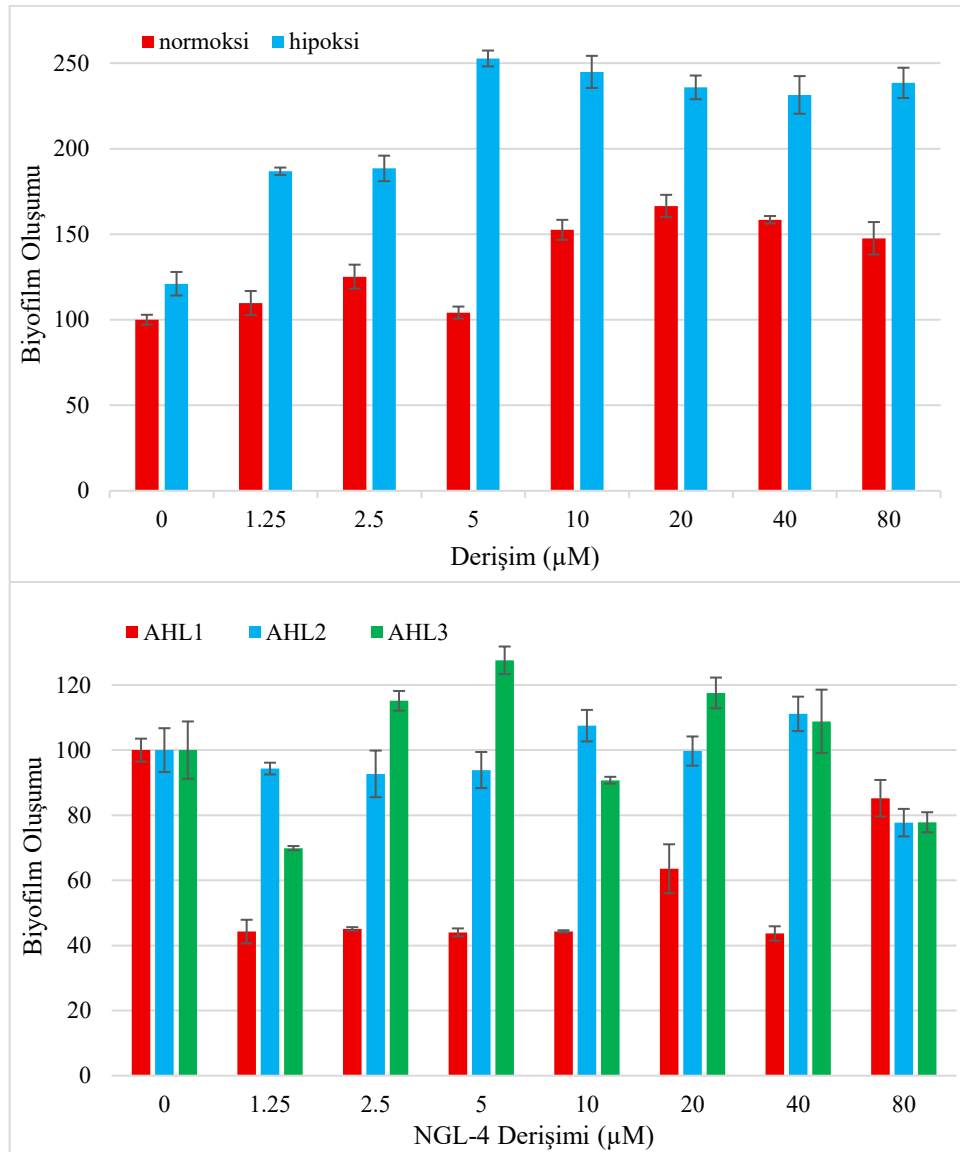


Şekil 4.21. NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'da hücre canlılığına etkisi. 200 µM CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturuldu. a) Normoksi ve hipoksi ortamında NGL-4'ün bakteriyeye doza bağlı sitotoksik etkisi; b) AHL bileşiklerinin varlığında NGL-4'ün bakteriyeye doza bağlı sitotoksik etkisi.

4.5.8. NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'da biyofilm ve piyosiyanın oluşturması

Biyofilmler kendi ürettikleri hücre dışı polimerik madde matriksi içinde yaşayan yüzeye tutunmuş veya tutunmamış halde bulunabilen mikroorganizma topluluğudur. Serbest halde olan mikroorganizmalara kıyasla biyofilmlerin hızlı çoğalma, antibiyotik direnci, quorum sensing gibi avantajları vardır. *P. aeruginosa* biyofilmleri kronik akciğer hastalarında, kistik fibrözde ilerleyen akciğer hasarına yol açarak solunum yetmezliğine neden olabilir. İnflamatuvar etkiye sahip NGL-4'ün *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumundaki etkisi farklı derişimlerde incelendi. Sonuçlara göre normoksi ve hipoksi koşullarında biyofilm oluşumunda artış olmuştur. 5 µM AHL ile tetiklenmiş kültürlerindeki farklı derişimlerde NGL-4 uygulanmış örneklerde ise 4 karbonlu

AHL1'in biyofilm oluşumunu azaltırken AHL2 ve AHL3'ün biyofilm oluşumunu artırmıştır.

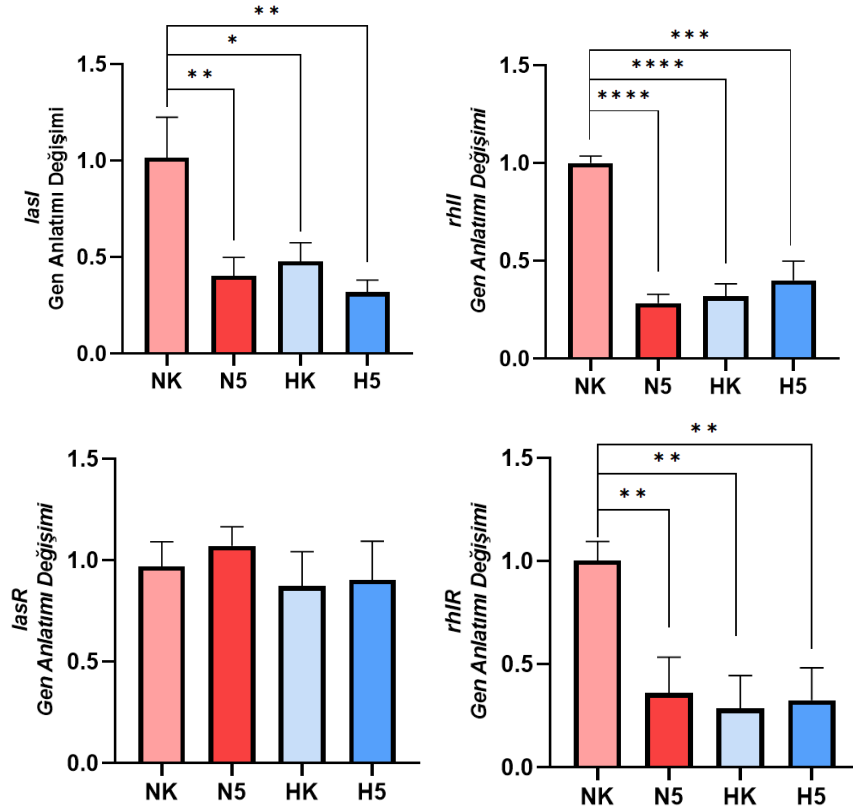


Şekil 4.22. NGL-4 ligandının tek başına (üst resim) ve AHL varlığında (alt resim) *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu. 200 μM CoCl_2 ile hipoksi ortam oluşturuldu.

4.5.9. NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'da gen anlatımına etkisi

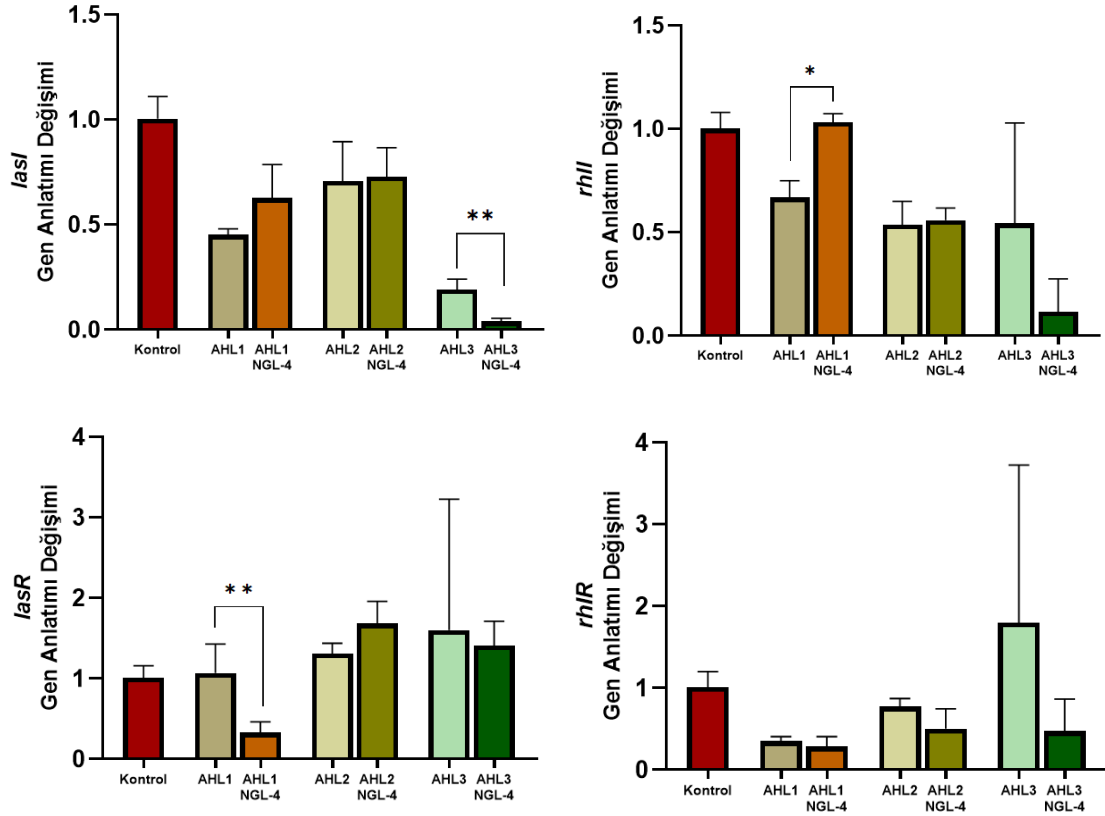
Gram-negatif bakterilerden biri olan *P. aeruginosa*'da quorum sensing açıl homoserin lakton (AHL) veya *S*-adenosilmetiyonin (SAM) molekülleri aracılığıyla gerçekleşebildiği bilinmektedir. Bakteride AHL sentezi LasI, RhII ve PqsABCDH sentetazlar tarafından sentezlenir. Daha sonra sentezlenen AHL'ler LasR, RhIR ve PqsR sitoplazmik transkripsiyon faktörleri tarafından algılanarak hem AHL sentetazların hem de büyüme, biyofilm oluşumu, antibakteriyel direnç genlerinin anlatımını artırır

(Rutherford ve Bassler, 2012). Quorum sensingin inhibisyonu için AHL sentetazların ve reseptörlerinin baskılanması *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı terapötik bir yaklaşım sunar. Bunun için NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'da quorum sensing ilişkili genlerin anlatımına etkisi araştırıldı. Normoksi ortamda NGL-4 uygulaması *lasI*, *rhII* ve *rhIR* gen anlatımını anlamlı bir şekilde sırasıyla 2,5, 3,5 ve 2,7 kat baskılamıştır. Fakat hipoksi ortamda değişim görülmemiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. NGL-4 ligandının *P. aeruginosa*'da quorum sensing gen anlatımına etkisi. 200 μ M CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturuldu. NK: normoksi kontrol, N5: normoksi 5 μ M NGL-4, HK: hipoksi kontrol, H5: hipoksi 5 μ M NGL-4. Referans gen olarak *proD* ve *rpsL* kullanıldı. (n $\geq$ 3).

Farklı karbon sayılarına sahip AHL molekülleri ile quorum sensin tetiklendi ve NGL-4'ün etkisi ayrıca incelendi. Sonuçlara göre dört karbonlu AHL1 varlığında *lasI*, *rhII* sentetazların anlatımı azalırken NGL-4 uygulaması gen anlatımını artırmıştır. Fakat *lasR* transkripsiyon faktörünün anlatımı 3,3 kat azalmıştır. Altı karbonlu AHL2 ve NGL-4 varlığında anlamlı bir değişim görülmedi. Sekiz karbonlu AHL3 ve NGL-4 varlığında *lasI* gen anlatımı 4,8 kat azalmıştır (Şekil 4.24). AHL3 uygulanmış bakterilerde *rhII*, *lasR* ve *rhIR* değişimi yüksek standart sapma nedeniyle analiz edilememiştir.



Şekil 4.24. NGL-4 ligandının ve AHL moleküllerinin *P. aeruginosa*'da quorum sensing gen anlatımına etkisi. Referans gen olarak *proD* ve *rpsL* kullanıldı. (n ≥ 3).

4.5.10. Transkriptom analizi

Üç pozitif yüklü G-kuadrupleks ligandının hücresel etkilerinin araştırılması amacıyla RNA-dizileme kullanılarak genel transkriptom analizi gerçekleştirildi. Bunun için normoksi ortamında B16-F10 hücre hattına NGL-4 molekülü 5 ve 20 μ M derişimde uygulandıktan sonra total RNA izolasyonu yapıldı. Gen anlatımı analizi RefGen firmasından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. B16-F10 hücresinde kontrol ve 5 μ M NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren ilk 15 geni içeren direransiyel ekspresyon analizi.

Gene	Kontrol	N5	LogFC	P Değeri	FDR
Gadd45g ENSMUSG00000021453	16.02 ($\pm$ 0.9)	28.51 ($\pm$ 5.1)	0.89 ▲	4.18×10^{-4}	6.75×10^{-1}
Nppb ENSMUSG00000029019	16.29 ($\pm$ 0.3)	30.20 ($\pm$ 6.2)	0.95 ▲	4.48×10^{-4}	6.75×10^{-1}
Mt2 ENSMUSG000000031762	264.28 ($\pm$ 11.0)	349.78 ($\pm$ 43.8)	0.47 ▲	4.94×10^{-4}	6.75×10^{-1}
Gbf1 ENSMUSG000000025224	90.81 ($\pm$ 4.3)	61.06 ($\pm$ 11.1)	-0.51 ▼	5.50×10^{-4}	6.75×10^{-1}
Huwei1 ENSMUSG000000025261	80.83 ($\pm$ 2.2)	54.07 ($\pm$ 10.8)	-0.51 ▼	6.73×10^{-4}	6.75×10^{-1}
Lsm4 ENSMUSG000000031848	125.55 ($\pm$ 7.5)	160.62 ($\pm$ 9.8)	0.42 ▲	9.14×10^{-4}	6.75×10^{-1}
PspH ENSMUSG000000029446	46.34 ($\pm$ 0.9)	63.30 ($\pm$ 8.6)	0.52 ▲	1.24×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Cnot1 ENSMUSG000000036550	150.95 ($\pm$ 5.8)	104.58 ($\pm$ 20.8)	-0.46 ▼	1.33×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Nme1 ENSMUSG000000037601	213.35 ($\pm$ 15.1)	262.36 ($\pm$ 12.5)	0.37 ▲	1.36×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Gpx4 ENSMUSG000000075706	96.30 ($\pm$ 2.8)	121.42 ($\pm$ 8.8)	0.40 ▲	1.47×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Bax ENSMUSG000000003873	456.37 ($\pm$ 0.8)	539.25 ($\pm$ 22.4)	0.31 ▲	1.65×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Ndufs5 ENSMUSG000000028648	85.73 ($\pm$ 7.0)	107.24 ($\pm$ 5.4)	0.39 ▲	1.73×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Rps10 ENSMUSG000000052146	144.21 ($\pm$ 2.7)	174.80 ($\pm$ 11.6)	0.34 ▲	1.86×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Sucla2 ENSMUSG000000022110	147.99 ($\pm$ 7.1)	172.67 ($\pm$ 6.9)	0.29 ▲	1.91×10^{-3}	6.75×10^{-1}
Mrpl17 ENSMUSG000000030879	149.97 ($\pm$ 9.6)	174.57 ($\pm$ 9.4)	0.29 ▲	2.03×10^{-3}	6.75×10^{-1}

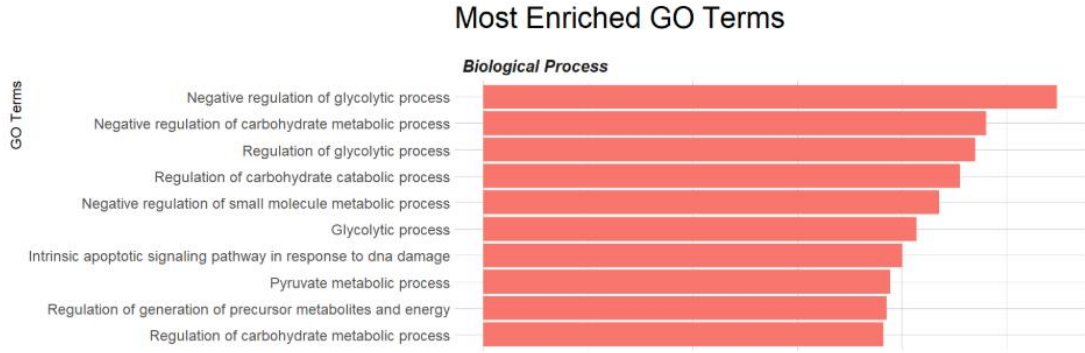
Kontrol ve 20 μ M NGL-4 arasındaki transkriptom sonucuna bakıldığında IER3 (Immediate Early Response 3) ve DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4) genlerinde anlamlı bir düşüş olmuştur (Çizelge 4.4). IER3, strese duyarlı bir gendir ve proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, DNA onarımı gibi hücre tipine bağlı olarak farklı yanıt yollarında işlevlidir (Kanduri vd., 2025). DDIT4, hücre büyümesi, yaşlanması, otofaji ve tümorigenesisden sorumludur ve ayrıca anlatımındaki artış pro-apoptotik proteinlerin baskılanmasına neden olur. Genel sonuçlara bakıldığında enerji metabolizması, PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağı, otofaji süreçlerine ait genlerde anlamlı bir azalma görülmüştür.

Çizelge 4.4. B16-F10 hücresinde kontrol ve 20 µM NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren ilk 15 geni içeren direransiyel ekspresyon analizi.

Gene	Kontrol	N20	LogFC	P Değeri	FDR
Ier3 ENSMUSG00000003541	177.56 (±4.7)	119.76 (±8.0)	-0.57 ▼	9.69×10^{-7}	** 6.03×10^{-3}
Ddit4 ENSMUSG000000020108	177.21 (±1.5)	122.62 (±7.9)	-0.53 ▼	1.57×10^{-6}	** 6.03×10^{-3}
ND2 ENSMUSG000000064345	2760.73 (±105.7)	3461.24 (±135.4)	0.32 ▲	3.63×10^{-5}	7.46×10^{-2}
Asns ENSMUSG000000029752	184.47 (±10.8)	240.90 (±6.9)	0.38 ▲	3.88×10^{-5}	7.46×10^{-2}
Mxd4 ENSMUSG000000037235	81.70 (±9.0)	45.62 (±6.7)	-0.84 ▼	5.13×10^{-5}	7.89×10^{-2}
Ankrd37 ENSMUSG000000050914	52.41 (±7.5)	30.50 (±1.6)	-0.78 ▼	6.27×10^{-5}	8.05×10^{-2}
PspH ENSMUSG000000029446	46.34 (±0.9)	70.16 (±1.0)	0.59 ▲	1.39×10^{-4}	1.53×10^{-1}
Selenbp1 ENSMUSG000000068874	86.05 (±7.3)	58.66 (±7.1)	-0.56 ▼	2.56×10^{-4}	2.47×10^{-1}
Mt2 ENSMUSG000000031762	264.28 (±11.0)	316.49 (±15.3)	0.26 ▲	3.45×10^{-4}	2.95×10^{-1}
Ptms ENSMUSG000000030122	598.60 (±9.2)	507.44 (±28.2)	-0.24 ▼	4.49×10^{-4}	3.46×10^{-1}
Ccl5 ENSMUSG000000035042	26.75 (±2.3)	14.17 (±0.9)	-0.91 ▼	5.65×10^{-4}	3.96×10^{-1}
Gapdhrt2 ENSMUSG0000000110469	292.34 (±14.9)	241.95 (±10.2)	-0.28 ▼	7.24×10^{-4}	4.64×10^{-1}
Cars1 ENSMUSG000000010755	119.96 (±14.5)	156.19 (±9.8)	0.38 ▲	9.11×10^{-4}	5.08×10^{-1}
Sqstm1 ENSMUSG000000015837	944.21 (±12.0)	1074.89 (±50.8)	0.18 ▲	9.24×10^{-4}	5.08×10^{-1}
Nars1 ENSMUSG000000024587	287.46 (±14.1)	334.37 (±12.4)	0.21 ▲	1.38×10^{-3}	7.11×10^{-1}

Çizelge 4.5. B16-F10 hücresinde kontrol ve 20 µM NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki en anlamlı değişkenlik gösteren yollar.

Yol	Gen Oranı	P Değeri	FDR
mTOR signaling pathway - Mus musculus (house mouse) mmu04150	1/158	1.48×10^{-2}	* 3.12×10^{-2}
Autophagy - animal - Mus musculus (house mouse) mmu04140	1/167	1.56×10^{-2}	* 3.12×10^{-2}
MicroRNAs in cancer - Mus musculus (house mouse) mmu05206	1/314	2.94×10^{-2}	* 3.44×10^{-2}
PI3K-Akt signaling pathway - Mus musculus (house mouse) mmu04151	1/368	3.44×10^{-2}	* 3.44×10^{-2}



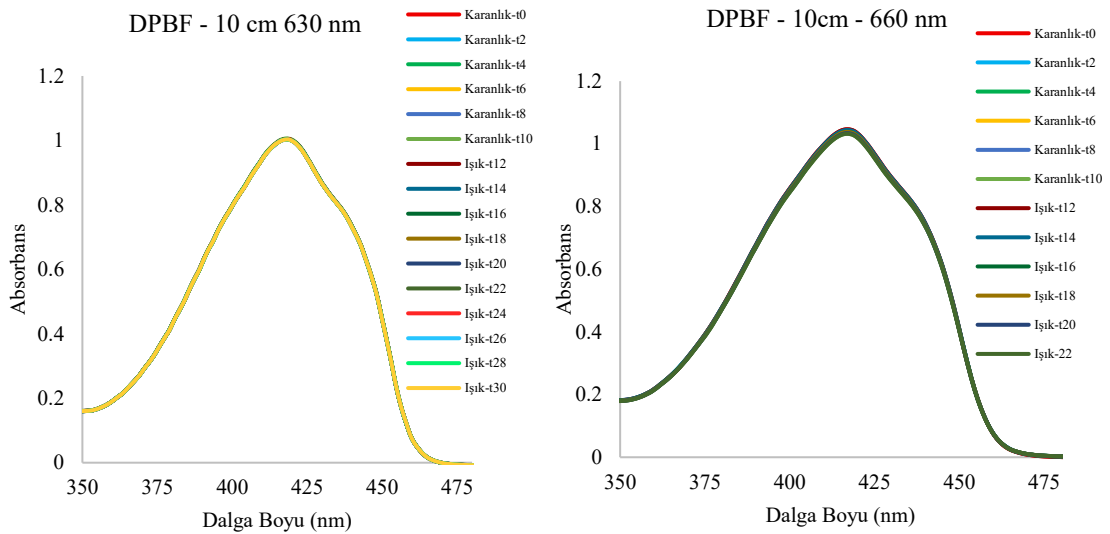
Şekil 4.25. B16-F10 hücrelerinde kontrol ve 20 μ M NGL-4 uygulanmış örnek arasındaki gen ontoloji terimlerinin bulunduğu biyolojik süreçler.

4.6. Hipoksi Ortamda Aktifleşen ve Fotoduyarlaştırıcı Ligand: NGL-5

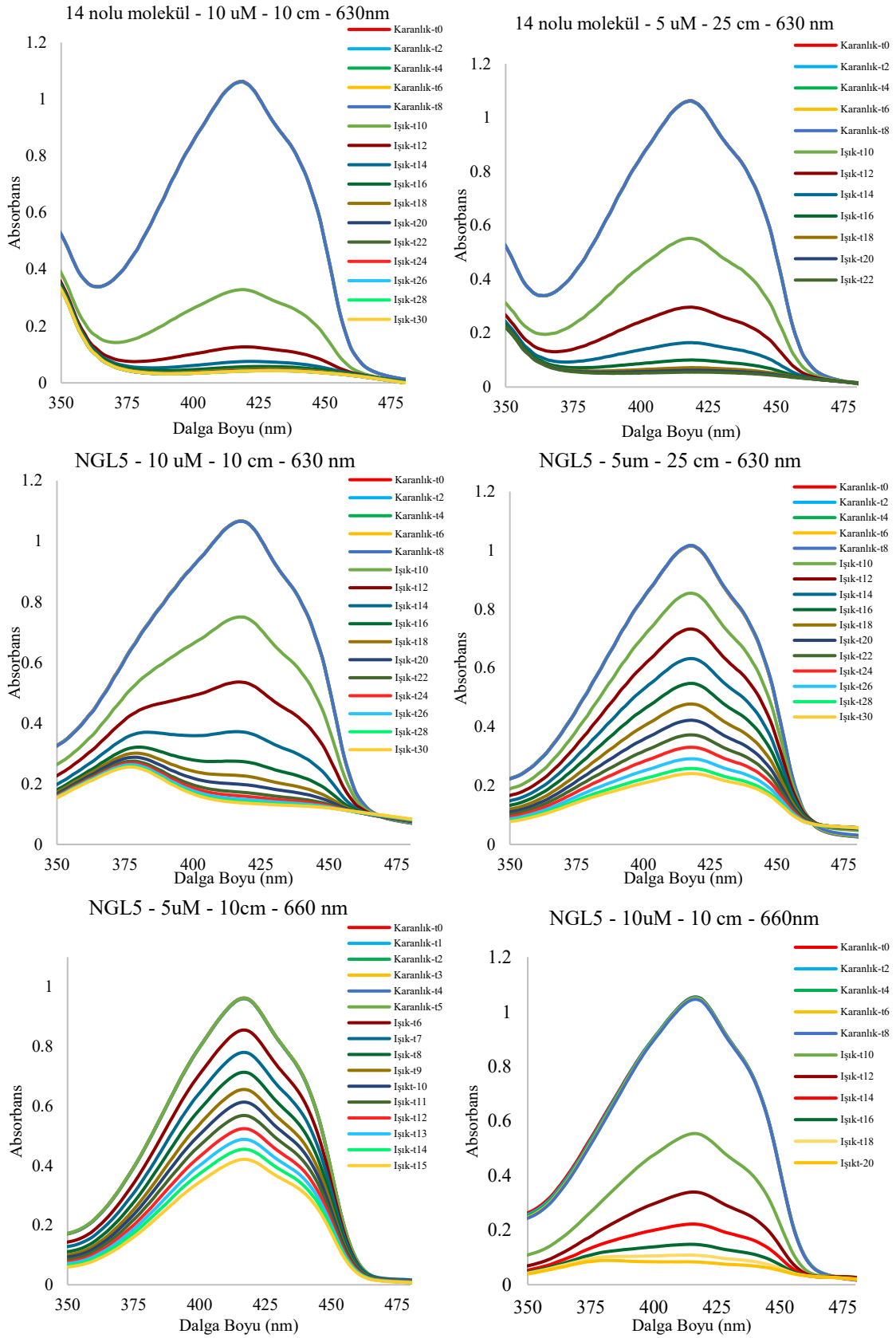
Hipoksi ortamı, tümör mikroçevresinde düşük oksijen seviyesine bağlı ortaya çıkar. Hipoksiye maruz kalan hücrede başta HIF-1 α olmak üzere bir dizi genin anlatımı başlar ve böylece hücre hipoksik strese uyum sağlayarak hayatta kalır. HIF-1 α aracılığıyla gerçekleşen agresif fenotipe karşı hipoksi, hücre döngüsünü yavaşlatabilir ve proliferasyon yavaşlar (Li vd., 2008). Tümör tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlar genellikle proliferasyon oranı yüksek hücrelerde etkili olduğu için hipoksi ortamdaki hücreler bu ajanlara karşı duyarsızdır. Bu nedenle hipoksik tümör hücrelerini seçici olarak hedef alan ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla tez çalışmada hipoksi ortamına duyarlı nitrobenzil birimine sahip G-kuadrupleks ligandı geliştirilerek hipoksik tümör hücreleri hedeflendi. Sentezlenen BODIPY ana gövdeli NGL-5'teki nitrobenzil birimi redüktaz enzimleri tarafından indirgenerek ana gövdeden ayrılır ve ligand G4 yapısına bağlanmaya daha elverişli bir konformasyonda bulunarak aktifleşir (Şekil 3.2a). Ayrıca BODIPY gövdesini 2,6 karbon grubuna bağlı bulunan iyot atomu sistemler arası geçişi artırarak, uygun ışık varlığında uyarılarak singlet oksijen üretimini sağlar ve DNA hasarına neden olması beklenmektedir. Bu G4 ligandı ile literatüre hem hipoksi ortamda aktifleşen hem de uygun ışığa duyarlı yeni bir BODIPY temelli G4 ligandı kazandırılması hedeflenmiş ve kanser gelişimine olan etkisi araştırılmıştır.

4.6.1. Singlet oksijen üretiminin belirlenmesi

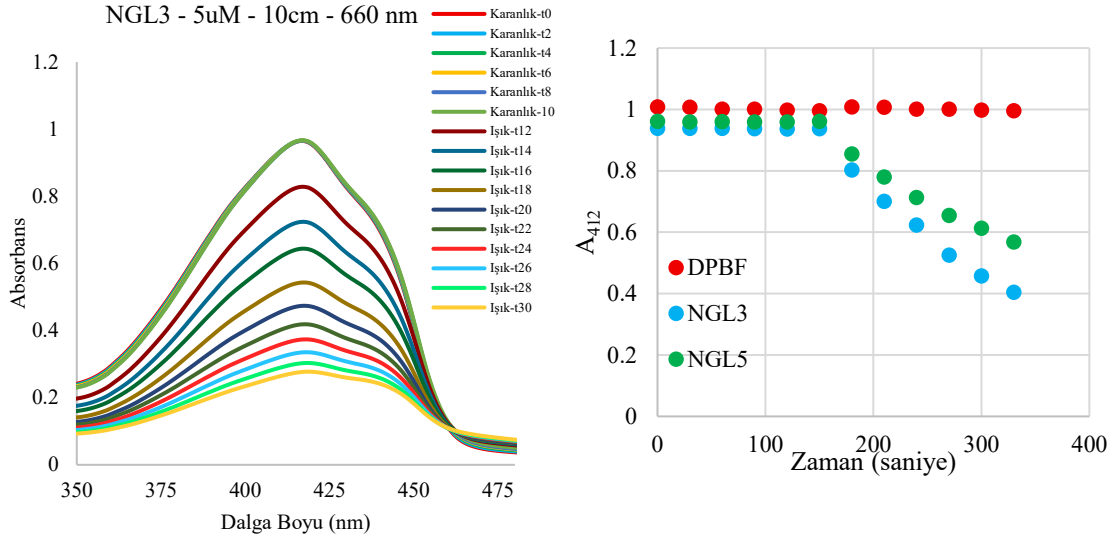
İyot atomu içeren ligandların ışık varlığında singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) üretmesi beklenmektedir. Bunu belirlemek için singlet oksijen varlığında oksitlenerek dibenzoilbenzene (DBB) dönüşen ve absorbansı değişen difenil izobenzofuran (DPBF) bileşiği kullanılarak bu bileşiğin absorbansı takip edildi. Farklı konsantrasyonda ligand, ışık kaynağı ve mesafe uygulanarak deney optimize edildi. DPBF molekülünün absorbansı ışık kaynağından veya mesafeden etkilenmemektedir. 630 nm ışık kaynağı uygulaması NGL-5 ligandının 5 μM derişimindeki singlet oksijen kuantum verimi 0,43 olarak hesaplanırken aynı derişimin 660 nm ışık kaynağındaki singlet oksijen kuantum verimi 0,45'tir. NGL-3 ligandının 5 μM derişimindeki, 660 nm ışık kaynağındaki singlet oksijen kuantum verimi 0,61'dir. Ayrıca NGL-5 molekülünün pozitif yüksüz piridin formunun 5 μM derişiminde 0,70 kuantum verimiyle singlet oksijen ürettiği tespit edilmiştir. Işık uygulanmadığı durumlarda tuzak bileşik DPBF'ın absorbans spektrumlarının değişmiyor olması bileşiklerin karanlıkta singlet oksijen oluşturmadığının göstergesidir.



Şekil 4.26. Fotoduyarlastırıcı NGL-3, NGL-5 ve 14 nolu molekülün singlet oksijen üretimine ait DPBF absorbans spektrumları.



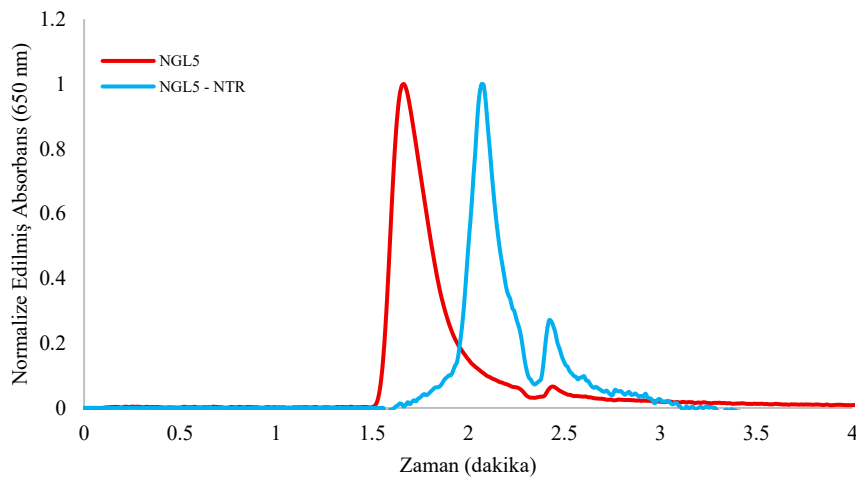
Şekil 4.26.(devam) Fotoduyarlayıcı NGL-3, NGL-5 ve 14 nolu molekülün singlet oksijen üretimine ait DBPF absorbans spektrumları.



Şekil 4.26.(devam) Fotoduyarlayıcı NGL-3, NGL-5 ve 14 nolu molekülün singlet oksijen üretimine ait DBPF absorbans spektrumları.

4.6.2. NGL-5 ligandının nitroredüktaz enzimi ile aktifleşmesi

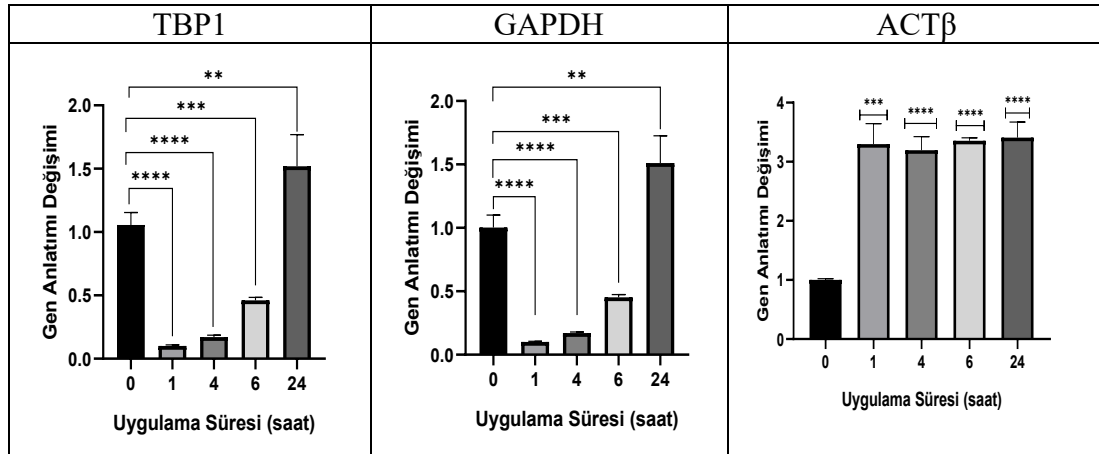
Nitrobenzil birimi bulunan NGL-5 ligandında, bu hacimli yapının molekül ana gövdesine açılı durması ve sterik engel oluşturması G-kuadrupleks yapısına bağlanmasına engel olmaktadır. Bu birimin hipoksik ortamda bol bulunan nitroredüktaz enzimi tarafından ayrıldığını göstermek için NGL-5 ligandına enzim uygulaması yapıldı (Sharma v.d., 2019). Enzim içeren ve içermeyen örneklerin HPCL cihazında yapılan analizi sonucu NGL-5'in geliş zamanı 1.65 dakika iken enzim uygulanmış örneğin geliş zamanının 2.06 dakika olduğu tespit edildi (Şekil 4.27). Spektrumda tek ve farklı zamanlarda pik görülmesi enzimatik dönüşümün gerçekleştiğine işaret etmektedir.



Şekil 4.27. NGL-5 ligandına nitroredüktaz enzimi uygulanmış ve uygulanmamış örnekler için HPLC spektrumu. NGL-5 (1 mM), nitroredüktaz enzimi (4 mg/mL) ve NADH (100 µM) PBS (pH: 7.4) tamponunda 37°C'de 1 gün inkübe edildi.

4.6.3. Meme kanseri hücresinde hipoksi ortamının oluşturulması

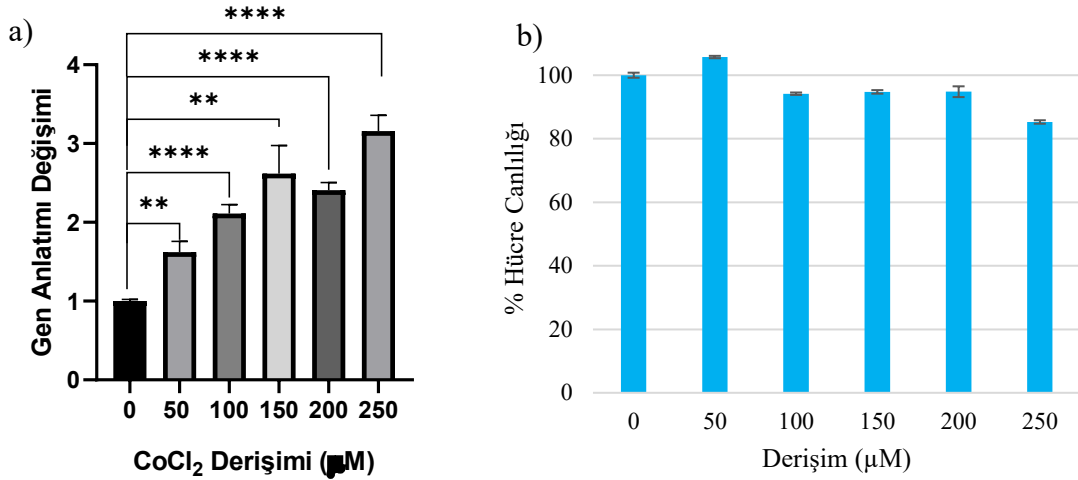
Oksijence fakir hipoksi ortamında hücrelerde alternatif metabolik yolları aktive eden transkripsiyon faktörü olan HIF1 proteininin anlatımı artar (Muz v.d., 2015). Normal koşullarda HIF1 proteini oksijen varlığında proteozomal yolla parçalandığı için hipoksi ortamının oluşturulmasını belirlemek için HIF1 proteininin anlatımı takip edilebilir (Talks v.d., 2000). Bu amaçla farklı sürelerde özel gaz karışımı ve farklı derişimlerde CoCl_2 eklenerek hipoksi ortamı oluşturulan MCF7 hücre hattında HIF1 geninin anlatımı takip edildi. Ayrıca uygun referans genin belirlenmesi için GAPDH, TBP1 ve ACT β genleri test edildi. Buna göre zamana bağlı olarak hipoksi gazı uygulanması sonunda HIF1 α geninin anlatımı GAPDH ve TBP1 referans genlerine oranla artarken ACT β referans genine oranla artış 1. saatten itibaren artmıştır (Şekil 4.28). GAPDH ve TBP1 referans genlerinin hipoksi ortamdan etkilenebileceği düşünülerek sonraki çalışmalarda ACT β geninin referans gen olarak kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.28. MCF7 hücre hattında, farklı zamanlarda gaz uygulanmış deney gruplarındaki HIF1 α gen anlatımı. Referans gen olarak sırasıyla TBP1, GAPDH ve ACT β kullanıldı. Hücreler hipoksi kabinde büyütülmüştür.

HIF-1 α proteinin proteozomal degradasyonundan sorumlu prolin hidroksilaz enzimini inhibe eden CoCl_2 , hipoksi ortamın taklidi için kullanılmaktadır (Muñoz-Sánchez vd., 2019, Dai vd., 2012). Ayrıca CoCl_2 , HIF-1 α transkripsiyonunda artışa sebep olmaktadır. Hipoksi ortamı oluşturmak için hücrelere CoCl_2 uygulandı. Farklı derişimlerdeki uygulama sonucunda derişim arttıkça HIF1 α gen anlatımında artış gözlemlendi. Ayrıca CoCl_2 'nin hücre canlılığına etkisi incelendiğinde hücrelere toksik

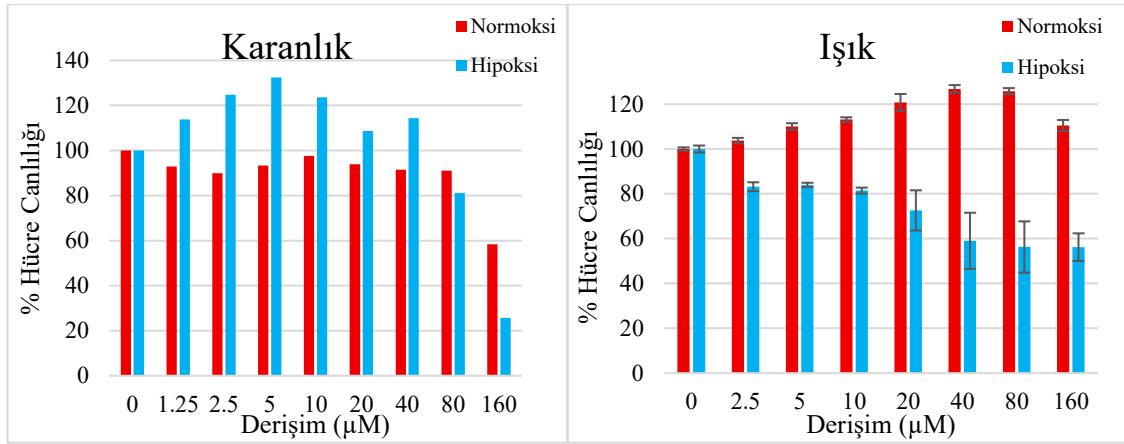
olmadığı belirlendi (Şekil 4.29). İleri çalışmalarda MCF7 hücrelerinde hipoksi ortamının oluşturulması için 100 μM CoCl_2 uygulanabileceğine karar verildi.



Şekil 4.29. a) MCF7 hücre hattında farklı derişimlerde CoCl_2 HIF1 α gen anlatımı. Referans gen olarak ACT β kullanıldı. b) CoCl_2 'nin hücre canlılığına etkisi ($n \geq 3$).

4.6.4. NGL-5 ligandının hücre canlılığına etkisi

Işık ile uyarılan NGL-5'in toksik etkisinin belirlenmesi için MCF7 insan meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Farklı ışık kaynağı (630 nm ve 660 nm), farklı mesafeler (10 cm ve 20 cm), farklı süreler (30 dakika, 60 dakika) ve ışık kaynağının hücrelerin üstünden veya altından uygulanması gibi çeşitli optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi. Yapılan farklı uygulamalar sonucunda 660 nm kırmızı ışık kaynağının hücrelerin altından 10 cm mesafeden ve 30 dakika uygulanmasının en uygun optimizasyon olduğuna karar verildi (Şekil 4.30). Bu koşullar altında NGL-5'in hipoksi ortamda, ışıkla uyarıldığında IC₅₀ değerini 52,2 μM olduğu belirlendi. Karanlıkta IC₅₀ değeri normokside 160 μM üzerinde ve hipokside 140 μM olarak belirlendi. 20 ve 40 μM ligand kullanılan analizlerde normoksi ortamlarında ve karanlık hipoksi ortamında hücre canlılığı korunurken hipoksi ışık uygulanmış ortamda hücre canlılığının %60'lara düştüğü gözlenmiştir. Bu durum singlet oksijen üretiminin hücre canlılığına olan etkisine işaret etmektedir.

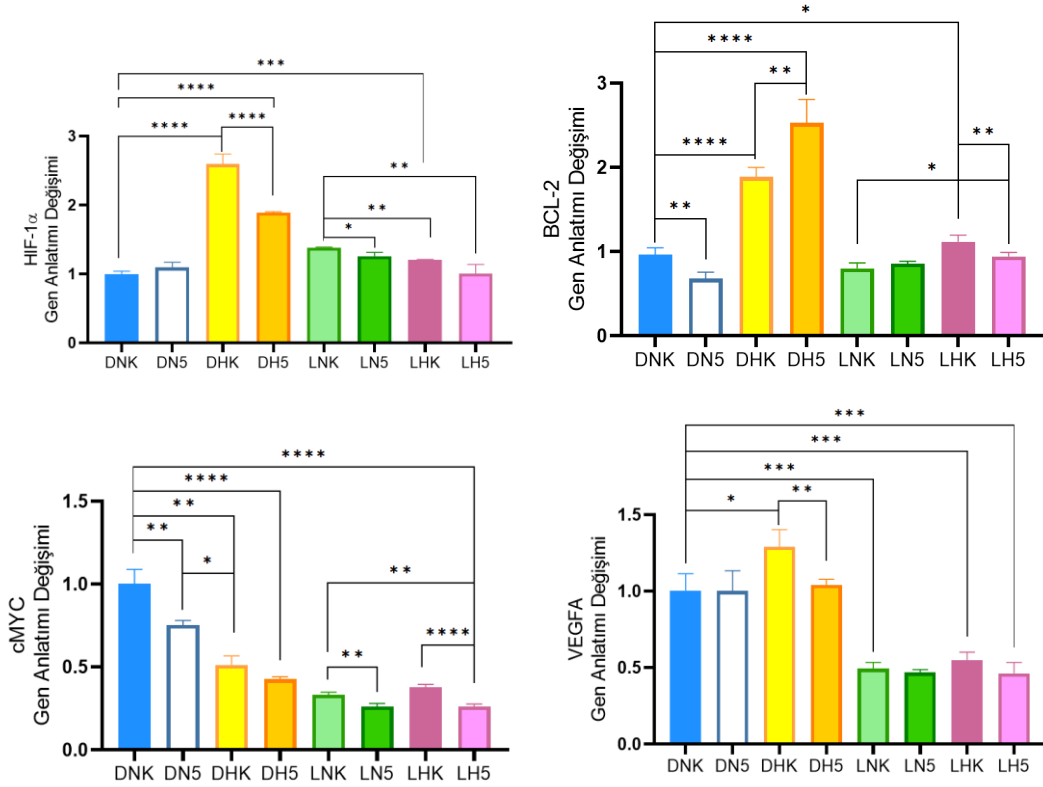


Şekil 4.30. NGL-5 ligandının MCF7 hücre canlılığına etkisi. 100 µM CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturulmuştur. 660 nm ışık kaynağı 30 dakika, 10 cm mesafeden hücrelerin altından uygulanmıştır.

4.6.5. NGL-5 ligandının gen anlatımına etkisi

Yüksek verimli DNA-dizileme analiziyle insan genomunda yaklaşık 700000 G4 yapısı içeren bölge ortaya çıkarılmıştır ve bu bölgelerin %40'tan fazlası gen promotör bölgesinde bulunur (Chambers vd., 2015). Dahası bu bölgelerin onkogen veya tümör baskılayıcı genlere ait olması kanser gelişimi araştırmaları için odak noktası olmuştur. Bu tez çalışmasında sentezlenen NGL-5 molekülünün nitrobenzil birimi sayesinde tümör mikroçevresine has hipoksi ortamında aktifleşmesi ve kanser hücrelerini hedeflemesi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, onkogen promotörüne bağlanarak gen anlatımını transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesi mRNA seviyesinde araştırıldı. Sonuçlara göre HIF-1α gen anlatımı karanlık normoksi ortamında değişmezken hipoksi ortamda 2,6 kat artması hipoksi ortamın oluştuğunu göstermektedir. NGL-5 uygulandığında ise 1,4 kat azalma olması G4 ligandının HIF-1α gen promotörüne bağlanarak anlatımını baskıladığını göstermektedir (Şekil 4.31). Işık varlığında HIF-1α gen anlatımı karanlık normoksi ortamında değişmezken hipoksi ortamda NGL-5 varlığında 1,2 kat azalmıştır. BCL-2 gen anlatımı karanlık normoksi ortamında NGL-5 varlığında 1,4 kat azalmıştır, fakat hipoksi ortamda 1,3 kat artmıştır. Işık varlığında BCL-2 gen anlatımı karanlık normoksi ortamında değişmezken hipoksi ortamda NGL-5 varlığında 1,2 kat azalmıştır. MYC gen anlatımı bütün ortamlarda NGL-5 varlığında anlamlı bir azalma görüldü. VEGFA gen anlatımı karanlık ve ışık normoksi ortamında değişmezken hipoksi ortamında NGL-5 varlığında anlamlı bir azalma görüldü. Ayrıca ışık ortamında bütün genlerin anlatımı karanlık ortama kıyasla daha az olması DNA oksidasyonunun gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ligandın etkisinin görece zayıf olması da ligandın G4

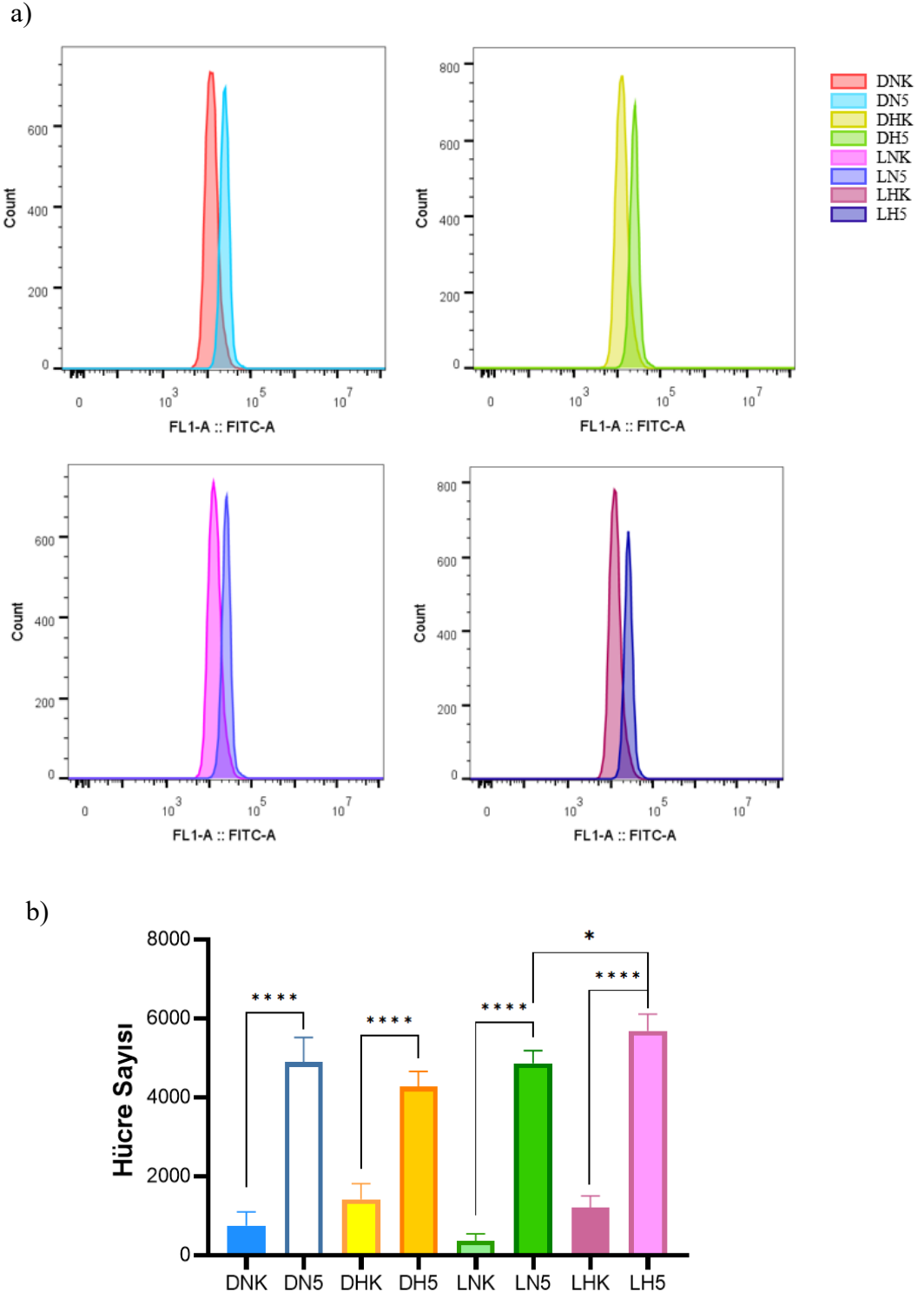
stabilizasyonuna bağlı etkisinin oksidasyona oranla daha az olabileceğini düşündürmektedir (Redstone vd., 2019).



Şekil 4.31. NGL-5 ligandının MCF7 hücrelerindeki gen anlatımı değişimi. 100 μM CoCl_2 ile hipoksi ortam oluşturulmuştur. ACT β referans gen olarak kullanıldı. ($n \geq 3$). DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 μM NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 μM NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 μM NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 μM NGL-5.

4.6.6. NGL-5 ligandına bağlı guanin oksidasyonunun *in vitro* belirlenmesi

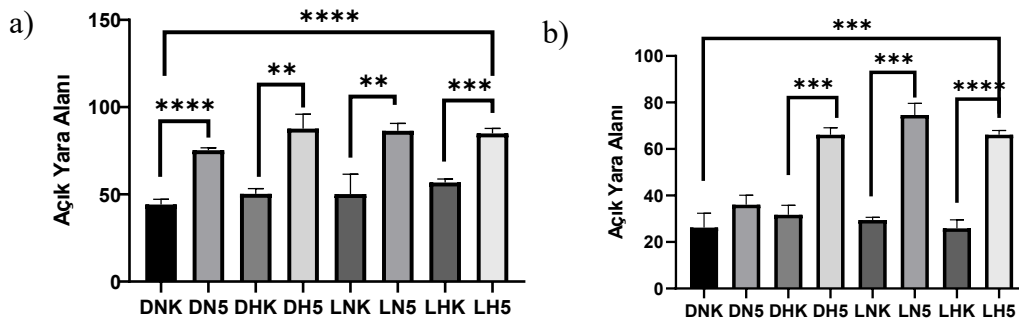
Yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) varlığı hücresel hasara, oksidatif strese veya DNA hasarına yol açabilir. Oksidasyon sonucunda DNA onarım mekanizmasının tetiklendiği, hücrede oksidatif stres olduğu bilinmektedir (Cadet v.d., 2017). Oksidatif DNA hasarı, düşük oksidasyon potansiyeli nedeniyle çoğunlukla guanin bazlarında meydana gelmektedir (Margolin v.d., 2006). NGL-5 ligandı ışık ile uyarıldığında BODIPY gövdesinde bulunan ağır iyot atomları aracılığıyla singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ürettiği singlet oksijen tuzak bileşiği olan DBPF molekülünün absorpsiyon değeri ile gösterildi. Bu çalışmada guanin oksidasyonunu göstermek için 8-okso-7,8-dihidroguanin (8-OHdG) hedefli antikor kullanılarak akış sitometrisi deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlara göre 5 μM NGL-5 varlığında ve ışık altında hücrede 8-OHdG oluştuğu ve en fazla oluşumun da ışık ile uyarılmış örnekte olduğu gözlemlendi (Şekil 4.29).



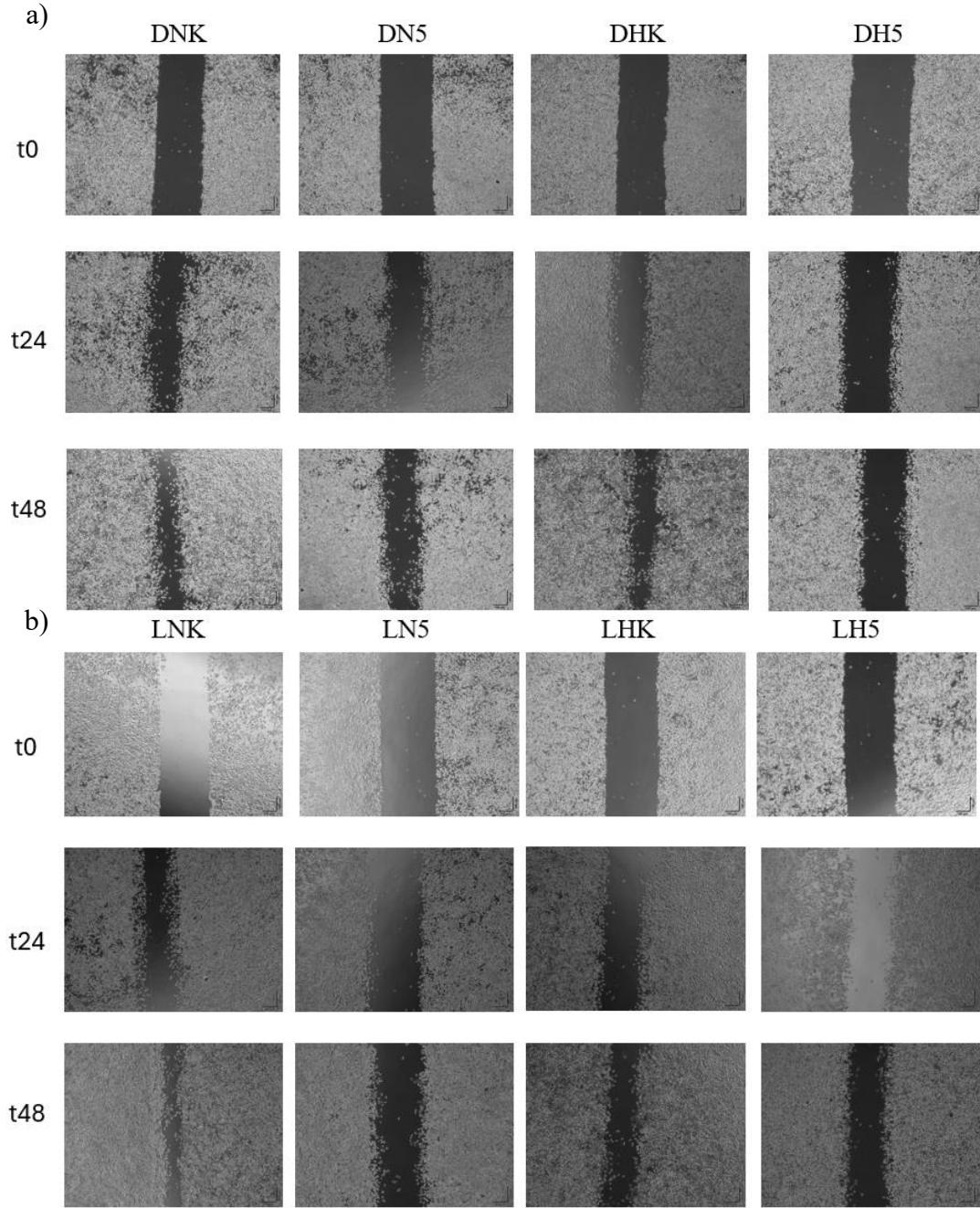
Şekil 4.32. NGL-5 ligandı ile hücrede 8-OHdG oluşumu. 100 μ M CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturulmuştur. a) Akış sitometrisi histogramları, b) Antikor pozitif hücre sayısı. DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 μ M NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 μ M NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 μ M NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 μ M NGL-5. (n $\geq$ 3).

4.6.7. NGL-5 ligandının metastaza etkisi

Tümör metastazı, kanser hücrelerinin birincil tümör büyümesinin ilk bölgesinden çoğaldıkları ve ikincil tümörler oluşturdıkları uzak organlara yayılmasıdır. Bu süreç epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile başlar ve hücre-hücre ile hücre-matriks yapısındaki görevli birçok proteinin düzenlenmesini içerir (Zhang v.d., 2015). Ayrıca HIF1 transkripsiyon faktörü EMT ilişkili E-kaderin (CDH1), WNT1, TWIST, SNAIL, ZEB1, MMP gibi metastazda görevli proteinlerin anlatımında etkilidir (Bao v.d., 2021). NGL-5 G-kuadrupteks ligandının HIF-1 α genini baskılamasıyla EMT yolağı üzerindeki etkisi araştırıldı. Plaka üzerinde oluşturulan hücresiz yaranın zamanla hücre göçü ile kapanması analiz edildiğinde ve qPCR sonuçları değerlendirildiğinde 5 μ M NGL-5, metastaz eğilimini, hücre göçünü anlamlı oranda inhibe etmiştir (Şekil 4.33, 4.34).

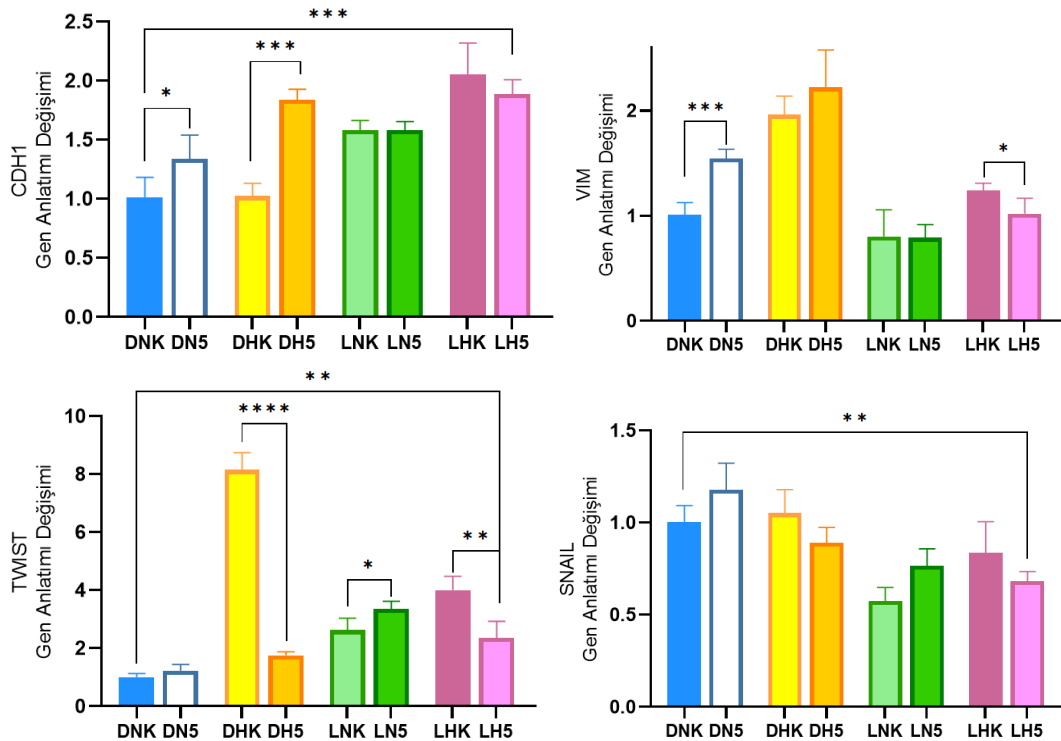


Şekil 4.33. MCF7 insan meme kanseri hücre hattında yara alanının NGL-5 varlığındaki değişimi normalize edilmiş sonuç grafikleri. a) 24 saat inkübasyon normalize edilmiş sonuç grafiği, b) 48 saat inkübasyon normalize edilmiş sonuç grafiği. DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 μ M NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 μ M NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 μ M NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 μ M NGL-5. (n $\geq$ 3). 100 μ M CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturulmuştur.

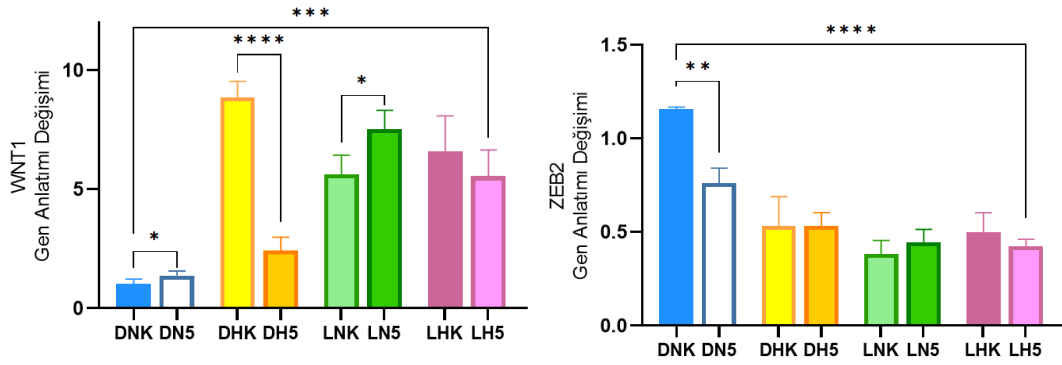


Şekil 4.34. MCF7 insan meme kanseri hücre hattında yara alanının NGL-5 varlığındaki mikrograf görüntüleri. a) Karanlık deney grubuna ait 24 ve 48 sonrası mikrografları, b) Işık deney grubuna ait 24 ve 48 sonrası mikrografları. DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 μ M NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 μ M NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 μ M NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 μ M NGL-5. ($n \geq 3$). 100 μ M CoCl_2 ile hipoksi ortam oluşturulmuştur.

EMT sürecinde görevli proteinlerin gen anlatımı değişimi sonuçlarına bakıldığında hipoksi ortamında NGL-5 ve ışık uygulanmış örneklerde kontrol grubuna kıyasla EMT yolağının baskılandığı belirlendi. E-kaderin (CDH1) hücre-hücre bağlantısından sorumlu bir proteindir ve anlatımının azalması hücrelerin birbirinden ayrılmasıyla sonuçlanır. CDH1 gen anlatımı karanlık hipoksizde NGL-5 uygulamasıyla 1,8 kat artmıştır. Vimentin (VIN) ise hücreye esneklik kazandırarak hareketliliği destekler, hipoksi ortamında ışık altında NGL-5 uygulaması VIM gen anlatımını anlamlı olarak azaltmıştır. TWIST ve SNAIL transkripsiyon faktörleri EMT sürecinde görevli pek çok proteinin anlatımını düzenler. Bu transkripsiyon faktörlerinin gen anlatımı da NGL-5 varlığında azalmıştır, özellikle karanlık hipoksi ortamında TWIST gen anlatımı 4,65 kat azalmıştır. WNT transmembran proteinidir ve Wnt sinyal yolağı ile SNAIL sentezini tetikler. Karanlık hipoksi ortamında 3,6 kat anlatımı azalmıştır. ZEB2 transkripsiyon faktörü de CDH1'in baskılanması ve vimentinin salgılanması gibi EMT sürecini başlatılmasında görev alır. ZEB2 gen anlatımı da NGL-5 varlığında azalmıştır. Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde NGL-5'in özellikle hipoksi ortamında EMT sürecini baskıladığı belirlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. MCF7 hücre hattında NGL-5 ligandının EMT ilişkili genler üzerine etkisi. DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 μ M NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 μ M NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 μ M NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 μ M NGL-5. 100 μ M CoCl_2 ile hipoksi ortam oluşturulmuştur. ACT β referans gen olarak kullanıldı ($n \geq 3$).



Şekil 4.35.(devam) MCF7 hücre hattında NGL-5 ligandının EMT ilişkili genler üzerine etkisi. DNK: karanlık normoksi kontrol, DN5: karanlık normoksi 5 µM NGL-5, DHK: karanlık hipoksi kontrol, DH5: karanlık hipoksi 5 µM NGL-5, LNK: ışık normoksi kontrol, LN5: ışık normoksi 5 µM NGL-5, LHK: ışık hipoksi kontrol, LH5: ışık hipoksi 5 µM NGL-5. 100 µM CoCl₂ ile hipoksi ortam oluşturulmuştur. ACTβ referans gen olarak kullanıldı (n ≥ 3).

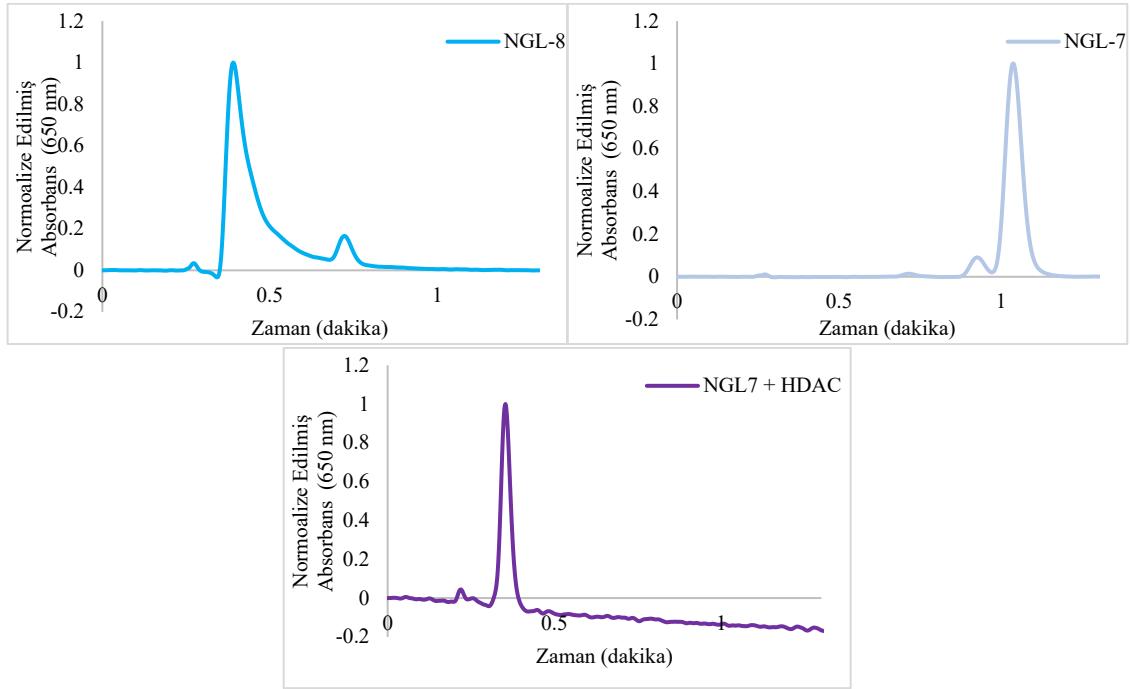
4.7. Histon Deasetilaz Enzimi ile Aktifleşen G4 Ligandı: NGL-7

G-kuadrupteks yapısının onkogen promotör ve telomer bölgelerinde yoğunlaşması, dinamik açılır-kapanır yapısı kanser araştırmaları için yeni bir alan sunmuştur. Sentezlenen pek çok G4 ligandının ışık, sıcaklık ve pH gibi ortam koşullarında veya hücrel enzimlerin varlığında aktifleşebilir molekül tasarımı kanser hücrelerinin hedeflenmesine olanak tanır. Bu tez çalışmasında ise histon deasetilaz (HDAC) enziminin tanıyacağı asetillenmiş butil-amin birimi bulunan BODIPY temelli G4 ligandı (NGL-7) sentezlendi. Normal koşullar altında yüksek halde bulunan NGL-7 molekülü HDAC tarafından deasetillenerek pozitif yüklü amonyumu bulunan NGL-8 molekülüne dönüşerek aktifleşir. NGL-7'nin G4 yapısına ilgisi yokken NGL-8'in yüksek ilgisi FRET DNA erime testi ile tespit edildi. Hücre kültürü çalışmalarıyla kanser hücrelerine etkisi araştırıldı.

4.7.1. Histon deasetilaz enzim uygulaması

Histon deasetilaz enzimi varlığında deasetilasyonu göstermek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanıldı. Bunun için 20 µM NGL-7 ile 200 nM HDAC6 PBS (pH 7.4) içinde 24 saat, 37°C'de inkübe edildi ve örnek HPLC kullanılarak analiz edildi. 24 sonunda NGL-7'nin tamamının NGL-8'e dönüştüğü görüldü (Şekil 4.36). Fakat NGL-7 deasetilasyonu sadece HDAC6 enzimine bağımlı veya özgün olmayabilir. İnsan HDAC enzim ailesinin 18 üyesi ve sirtuin (SIRT) deasetilaz

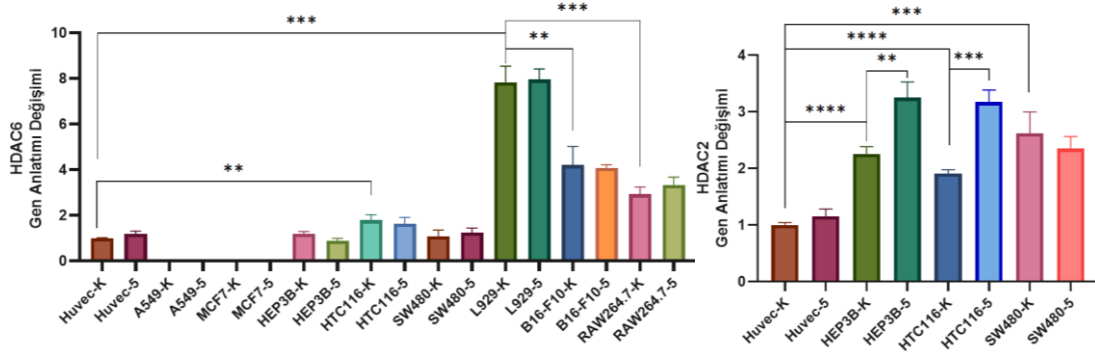
enzimleri gibi pek çok farklı deasetilaz bulunur. Bu deasetilazlarda NGL-7'nin asetil birimini tanıyıp hidroliz gerçekleştirebilir.



Şekil 4.36. NGL-7, NGL-8 ve HDAC6 uygulanmış NGL-7'e ait HPLC spektrumu. NGL-7 (20 μ M) ve histon deasetilaz 6 enzimi (200 nM) PBS (pH: 7,4) tamponunda uygulandı.

4.7.2. Farklı hücre hatlarında HDAC seviyesinin belirlenmesi

Sitoplazmada ve nükleusta bulunan HDAC6 ile sadece nükleusta bulunan HDAC2 enzimlerin gen anlatımı farklı hücre hatlarında mRNA seviyesinde araştırıldı. HDAC enziminin en fazla anlatım yapıldığı hücre hattının belirlenmesi ve ileri hücre kültürü deneylerinin yapılması amaçlandı. Sonuçlar normal insan hücresi olan HUVEC hücre hattına normalize edildi. HDAC6 ve HDAC2 gen anlatımı HEB3B, HTC118, SW480 ve L929 hücre hatlarında en az 2 kat fazla yapıldığı belirlendi (Şekil 4.37). İnsan hücreleri arasında HCT116'da her iki enzimin de anlamlı derecede fazla olması nedeniyle ileri deneylerde bu hücre hattı G4 ligandının etkinliğini test etmek için kullanılmıştır.

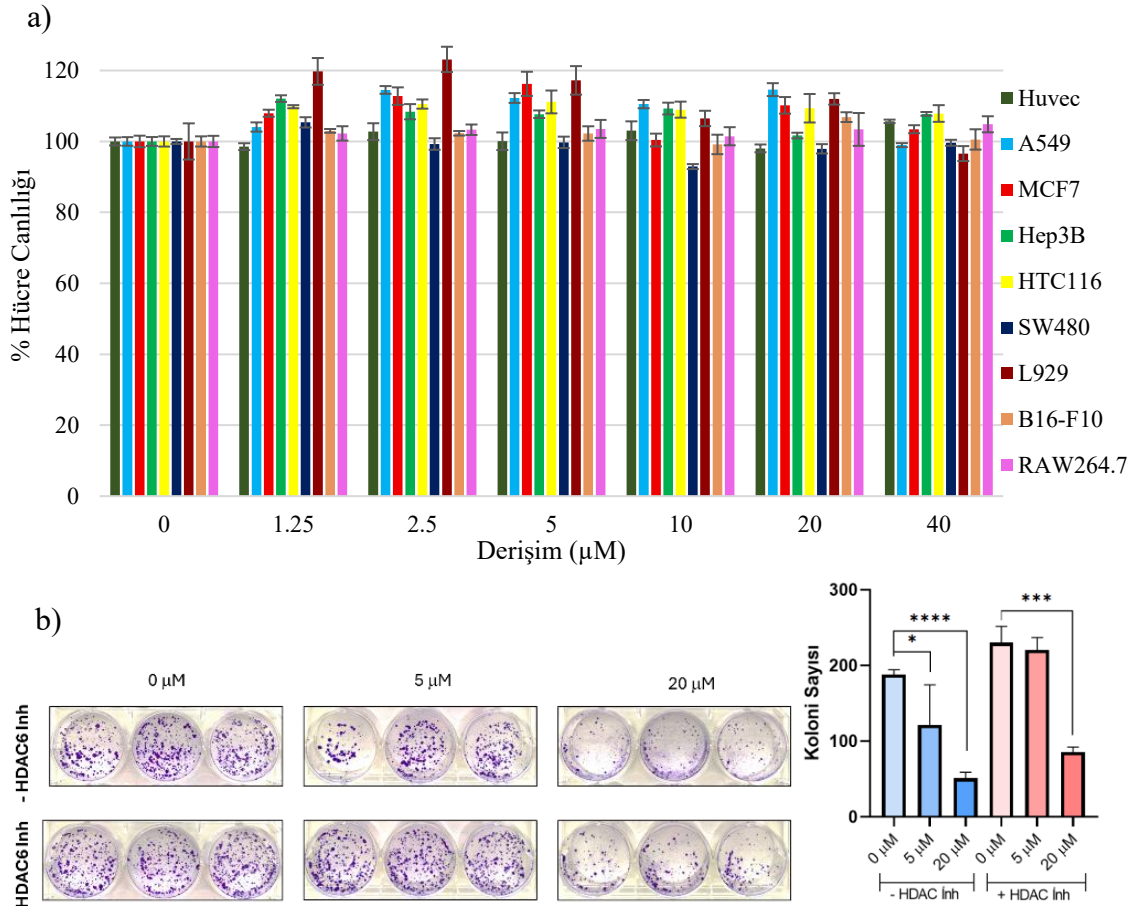


Şekil 4.37. Farklı hücre hatlarında HDAC6 ve HDAC2 gen anlatımı değişimi. ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

4.7.3. NGL-5'in hücre canlılığına etkisi

Geniş yelpazede MCF7 (insan meme kanseri), A549 (insan akciğer kanseri), B16-F10 (fare melanoma), RAW264.7 (fare makrofaj), Hep 3B2.1-7 (insan karaciğer kanseri), HTC116 (mikrosatelit kararsız insan kolon kanseri), SW480 (mikrosatelit kararlı insan kolon kanseri), Huvec (insan normal göbek kordonu endoteli), L929 (fare normal fibroblastı) hücre hatları üzerinde gerçekleştiren 24 saatlik toksisite çalışmasında 40 μ M derişime kadar NGL-7'nin toksik etkisi görülmedi. Fakat 8 günlük uzun inkübasyon sonucunda koloni oluşumu incelendiğinde HTC118 hücre hattında 5 ve 20 μ M NGL-7'nin sırasıyla %35 ve %73 oranında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.38).

NGL-7 ve 1 μ M HDAC6 inhibitörünün (1,2,3,4-tetrahydro-N-hydroxy-2-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyl]-6-isoquinoline carboxamide) eş zamanlı uygulamasında özellikle 5 μ M NGL-7'nin hücre proliferasyonundaki negatif etkisi azalmıştır. Bu durum HPLC sonucuyla birlikte değerlendirildiğinde HDAC6 enziminin deasetilaz enzimleri arasında NGL-7'nin aktifleşmesinde etkili olanlardan biri olduğunu düşündürmektedir.

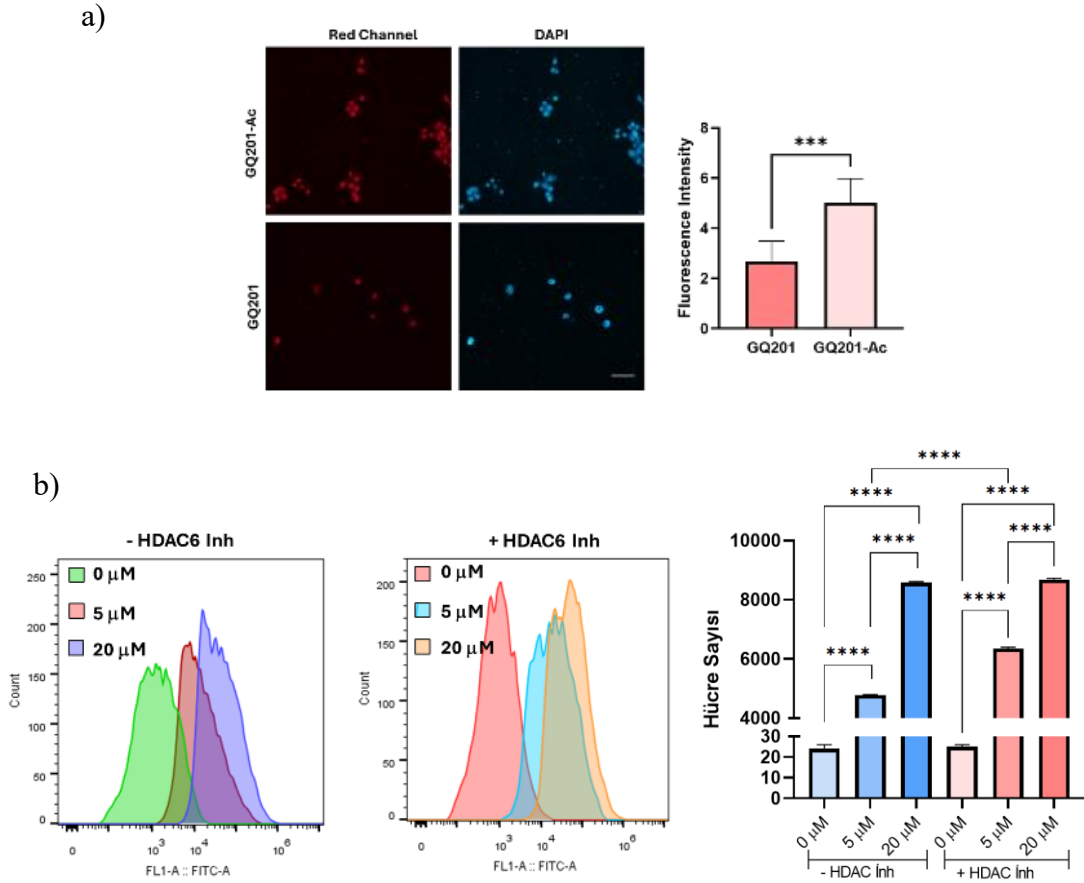


Şekil 4.38. a) Farklı hücre hatlarında NGL-7'nin hücre canlılığına etkisi. b) NGL-7 (5 µM) ve HDAC6 inhibitörü (1 µM) içeren ve içermeyen örneklerdeki 8 günlük koloni oluşumu deneyi fotoğrafları ve sonuç grafiği.

4.7.4. *In vitro* NLG-7 ligandının lokalizasyonu ve g-kuadrupleks stabilizasyonu

Yeni nesil BODIPY temelli G-kuadrupleks ligandının hücre içindeki lokasyonu floresans mikroskobu ve G4 yapısına olan ilgisi Anti-G4 antikoru ile akış sitometrisi kullanılarak incelendi. Buna göre HTC116 hücre hattında 3 saat inkübe edilen NGL-7 ve NGL-8'nin nükleusta lokalize olduğu çift zincirli DNA'ya bağlandığı bilinen DAPI boyası ile kolokalize olması ile anlaşıldı (Şekil 4.39). Yüksüz-pasif formdaki NGL-7, yüklü-aktif formdaki NGL-8'e göre nükleusta 2 kat fazla floresan sinyali vermesi yüksüz halinin hücre penetrasyonunun daha fazla olduğuna işaret ediyor olabilir.

Yapılan akış sitometri analizlerinde, NGL-7'nin hücredeki G4 yapısına kararlı kılma yeteneği derişim artışına bağlı olarak artmaktadır (Şekil 4.39). Ayrıca HDAC6 inhibitörünün, G4 yapısının kararlılığına pozitif etkisi olduğu görüldü.

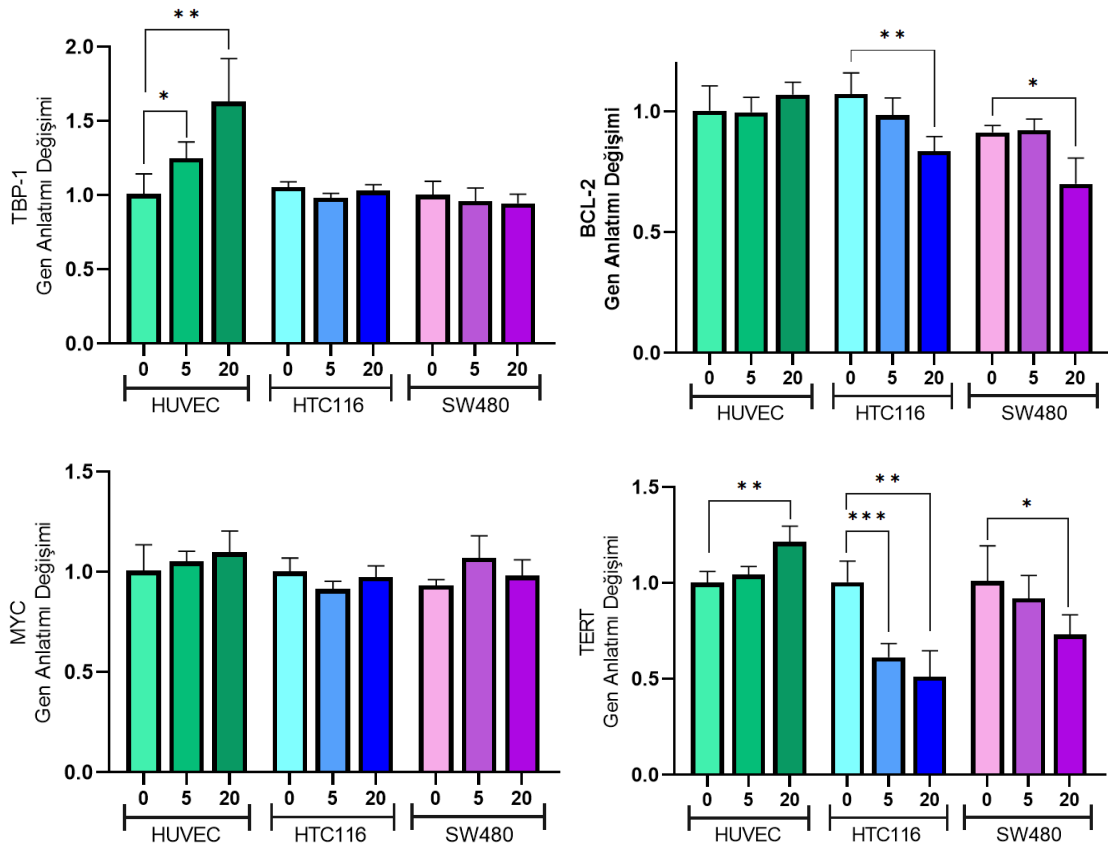


Şekil 4.39. NGL-7 ligandının in vitro lokalizasyonu ve G4 satabilizasyonu. a) NGL-7 (50 μ M) ligandının HTC116 hüresindeki lokalizasyonunu gösteren floresan mikroskop ile analizi. b) NGL-7 (5 μ M) ve HDAC6 inhibitörü (1 μ M) içeren ve içermeyen örneklerdeki G4 stabilizasyonunu gösteren akış sitometrisi sonucu ve analiz grafiği.

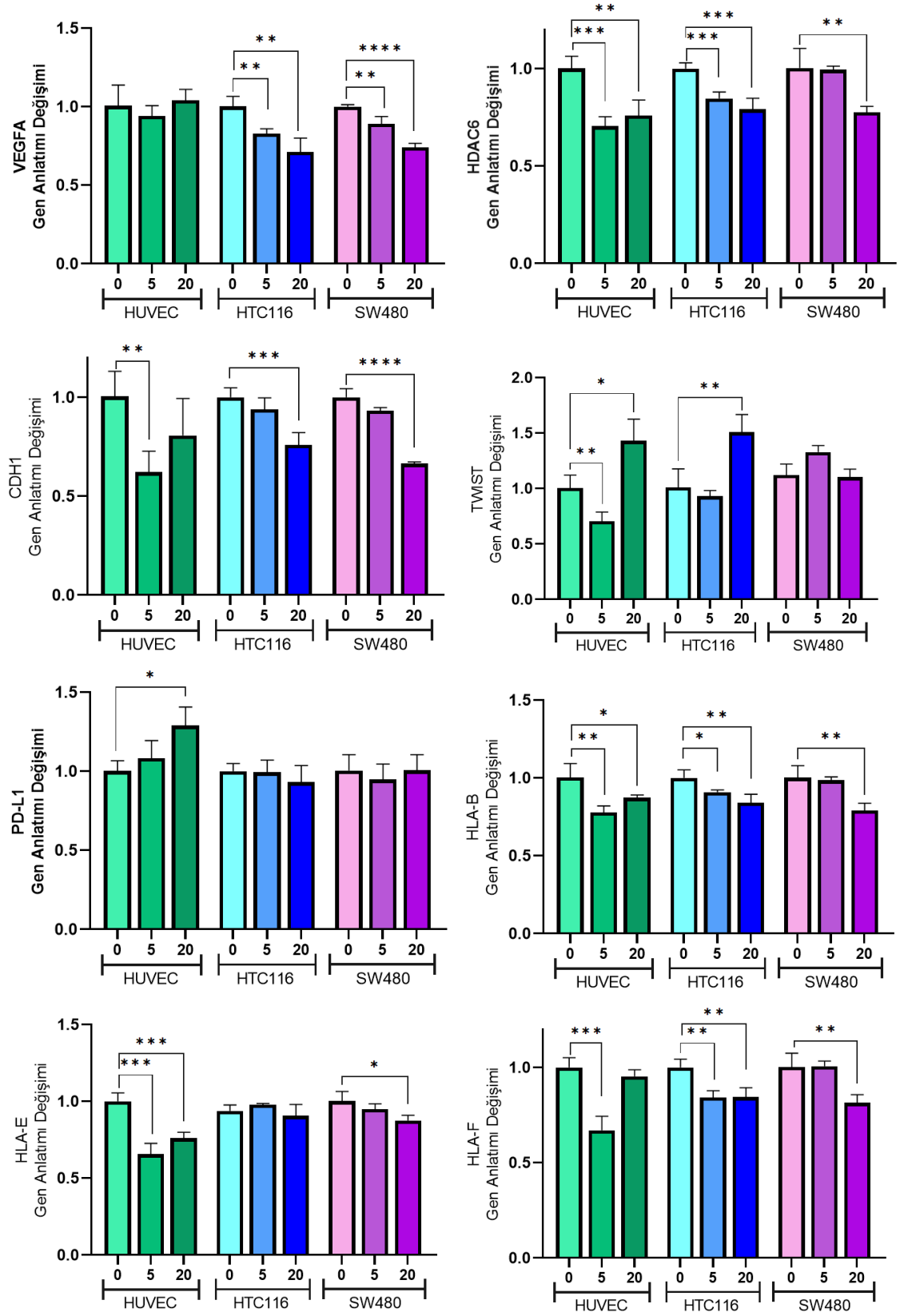
4.7.5. NGL-7 ligandının gen anlatımına etkisi

Histon deasetilaz enzimi tarafından aktifleşen G-kuadrupleks ligandı NGL-7'nin promotöründe G4 yapısı bulunan ve bulunmayan onkogenler ile immün sisteme ait genler üzerindeki etkisi transkripsiyonel seviyede araştırıldı. Sağlıklı insan endotel hücresi HUVEC, mikrosatellit karasız kolorektal karsinom HTC116 ve mikrostallit kararlı kolon adenokarsinom SW480 kullanılarak 5 ve 20 μ M NGL-7 uygulandı. Hücrede genel transkripsiyon faktörü olarak işlevli ve G4 yapısı bulunmayan TBP1 gen anlatımında HUVEC hücresinde doza bağlı artış görülürken HTC116 ve SW480 hücre hatlarında anlamlı bir değişim olmadı. G4 yapısı bulunan BCL-2, TERT ve VEGFA gen anlatımında HTC116 ve SW480 hücre hatlarında baskılanma meydana gelirken HUVEC hücrelerinde negatif etki olmadı. MYC gen anlatımı bütün hücre hatlarında NGL-7'den etkilenmedi. HDAC6 gen anlatımı ise doza bağlı azalma görüldü. Hücre-hücre bağlantı proteini CDH1 gen anlatımında azalma ve hücre göçü, metastazda rol oynayan TWIST gen anlatımında artma olması EMT sürecini tetikleyebilir. NGL-7'nin immün sistem üzerindeki etkisi

immün kontrol noktası ligandı PD-L1 ve insan lökosit antijenleri HLA-B, HLA-E, HLA-F gen anlatımları incelendi. PD-L1 gen anlatımı HUVEC hücresinde doza bağlı artarken kanser hücrelerinde fark olmadı. HLA gen anlatımlarında ise az da olsa anlamlı bir azalma meydana geldi. NK ve sitotoksik T hücrelerinin kusurlu hücreleri tanınmasında görevli HLA genlerinin azalması otoimmün hastalıklara karşı bir strateji geliştirmek için kullanılabilir. Ayrıca mikrosatellik kararsızlığı bulunan HTC116 hücre hattında HLA gen bölgelerindeki genomik kararsızlık bu hücrelerde HLA gen anlatımını etkileyecek düzeydedir (Kloor vd., 2010, Şekil 4.40).

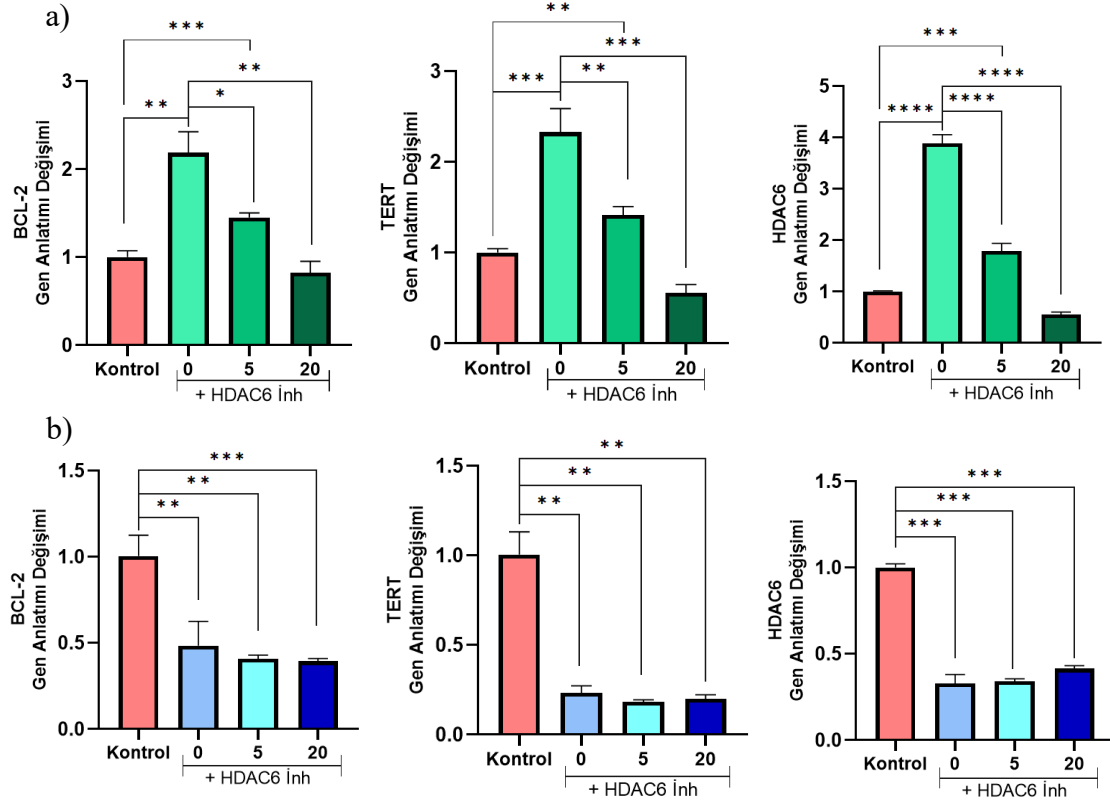


Şekil 4.40. NGL-7 (5 ve 20 μM) ligandının HUVEC, HTC116 ve SW480 hücre hatlarındaki gen anlatımına etkisi. ACTβ referans gen olarak kullanıldı. (n ≥ 3).



Şekil 4.40.(devam) NGL-7 (5 ve 20 μ M) ligandının HUVEC, HTC116 ve SW480 hücre hatlarındaki gen anlatımına etkisi. ACT β referans gen olarak kullanıldı. (n $\geq$ 3).

HDAC6 inhibitörü (1 μ M), normal epitel HUVEC hücresinde BCL2, TERT ve HDAC anlatımını sırasıyla 2,2, 2,4 ve 3,8 kat artırmıştır. HDAC6 inhibitörü ve NGL-7 birlikte uygulandığında ise NGL-7 dozuna bağlı olarak gen anlatımlarında azalma gerçekleşti. Fakat mikrosatellit kararsızlığı bulunan kolorektal karsinom HTC116 hücresinde ise HDAC6 inhibitörü BCL2, TERT ve HDAC anlatımını 2 kattan fazla azaltmıştır. NGL-7 uygulandığında da BCL-2 ve TERT gen anlatımında azalma devam etmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. NGL-7 ligandının HUVEC ve HTC116 hücre hatlarındaki gen anlatımına etkisi. a) Huvec hücre hattı. b) HTC116 hücre hattı. HDAC6 inhibitörü (1 μ M), ACT β referans gen olarak kullanıldı. Deneyde belirtilen kontrol grubu inhibitör veya G4 ligandı uygulanmamış grubu ifade etmektedir ($n \geq 3$).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

G-kuadrupleks yapısı nükleik asitlerin guanince zengin bölgelerinde oluşan ve dizi içeriğine, uzunluğuna, monovalent katyona bağlı olarak farklı konformasyonlarda bulunan ikincil bir yapıdır. G-kuadrupleks yapısının kanser oluşumu ve gelişiminden sorumlu onkogen anlatımın etkilemesi bu yapıların anti-tümör tedavi yöntemi olarak kullanılması açısından bilim dünyasının ilgi odağı olmuştur (Neidle 2017). Bu amaçla dinamik G-kuadrupleks yapısının düzenlenmesine olanak tanıyan küçük moleküller geliştirilmiştir. Günümüze kadar G-kuadrupleks yapısına bağlanabilen ve stabilize edebilen birçok molekül sentezlenmiş ve çalışılmıştır (Wang v.d., 2022). Bu tez çalışmasında seçici olarak G-kuadrupleks yapısına bağlanan BODIPY temelli, farklı sayıda pozitif yüklü, fonksiyonel gruplu, nitroredüktaz veya histon deasetilaz enzimleri tarafından aktiveleştirilebilen ve fotoduyarlastırıcı özelliklere sahip G4 ligandları tasarlandı ve sentezlendi. Fotofiziksel optimizasyonu için absorbans ve emisyon spektrumları alındı. BODIPY ana gövdesinin 3,5-pozisyonundaki distiril yapıda eklenen sübstituentler ana gövdenin konjugasyonu artırarak absorbans spektrumunda batokromik kaymaya neden olmuştur. Ayrıca bu modifikasyon floresan emisyonlarını sönmülmüştür (Çizelge 4.1). Sentezlenen bütün G4 ligandları PBS içinde yüksek oranda çözündüğü gözlenmiştir. Oda sıcaklığında ve PBS içinde en kararlı G4 ligandı ise NGL-4'tür (Şekil 4.2). G4 ligandlarının G4 yapısına olan ilgisi FRET DNA erime analizi ve DNA absorbans titrasyon deneyiyle belirlendi. Ligandların pozitif yük sayısı arttıkça G4 yapısına olan ilgisi artmaktadır. Üç pozitif yüke sahip NGL-4, G4 yapısına karşı en yüksek afiniteye sahiptir ve G4 yapısı bulunmayan oligomere bağlanmayarak G4 seçici özelliği bulunmaktadır. Hiç pozitif yük bulunmayan NGL-8, hem G4 yapısı bulunan hem de bulunmayan DNA'ya bağlanmamıştır. Ayrıca BODIPY gövdesine distiril yapıda ammonyum tuzu bulunan ligandlar piridinyum bulunan ligandlara kıyasla G4 yapısını daha fazla stabilize ettiği bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu durum amonyum formunda pozitif yüklü distiril BODIPY molekülünün G4 yapısına seçici olarak bağlandığını ve sentezlenen G4 ligandlarının potansiyel hedefli ilaç tasarımına uygun olduğunu göstermektedir.

Ligandların G4 stabilizasyonuna etkisi anti-G4 antikoru ile floresan mikroskobu ve akış sitometrisi yöntemleri kullanılarak *in vitro* analizi gerçekleştirildi. B16-F10

hücrelerinde NGL-4 uygulaması sonrası hem floresan mikroskopunda hem de akış sitometrisinde 20 μ M derişimde G4 stabilizasyonunda anlamlı olarak yaklaşık 3 kat artış elde edildi. Ayrıca aynı derişimde NGL-4'ün, G4 yapısına bağlandığı bilinen TMPyP4 ligandına göre G4 yapısını daha kararlı kıldığı tespit edildi.

A549, B16-F10 kanser hücre hattı ve RAW264.7 normal makrofaj hücresinde NGL-4'ün 24 saatlik uygulamasında 20 μ M derişime kadar sitotoksik etki olmamıştır. İleri hücre kültürü çalışmalarında uygulama dozu olarak G4 bağlanma deneyleri baz alındı ve 5 μ M belirlenmiştir. Promotör bölgesinde G4 yapısı olan onkogenlerin (BCL-2, cMYC, HIF-1 α ve VEGFA) gen anlatımını B16-F10 kanser hücresinde baskılanırken RAW264.7 normal makrofaj hücresinde derişim göstermemiştir. Bu sonuçlar, genomik kararsızlığı sahip kanser hücresinde G4 yapısının daha kolay oluşması veya stabil kalmasından dolayı G4 ligandının kanser hücresini hedefleyebildiğini göstermektedir (Kosiol vd., 2021, Richl vd. 2024). B16-F10'da pro-inflamatuar sitokin IL-6 gen anlatımında 2,7 kat azalması anti-tümör yolakların tetiklenmesine yardımcı olur. Ayrıca NGL-4'ün IL-6 ve VEGF anlatımını düşürerek tümör gelişimi ve anjiyogenezi engellediği literatürdeki çalışmalarla uyumludur (Wei vd., 2003). G4 ligandının DNA hasarı ve mikronükleus oluşumunu tetiklediği böylece cGAS-STING yolağını aktive ederek kemokin salgılanmasındaki rolü literatürde gösterilmiştir (Migletta vd., 2021). Bu çalışmada da NGL-4'ün CCL2 ve CCL5 kemokinlerinin gen anlatımı azaltması literatürü desteklemektedir. MYC transkripsiyon faktörü PD-L1 gen anlatımında rolü vardır ve NGL-4 ile elde edilen bulgular iki genin anlatımındaki azalmada korelasyon gösterdiğine işaret etmektedir (Nirala, 2025). Katepsin B (CTSB), antijen işlenmesinde rol alan bir proteaz enzimidir ve tümör immünolojisinde çift yönlü etkisi vardır. Tümörle ilişki proteinleri doğru oranda parçalayarak immün sistemin tanıyabileceği peptitler oluşturabilir veya aşırı parçalanma sonucu proteinler tamamen ortadan kalkabilir ve immünbaskılama oluşur (Deng vd., 2022). NGL-4 uygulaması B16-F10 hücrelerinde CTSB gen anlatımını azaltması tümörle ilişkili proteinlerin tamamen yıkımının önüne geçebilir. Fakat sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin tanınmasından sorumlu membran reseptörlerinden MHC-1 gen anlatımı NGL-4 uygulamasıyla azalması kanser hücresinin sitotoksik CD8⁺ T hücresi tarafından tanınmasına engel olabilir. RAW264.7 makrofaj hücrelerinde NGL-4 farklı etkiler göstermiştir. Ko-kültürdeki makrofajda IL-1 β gen anlatımındaki azalma immünbaskılayıcı hücrelerin TMÇ'den uzaklaşmasına ve sitotoksik T hücrelerinin TMÇ'ye çekilmesine ve aktifleşmesine yardımcı olabilir (Garlanda vd., 2025). Ayrıca VEGFA ve IL-1 β anlatımının baskılanmasındaki

korelasyon literatürle uyumludur (Voronov vd., 2014). IL-10 gen anlatımındaki azalma M1 polarizasyonu sağladığı, sitotoksik T hücrelerini aktive ettiği için immün düzenlenmesinde kritiktir ve NGL-4 IL-10 gen anlatımını baskılamıştır (Sun vd., 2024). Fare modellerinde yapılan çalışmalar CCL5 kemokininin CD8⁺ T hücrelerinin TMC'ye çekilmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Jöhrer vd., 2008). Bu bağlamda ko-kültürdeki makrofaj hücresinde NGL-4 varlığında kemokin gen anlatımının artması immün hücrelerini TMC'ye çekerek immün aktif sıcak bölge oluşumuna potansiyel bir katkısı olabilir. Sonuçlara göre, NGL-4 bileşiğinin toksik olmayan derişimde immün-modülatör davranışı gösterdiği gözlenmiştir.

Hipoksi ortamında aktiveşen ve promotöründe G4 yapısı bulunan HIF-1 α transkripsiyon faktörü sitokinlerin anlatımını arttırır ve aynı zamanda artan sitokin miktarı NF- κ B aracılığıyla HIF-1 α degradasyonunu engeller (Malkov vd., 2021). Böylece HIF-1 α ve sitokinler birbirlerini destekleyerek tümör gelişiminde görev alır. Bu tez çalışmasında, A549 hücre hattında hipoksi ortamında HIF-1 α ve sitokinlerinin (IL-1 β , IL-6 ve IL-8) gen anlatımının artması literatürle uyumludur. NGL-4 varlığında ise bu gen anlatımlarının baskılanması HIF-1 α promotöründeki G4 stabilizasyonundan dolayı gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca bu transkripsiyonel baskılayıcı etki *P. aeruginosa* ile enfekte edilen A549 hücrelerinde daha fazla gözlenmiştir. Bu durum NGL-4'ün tümör gelişimini baskılama özelliğinin yanı sıra sitokin fırtınasını önlemesi kronik inflamasyonu durdurma potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Fakat *P. aeruginosa* ile enfekte edilen A549 hücrelerinde HIF-1 α gen anlatımının değişmemesi bakteri tarafından salınan 2-alkil-4-kinolon gibi sinyal moleküllerinin HIF-1 α proteinin 26S-proteazom proteolitik yoluyla yıkımına neden olmasından kaynaklanabilir (Legendre vd., 2012). Ayrıca inflamatuvar sitokinler NF- κ B, MAP kinaz veya Ras-MEK1/2-ERK1/2 sinyal yolları aracılığıyla mukus genlerinin (MUC5AC, MUC5B ve MUC2) anlatımını başlatır (Thai vd., 2008). Hipoksi ortamında *P. aeruginosa* ile enfekte olan ve olmayan A549 hücrelerinde mukus gen anlatımında azalma belirlendi. Sonuç olarak NGL-4 bileşiğinin hipoksi ortamında HIF-1 α gen anlatımını baskılaması sitokin ve musin anlatımını da baskılayarak kronik inflamasyonun önüne geçmesine, tümör gelişiminin durdurulmasına ve ilaç penetrasyonunun artmasına yardımcı olarak çok yönlü bir immün-modülatör etki sunabilmesine imkân verebileceği değerlendirilmiştir.

A549 hücrelerinin *P. aeruginosa* ile enfeksiyonunda AHL molekülleri ilave edilerek quorum sensing aktivasyonu sağlandığında NGL-4'ün davranışı değişmektedir. Özellikle dört karbonlu AHL1 molekülü varlığında NGL-4 hem sitokinlerin hem de

musin gen anlatımını artırmıştır. Quorum sensing aktifleştğinde sinyale bağlı olarak NGL-4 hücrel savunmayı destekleyici farklı bir yolağa katılıyor olabilir. Daha sonra *P. aeruginosa* üzerinde NGL-4'ün etkisi araştırılmıştır. Sitotoksik özelliği olmamasına rağmen AHL sentezinden (*lasI*, *rhII*) ve reseptörlerinden (*rhIR*) sorumlu gen anlatımında özellikle normoksi koşulunda baskılanma gözlemlendi. Hipoksi ortamında ise anlamlı bir değişim olmaması CoCl_2 'nin bakteri kültüründe hipoksi ortamını taklit etmek için etkili olmamasından kaynaklanabilir ve ağır metal toksisitesi, biyofilm oluşumunu tetikler (Gupta vd., 2014). Bu tez çalışmasında da CoCl_2 uygulamasının biyofilm oluşumunu artırdığı gözlemlendi. AHL molekülleri ve NGL-4'ün eş zamanlı uygulandığı örneklerde sadece AHL1'in gen anlatımına anlamlı bir etkisi olmuştur. AHL sentetaz *rhII* gen anlatımı artarken AHL reseptörü *lasR* gen anlatımı azalmıştır. Bu durum bakterinin ortama AHL molekülleri salınıp quorum sensing aktif tutmasına fakat reseptörün baskılanarak ilgili aşağı genlerin aktivasyonunun durdurulmasına neden olabilir.

RNA-dizileme yöntemiyle NGL-4'ün geniş kapsamlı etkisi incelendiğinde enerji metabolizması, PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağı, otofaji süreçlerine ait genlerde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu durum NGL-4'ün cMYC, VEGFA, gibi ana regülatör onkogenlerde G4 stabilizasyonu sağlaması ve sonrasında aşağı regülasyon ile bu yolakları etkilemesinden kaynaklanabilir. Ayrıca G4 yapıları mitokondriyal DNA ve RNA gibi çok çeşitli sayıda bulunduğu için hücre içinde farklı yolaklarda görevli proteinlerin transkripsiyonunu etkileyebilir (Bugaut vd., 2012).

Hipoksi ortamda aktifleşen ve fotoduyarlastırıcı özellikteki NGL-5 ile yapılan çalışmalarla ligandın singlet oksijen üretme kapasitesi absorpsiyon spektrum ve guanin oksidasyonu oluşturması akış sitometrisi analiziyle belirlendi. Singlet oksijen kuantum verimi NGL-5'in yüksüz piridin formunda pozitif yüklü formuna göre daha yüksek olması aslında ligandın DNA'ya bağlandıktan sonra yükünün nötrleneceği için serbest haline kıyasla daha fazla singlet üretebileceğini düşündürmektedir. Hücre içi guanin oksidasyonu ürünü 8-okso-7,8-dihidroguanin (8-OHdG) oluşumu incelendiğinde en fazla ışık ve hipoksi ortamında oluştuğu belirlendi. Fakat NGL-5 varlığında kontrole kıyasla 8-OHdG artırmıştır, bu durum G4 stabilizasyonunun replikasyon stresi, DNA tamir proteinlerinin hasarlı bölgeyi tanıyamamasından dolayı 8-OHdG birikimini artırmasından kaynaklanmış olabilir (Fleming ve Burrows, 2020). MCF7 insan meme kanseri hücre hattında karanlık ve normoksi ortamda toksisitesi olmazken hipoksi ve ışıklı ortamda sitotoksikite göstermektedir. Promotöründe G4 yapısı bulunan onkogenler (HIF-1 α , BCL-2, cMYC, VEGFA) ışık ve hipoksi ortamda baskılanmıştır. Ayrıca ışık ortamında bütün

genlerin anlatımı karanlık ortama kıyasla daha az olması DNA oksidasyonunun gerçekleştiğini düşündürmektedir. Tümör metastazı sürecindeki genleri (CDH1, WNT1, TWIST, SNAIL, ZEB2) NGL-5, onkogen anlatımının baskılanması sonucu dolaylı olarak etkileyerek baskılamıştır.

Histon deasetilaz enzimi ile aktiveleşen G4 ligandı NGL-7'in HTC116 mikrosatelit kararsız insan kolon kanserindeki koloni oluşumu takibi ile %73 oranında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlendi. Yüksüz-pasif formdaki NGL-7, yüklü-aktif formdaki NGL-8'e göre nükleusta 2 kat fazla floresan sinyali vermesi yüksüz halinin hücre penetrasyonunun daha fazla olduğuna işaret ediyor olabilir. Ayrıca üç pozitif yüklü NGL-4'e göre NGL-7 hücrede G4 stabilizasyonunu daha fazla sağlamıştır. Bu durum yüklü G4 ligandlarının hücre penetrasyonunda zayıf kalmasından kaynaklanabilir. Sağlıklı HUVEC ve kanser HTC116, SW480 hücre hatları karşılaştırıldığında NGL-7'nin G4 yapısı bulunan onkogen anlatımında kanser hücrelerinde baskılandığı, sağlıklı hücrede değişim olmadığı belirlendi. Ayrıca G4 yapısı bulunmayan TBP-1 gen anlatımında bütün hücre hatlarında baskılanma görülmedi. Bu durum NGL-7'nin normal hücrelerde HDAC enzim seviyesinin düşük olmasından dolayı aktiveleşemeyeceği ve kanser hücresinde ise aşırı HDAC enzimi ile aktiveleşerek kanser hücresini hedefleyebildiğini göstermektedir. Yapısal seçicilik ile NGL-7'nin G4 yapısını tanıdığını DNA'ya rastgele bağlanmadığını, yapı-spesifik özellikte olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında farklı yük sayısına ve fonksiyonel gruplara sahip yeni BODIPY temelli G4 ligandları tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Ligandlar arasında G4 stabilizasyonu yapı-aktivite ilişkisiyle belirlenmiştir. Farklı kanser hücrelerinde ve tümör mikroçevresi içindeki kanser, makrofaj ve bakteri ko-kültüründe kanser gelişimi, immün sistem tepkisi, enfeksiyon ve inflamasyon yanıtı araştırıldı. NGL-4'ün farklı hücre tiplerine ve sinyallere göre immün-modülatör davranış sergilediği gözlemlendi. Hücre tipine bağlı enzim seviyesi ve G4 yapı seçiciliği kullanılarak NGL-5 ve NGL-7 ligandlarının kanser hücresi hedefli terapötik ajan geliştirilmesinde literatüre katkı sağlanmıştır.

5.2 Öneriler

Tez çalışmasında sentezlenen G4 ligandlarının bilgisayar temelli yaklaşımlarla moleküler doking çalışmaları yapılabilir. Böylece G-kuadrupteks yapısına nasıl bağlandığı belirlenebilir. Farklı topolojideki G4 yapılarıyla kıyaslanabilir. Bu sayede G4 ligandlarına yeni fonksiyonel gruplar eklenerek modifiye edilebilir ve hedef G4 yapısına daha seçici ligandlar tasarlanabilir. G4 ligandları ile 3D hücre kültürü veya deney hayvanları üzerinde *in vivo* araştırmalar yapılabilir. Transkriptom analizi sonucundaki alternatif yollarda ligandların etkisi incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250–281.
- Altves, S., Ozsamur, N. G., Kavak, E., Erbas-Cakmak, S. (2025). Modulation of *P. aeruginosa* quorum sensing and host immune response with biomimetic cyclodextrin enzyme models. *Materials Advances*, 6, 6970.
- Anantha, N. V., Azam, M., Sheardy, R. D. (1998). Porphyrin binding to quadrupled T4G4. *Biochemistry*, 37(9):2709-14.
- Anderson, N. M. ve Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current biology*, 30(16), R921–R925.
- Arendt, L. M., McCready, J., Keller, P. J., Baker, D. D., Naber, S. P., Seewaldt, V., (Ed.). (2013). Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res.* 73:6080–93.
- Asamitsu, S., Bando, T., ve Sugiyama, H. (2019). Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 25(2), 417–430.
- Asamitsu, S., Li, Y., Bando, T., ve Sugiyama, H. (2016). Ligand-Mediated G-Quadruplex Induction in a Double-Stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 17(14), 1317–1322.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 125:5591–6.
- Bandeira, S., Gonzalez-Garcia, J., Pensa, E., Albrecht, T., ve Vilar, R. (2018). A Redox-Activated G-Quadruplex DNA Binder Based on a Platinum(IV)-Salphen Complex. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 57(1), 310–313.
- Bang, I. (1919). Untersuchungen über die Guanylsäure. *Biochemische Zeitschrift*, 26:293–311.
- Baser, A. S., Basar, B., Dogan, H. B., Sener, G., Ozsamur, N. G., Celik F.S., Altves, S., Erbas-Cakmak. (2023). Reprograming Cancer Cells by a BODIPY G-Quadruplex Stabiliser. *S. Chem. Commun.* 2023, 59, 12447.
- Benyahia, Z., Dussault, N., Cayol, M., Sigaud, R., Berenguer-Daize, C., Delfino, C., (Ed.). (2017). Stromal fibroblasts present in breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through adrenomedullin secretion. *Oncotarget*. 8:15744–62.

- Bergers, G., Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 7:452–64.
- Bhattacharyya, D., Mirihana Arachchilage, G., ve Basu, S. (2016). Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Frontiers in chemistry*, 4, 38.
- Biffi, G., Tannahill, D., ve Balasubramanian, S. (2012). An intramolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(29), 11974–11976.
- Bockelmann, L.C., ve Schumacher, U. (2019). Targeting tumor interstitial fluid pressure: will it yield novel successful therapies for solid tumors? *Expert Opin Ther TAR.* 23:1005–14.
- Boens, N., Verbelen, B., Dehaen, W. (2015). Postfunctionalization of the BODIPY core: synthesis and spectroscopy. *Eur. J. Org. Chem.*, pp. 6577-6595.
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M., ve Kastenmüller, W. (2018). CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 18(10), 635–647.
- Brosh R., M., Jr (2013). DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13(8), 542–558.
- Brown, J., ve M., Wilson, W., R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 4:437–47.
- Bugaut, A., ve Balasubramanian, S. (2012). 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic acids research*, 40(11), 4727–4741.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* 34(19):5402–15.
- Cadoni, E., De Paepe, L., Manicardi, A., ve Madder, A. (2021). Beyond small molecules: targeting G-quadruplex structures with oligonucleotides and their analogues. *Nucleic acids research*, 49(12), 6638–6659.
- Chambers, V. S., Marsico, G., Boutell, J. M., Di Antonio, M., Smith, G. P., ve Balasubramanian, S. (2015). High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nature biotechnology*, 33(8), 877–881.
- Chen, W., Zhang, Y., Yi, H. B., Wang, F., Chu, X., ve Jiang, J. H. (2023). Type I Photosensitizer Targeting G-Quadruplex RNA Elicits Augmented Immunity for Cancer Ablation. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 62(17), e202300162.
- Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y. H., Ho, Y. S., DeSouza, M. M., ve Wu, R. (2003). Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), 17036–17043.

- Cheng, YQ., Wang, SB., Liu, JH., Jin, L., Liu, Y., Li, CY., (Ed.). (2020). Modifying the tumour microenvironment and reverting tumour cells: New strategies for treating Malignant tumours. *Cell Proliferat.* 53:e12865.
- Cogoi S., Xodo L.E. (2006). G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* 34:2536–2549.
- Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., (Ed.). (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 513:559–63.
- Corbet, C., Draoui, N., Polet, F., Pinto, A., Drozak, X., Riant, O., (Ed.). (2014). The SIRT1/HIF2 α Axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer Res.* 74:5507–19.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zou, W., (Ed.). (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*, 10(9), 942–949.
- Dai, J., Carver, M., Punchihewa, C., Jones, R. A., ve Yang, D. (2007). Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic acids research*, 35(15), 4927–4940.
- Dai, Z. J., Gao, J., Ma, X. B., Yan, K., Liu, X. X., Kang, H. F., Ji, Z. Z., Guan, H. T., ve Wang, X. J. (2012). Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 31(1), 28.
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., ve Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, 107(4), 489–499.
- Das, P., Winnerdy, F. R., Maity, A., Mechulam, Y., ve Phan, A. T. (2021). A novel minimal motif for left-handed G-quadruplex formation. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 57(20), 2527–2530.
- De Magis, A., Manzo, S. G., Russo, M., Marinello, J., Morigi, R., Sordet, O., ve Capranico, G. (2019). DNA damage and genome instability by G-quadruplex ligands are mediated by R loops in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 116(3), 816–825.
- Degirmencay, A., Thomas, S., Holler, A., Burgess, S., Morris, E. C., ve Stauss, H. J. (2024). Exploitation of CD3 ζ to enhance TCR expression levels and antigen-specific T cell function. *Frontiers in immunology*, 15, 1386132.
- Deiana, M., Andrés Castán, J. M., Josse, P., Kahsay, A., Sánchez, D. P., Morice, K., Gillet, N., Ravindranath, R., Patel, A. K., Sengupta, P., Obi, I., Rodriguez-Marquez, E., Khrouz, L., Dumont, E., Abad Galán, L., Allain, M., Walker, B., Ahn, H. S.,

- Maury, O., Blanchard, P., ... Sabouri, N. (2023). A new G-quadruplex-specific photosensitizer inducing genome instability in cancer cells by triggering oxidative DNA damage and impeding replication fork progression. *Nucleic acids research*, 51(12), 6264–6285.
- Dell'Oca, M. C., Quadri, R., Bernini, G. M., Menin, L., Grasso, L., Rondelli, D., Yazici, O., Sertic, S., Marini, F., Pelliccioli, A., Muzi-Falconi, M., ve Lazzaro, F. (2024). Spotlight on G-Quadruplexes: From Structure and Modulation to Physiological and Pathological Roles. *Int J Mol Sci.*, 25(6), 3162.
- Deng, G., Zhou, L., Wang, B., Sun, X., Zhang, Q., Chen, H., (Ed.). (2022). Targeting cathepsin B by cycloastragenol enhances antitumor immunity of CD8 T cells via inhibiting MHC-I degradation. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10:e004874.
- Dixon, I.M., Lopez, F., Esteve, J.P., Tejera, A.M., Blasco, M.A., Pratviel, G., Meunier, B. (2005). Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *Chem Bio Chem.* 6:123–132.
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J.P., (Ed.). (2009). Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* 69:7653–7661.
- Dou, H., Mitra, S., ve Hazra, T. K. (2003). Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *The Journal of biological chemistry*, 278(50), 49679–49684.
- Dudek, M., López-Pacios, L., Sabouri, N., Nogueira, J. J., Martinez-Fernandez, L., ve Deiana, M. (2025). A Rationally Designed Azobenzene Photoswitch for DNA G-Quadruplex Regulation in Live Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 64(1), e202413000.
- Falabella, M., Kolesar, J. E., Wallace, C., de Jesus, D., Sun, L., Taguchi, Y. V., Wang, C., Wang, T., Xiang, I. M., Alder, J. K., Maheshan, R., Horne, W., Turek-Herman, J., Pagano, P. J., St Croix, C. M., Sondheimer, N., Yatsunyk, L. A., Johnson, F. B., ve Kaufman, B. A. (2019). G-quadruplex dynamics contribute to regulation of mitochondrial gene expression. *Scientific reports*, 9(1), 5605.
- Fattahi, F., Saeednejad Zanjani, L., Habibi Shams, Z. (Ed.). (2021). High expression of DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is associated with advanced pathological features in the patients with colorectal cancer. *Sci Rep* 11, 13626.
- Fay, M. M., Lyons, S. M., ve Ivanov, P. (2017). RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *Journal of molecular biology*, 429(14), 2127–2147.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, [Eriřim Tarihi 05.03.2025].

- Fernando, H., Sewitz, S., Darot, J., Tavaré, S., Huppert, J. L., ve Balasubramanian, S. (2009). Genome-wide analysis of a G-quadruplex-specific single-chain antibody that regulates gene expression. *Nucleic acids research*, 37(20), 6716–6722.
- Fleming, A. M., ve Burrows, C. J. (2020). Interplay of Guanine Oxidation and G-Quadruplex Folding in Gene Promoters. *Journal of the American Chemical Society*, 142(3), 1115–1136.
- Fleming, A. M., Zhu, J., Ding, Y., ve Burrows, C. J. (2017). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in the Context of a Gene Promoter G-Quadruplex Is an On-Off Switch for Transcription. *ACS chemical biology*, 12(9), 2417–2426.
- Franciszkievicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., ve Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer research*, 72(24), 6325–6332.
- Forman, S.L., Fetting, J.C., Pieraccini, S., Gottarelli, G., Davis, J.T. (2000). Toward Artificial Ion Channels: A Lipophilic G-Quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* 122:4060–4067.
- Garlanda, C., Di Ceglie, I., ve Jaillon, S. (2025). IL-1 family cytokines in inflammation and immunity. *Cellular & molecular immunology*, 22(11), 1345–1362.
- Gellert, M., Lipsett, M.N., Davies, D.R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48:2013–2018.
- Grand C.L., Han H., Munoz R.M., Weitman S., Von Hoff D.D., Hurley L.H., Bearss D.J. (2002). The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 1:565–573.
- Gray, L. T., Vallur, A. C., Eddy, J., ve Maizels, N. (2014). G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD. *Nature chemical biology*, 10(4), 313–318.
- Grisaru-Tal, S., Rothenberg, M.E. ve Munitz, A. (2022). Eosinophil–lymphocyte interactions in the tumor microenvironment and cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 23, 1309–1316.
- Guilbaud, G., Murat, P., Recolin, B., Campbell, B. C., Maiter, A., Sale, J. E., ve Balasubramanian, S. (2017). Local epigenetic reprogramming induced by G-quadruplex ligands. *Nature chemistry*, 9(11), 1110–1117.
- Gupta, P., Nath, S., Meena, R. C., ve Kumar, N. (2014). Comparative effects of hypoxia and hypoxia mimetic cobalt chloride on in vitro adhesion, biofilm formation and susceptibility to amphotericin B of *Candida glabrata*. *Journal de mycologie medicale*, 24(4), e169–e177.
- Gowan, S.M., Harrison, J.R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M.A., Neidle, S., Kelland, L.R. (2002). A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of

- telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol. Pharmacol.* 61:1154–1162.
- Haider, S., Parkinson, G. N., ve Neidle, S. (2002). Crystal structure of the potassium form of an Oxytricha nova G-quadruplex. *Journal of molecular biology*, 320(2), 189–200.
- Han H., Langley D.R., Rangan A., Hurley L.H. Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123:8902–8913.
- Hao, N, B., Lu, M, H., Fan, Y, H., Cao, Y, L., Zhang, Z, R., Yang, S, M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012:948098.
- Harrell, C. R., Simovic Markovic, B., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., Djonov, V., ve Volarevic, V. (2018). Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes. *Journal of biomedical science*, 25(1), 21.
- Hegyí H. (2015). Enhancer-promoter interaction facilitated by transiently forming G-quadruplexes. *Scientific reports*, 5, 9165.
- Hilton, J., Gelmon, K., Bedard, P.L., Tu, D., Xu, H., Tinker, A.V., Goodwin, R., Laurie, S.A., Jonker, D., Hansen, A.R., Veitch, Z.W., Renouf, D.J., Hagerman, L., Lui, H., Chen, B., Kellar, D., Li, I., Lee, S.E., Kono, T., Cheng, B.Y.C., Yap, D., Lai, D., Beatty, S., Soong, J., Pritchard, K.I., Soria-Bretones, I., Chen, E., Feilotter, H., Rushton, M., Seymour, L., Aparicio, S., Cescon, D.W. (2022). Results of the phase I CCTG IND.231 trial of CX-5461 in patients with advanced solid tumors enriched for DNA-repair deficiencies. *Nat Commun.* 13(1):3607.
- Huang, R., Wang, S., Wang, N., Zheng, Y., Zhou, J., Yang, B., Wang, X., Zhang, J., Guo, L., Wang, S., Chen, Z., Wang, Z., ve Xiang, S. (2020). CCL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β -catenin/STAT3 signaling. *Cell death & disease*, 11(4), 234.
- Hud, N.V., Smith, F.W., Anet, F.A.L., Feigon J. (1996). The selectivity for K^+ versus Na^+ in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR. *Biochemistry*, 35, 15383–15390.
- Huppert, J. L., ve Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic acids research*, 35(2), 406–413.
- Huppert, J.L., ve Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 33 2908 2916
- Hynes, RO. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326:1216–9.
- Ionescu, C., Oprea, B., Ciobanu, G., Georgescu, M., Bică, R., Mateescu, G., (Ed.). (2022). The angiogenic balance and its implications in cancer and cardiovascular diseases: an overview. *Medicina*. 58:903.

- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D. (Ed.). (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 20, 485–503.
- Jöhrer, K., Pleyer, L., Olivier, A., Maizner, E., Zelle-Rieser, C., ve Greil, R. (2008). Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert opinion on biological therapy*, 8(3), 269–290.
- Kadomoto, S., Izumi, K., ve Mizokami, A. (2021). Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8530.
- Kalluri, R., Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:392–401.
- Kanduri, M., Subhash, S., Putino, R. (Ed.). (2025). IER3: exploring its dual function as an oncogene and tumor suppressor. *Cancer Gene Ther* 32, 450–463.
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., (Ed.). (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*. 13:89.
- Kazantzis, M., ve Stahl, A. (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(5), 852–857.
- Kench, T., Summers, P. A., Kuimova, M. K., Lewis, J. E. M., ve Vilar, R. (2021). Rotaxanes as Cages to Control DNA Binding, Cytotoxicity, and Cellular Uptake of a Small Molecule. *Angewandte Chemie*, 60(19), 10928–10934.
- Kharel, P., Balaratnam, S., Beals, N., ve Basu, S. (2020). The role of RNA G-quadruplexes in human diseases and therapeutic strategies. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 11(1), e1568.
- Kim M.Y., Gleason-Guzman M., Izbicka E., Nishioka D., Hurley L.H. (2003). The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Res*. 63:3247–3256.
- Kishimoto, T. ve Kang, S. (2022). IL-6 revisited: from rheumatoid arthritis to CAR T cell therapy and COVID-19. *Annu. Rev. Immunol*. 40, 323–348.
- Kloor, M., Michel, S. and von Knebel Doeberitz, M. (2010), Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int. J. Cancer*, 127: 1001-1010.
- Kufe, D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 9(12), 874–885.
- Kwan, I. C., She, Y. M., ve Wu, G. (2007). Trivalent lanthanide metal ions promote formation of stacking G-quartets. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (41), 4286–4288.

- Kwok, C. K., Marsico, G., Sahakyan, A. B., Chambers, V. S., ve Balasubramanian, S. (2016). rG4-seq reveals widespread formation of G-quadruplex structures in the human transcriptome. *Nature methods*, 13(10), 841–844.
- Kosiol, N., Juranek, S., Brossart, P., Heine, A., ve Paeschke, K. (2021). G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy. *Molecular cancer*, 20(1), 40.
- Labani-Motlagh, A, Ashja-Mahdavi, M and Loskog, A. (2020) The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front. Immunol.* 11:940.
- Lee, H. T., Bose, A., Lee, C. Y., Opresko, P. L., ve Myong, S. (2017). Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic acids research*, 45(20), 11752–11765.
- Legendre, C., Reen, F. J., Mooij, M. J., McGlacken, G. P., Adams, C., ve O'Gara, F. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkyl quinolones repress hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling through HIF-1 α degradation. *Infection and immunity*, 80(11), 3985–3992.
- Lemmens, B., van Schendel, R., ve Tijsterman, M. (2015). Mutagenic consequences of a single G-quadruplex demonstrate mitotic inheritance of DNA replication fork barriers. *Nature communications*, 6, 8909.
- Li, F.Z., Wu, Z., Lin, C., Wang, Q., Kuang, G.C. (2022). Photophysical properties regulation and applications of BODIPY-based derivatives with electron donor-acceptor system. *Result in Chemistry*, Vol 4, 100384.
- Li, H. Y., Cao, H. W., Lang, X. X., Chen, Y. S., ve Wang, M. Q. (2022). Selective *c-MYC* G4 DNA recognition based on a fluorescent light-up probe with disaggregation-induced emission characteristics. *Journal of materials chemistry. B*, 10(38), 7772–7779.
- Li, J. H., You, P. D., Lu, F., Tang, H. Y., Guo, H. Y., ve Zhou, C. Q. (2023). NIR C-Myc Pu22 G-quadruplex probe as a photosensitizer for bioimaging and antitumor study. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 294, 122533.
- Li, L., Williams, P., Ren, W., Wang, M. Y., Gao, Z., Miao, W., Huang, M., Song, J., ve Wang, Y. (2021). YY1 interacts with guanine quadruplexes to regulate DNA looping and gene expression. *Nature chemical biology*, 17(2), 161–168.
- Li, X. F., ve O'Donoghue, J. A. (2008). Hypoxia in microscopic tumors. *Cancer letters*, 264(2), 172–180.
- Li, X., Wang, J. (2020). Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *Int J Biol Sci.* 16:2014–28.

- Linden, G., Zhang, L., Pieck, F., Linne, U., Kosenkov, D., Tonner, R., Vázquez, O. (2019). Conditional Singlet Oxygen Generation through a Bioorthogonal DNA-targeted Tetrazine Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58 (37), pp. 12868-12873.
- London, T. B., Barber, L. J., Mosedale, G., Kelly, G. P., Balasubramanian, S., Hickson, I. D., Boulton, S. J., ve Hiom, K. (2008). FANCDJ is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), 36132–36139.
- Lotfi, R., Lotze, M.T. (2008). Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *J Leukoc Biol.* 83:456–60.
- Loudet, A., ve Burgess, K. (2007). BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chemical reviews*, 107(11), 4891–4932.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, VM., Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *CSH Perspect Biol.* 3:a5058.
- Luo, BH., Carman, CV., Springer, TA. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 25:619–47.
- Ma, X., Bi, E., Lu, Y., Su, P., Huang, C., Liu, L., (Ed.). (2019). Cholesterol induces CD8⁺ T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Metab.* 30:143–56.
- Ma, Y., Bao, Y., Wu, L., Ke, Y., Tan, L., Ren, H., Song, J., Zhang, Q., ve Jin, Y. (2022). IL-8 exacerbates CCl₄-induced liver fibrosis in human IL-8-expressing mice via the PI3K/Akt/HIF-1 α pathway. *Molecular immunology*, 152, 111–122.
- Ma, Y., Iida, K., ve Nagasawa, K. (2020). Topologies of G-quadruplex: Biological functions and regulation by ligands. *Biochemical and biophysical research communications*, 531(1), 3–17.
- Machireddy, B., Kalra, G., Jonnalagadda, S., Ramanujachary, K., Wu, C. (2017). Probing the binding pathway of BRACO19 to a parallel-stranded human telomeric G-quadruplex using molecular dynamics binding simulation with AMBER DNA o15 and ligand GAFF2 force fields. *J. Chem. Inf. Model.* 57:2846–2864.
- Madireddy, A., Purushothaman, P., Loosbroock, C. P., Robertson, E. S., Schildkraut, C. L., ve Verma, S. C. (2016). G-quadruplex-interacting compounds alter latent DNA replication and episomal persistence of KSHV. *Nucleic acids research*, 44(8), 3675–3694.
- Maimela, N.R., Liu, S., ve Zhang, Y. (2018). Fates of CD8⁺ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 1–13.
- Mani, P., Yadav, V. K., Das, S. K., ve Chowdhury, S. (2009). Genome-wide analyses of recombination prone regions predict role of DNA structural motif in recombination. *PloS one*, 4(2), e4399.

- Malkov, M. I., Lee, C. T., ve Taylor, C. T. (2021). Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. *Cells*, 10(9), 2340.
- Mantovani A. (2005). Cancer: inflammation by remote control. *Nature*, 435(7043), 752–753.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677–86.
- Masud, T., Soong, C., Xu, H., Biele, J., Bjornson, S., McKinney, S., Aparicio, S. (2021). Ubiquitin-mediated DNA damage response is synthetic lethal with G-quadruplex stabilizer CX-5461. *Sci. Rep.* 11:9812.
- McKeown S.R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *The British journal of radiology*, 87(1035), 20130676.
- Miglietta, G., Russo, M., Duardo, R. C., ve Capranico, G. (2021). G-quadruplex binders as cytostatic modulators of innate immune genes in cancer cells. *Nucleic acids research*, 49(12), 6673–6686.
- Motz, G.T. ve Coukos, G. (2011). The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 702–711.
- Moye, A. L., Porter, K. C., Cohen, S. B., Phan, T., Zyner, K. G., Sasaki, N., Lovrecz, G. O., Beck, J. L., ve Bryan, T. M. (2015). Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nature communications*, 6, 7643.
- Mukherjee, A., Bilecz, A. J., ve Lengyel, E. (2022). The adipocyte microenvironment and cancer. *Cancer metastasis reviews*, 41(3), 575–587.
- Muñoz-Sánchez, J., ve Cháñez-Cárdenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of applied toxicology : JAT*, 39(4), 556–570.
- Nakamura, T., Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:588–610.
- Nguyen, T. Q. N., Lim, K. W., ve Phan, A. T. (2017). A Dual-Specific Targeting Approach Based on the Simultaneous Recognition of Duplex and Quadruplex Motifs. *Scientific reports*, 7(1), 11969.
- Nirala, B. K., ve Yustein, J. T. (2025). The Role of MYC in Tumor Immune Microenvironment Regulation: Insights and Future Directions. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 30(9), 37304.
- Noy, R., Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 41:49–61.

- Ou, T. M., Lu, Y. J., Tan, J. H., Huang, Z. S., Wong, K. Y., ve Gu, L. Q. (2008). G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*, 3(5), 690–713.
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., ve Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 583084.
- Paramasivan, S., Rujan, I., ve Bolton, P. H. (2007). Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods (San Diego, Calif.)*, 43(4), 324–331.
- Park, Y. J., Song, B., Kim, Y. S., Kim, E. K., Lee, J. M., Lee, G. E., Kim, J. O., Kim, Y. J., Chang, W. S., ve Kang, C. Y. (2013). Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, 73(18), 5669–5681.
- Parkinson, G.N., Ghosh, R., Neidle, S. (2007). Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry*. 46(9):2390-7.
- Parkinson, G.N., Lee, M.P., Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, 417, 876-880.
- Pavlova, A. V., Kubareva, E. A., Monakhova, M. V., Zvereva, M. I., ve Dolinnaya, N. G. (2021). Impact of G-Quadruplexes on the Regulation of Genome Integrity, DNA Damage and Repair. *Biomolecules*, 11(9), 1284.
- Peix, F., Casanovas, O. (2022). Promalignant effects of antiangiogenics in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 86:199–206.
- Pello, O. M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., Amabile, A., Doni, A., Nebuloni, M., Swigart, L. B., Evan, G. I., Mantovani, A., ve Locati, M. (2012). Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood*, 119(2), 411–421.
- Phan, A. T., Modi, Y. S., ve Patel, D. J. (2004). Two-repeat Tetrahymena telomeric d(TGGGGTTGGGGT) Sequence interconverts between asymmetric dimeric G-quadruplexes in solution. *Journal of molecular biology*, 338(1), 93–102.
- Phillips, K., Dauter, Z., Murchie, A. I., Lilley, D. M., ve Luisi, B. (1997). The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 273(1), 171–182.
- Pinchuk, IV., Saada, JI., Beswick, EJ., Boya, G., Qiu, SM., Mifflin, RC., (Ed.). (2008). PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology*. 135:1228–37.
- Poetsch A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 207–219.

- Procopio, M., Laszlo, C., Labban, DA., Kim, DE., Bordignon, P., Jo, S., (Ed.). (2015). Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nat Cell Biol.* 17:1193–204.
- Purkayastha, P., Jaiswal, MK., Lele, TP. (2021). Molecular cancer cell responses to solid compressive stress and interstitial fluid pressure. *Cytoskeleton.* 78:312–22.
- Ramos-Soriano, J., Jiang, Y. J., Deng, B., O Hagan, M. P., Rao, A. G., Lu, D., Haldar, S., Oliveira, A. S. F., Mulholland, A. J., ve Galan, M. C. (2025). Bridged Azobenzene Exhibits Fully Reversible Photocontrolled Binding to a G-Quadruplex DNA/Duplex Junction. *JACS Au*, 5(8), 3846–3857.
- Rašková, M., Lacina, L., Kejík, Z., Venhauerová, A., Skaličková, M., Kolář, M., Jakubek, M., Rosel, D., Smetana, K., Jr, ve Brábek, J. (2022). The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis-Overview and Therapeutic Opportunities. *Cells*, 11(22), 3698.
- Redstone, S. C. J., Fleming, A. M., ve Burrows, C. J. (2019). Oxidative Modification of the Potential G-Quadruplex Sequence in the PCNA Gene Promoter Can Turn on Transcription. *Chemical research in toxicology*, 32(3), 437–446.
- Rhodes, D., ve Lipps, H. J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic acids research*, 43(18), 8627–8637.
- Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A., Kzhyshkowska, J. (2014). Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 5:75.
- Richl, T., Kuper, J., ve Kisker, C. (2024). G-quadruplex-mediated genomic instability drives SNVs in cancer. *Nucleic acids research*, 52(5), 2198–2211.
- Rodriguez, R., Muller, S., Yeoman, J.A., Trentesaux, C., Riou, J.F., Balasubramanian, S. (2008). A novel small molecule that alters shelterin integrity and triggers a DNA-damage response at telomeres. *J. Am. Chem. Soc.* 130:15758–15759.
- Rossin, A., Miloro, G., ve Hueber, A. O. (2019). TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers*, 11(5), 639.
- Rutherford, S. T., ve Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), a012427.
- Rutherford, S. T., ve Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), a012427.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., ve Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087–21113.

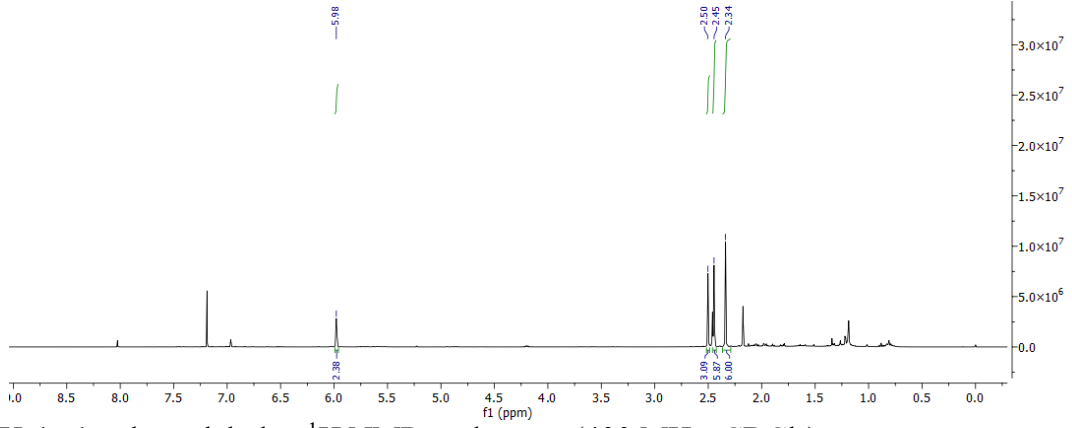
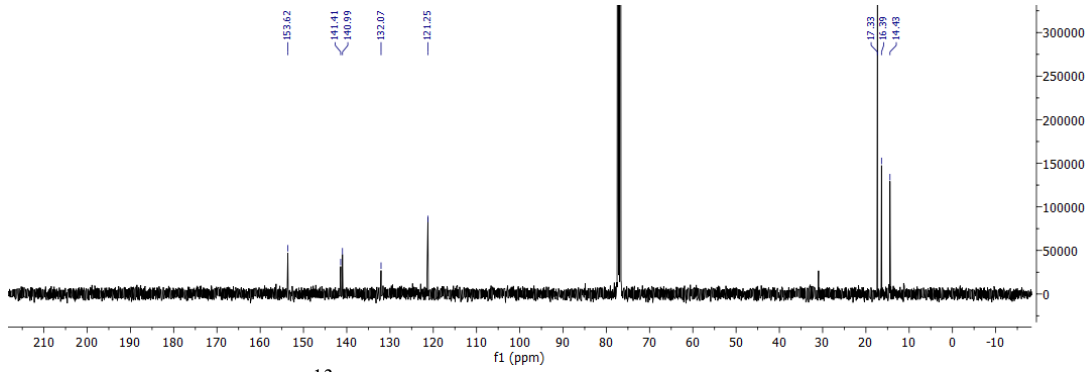
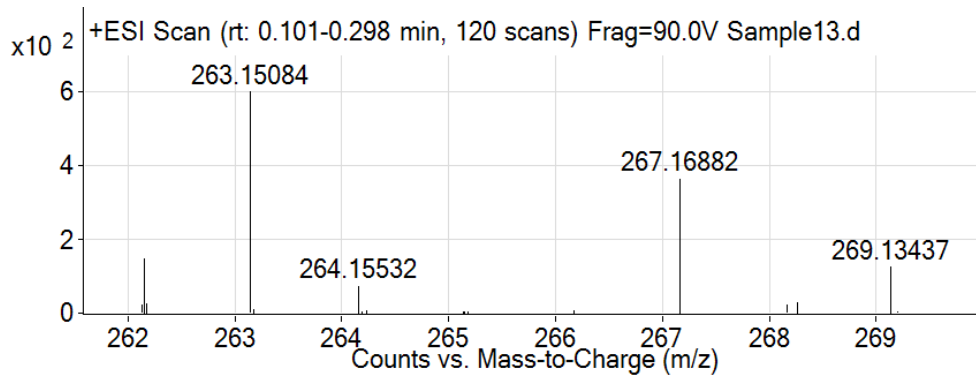
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., ve Plückthun, A. (2001). In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15), 8572–8577.
- Sektioglu, I.M., Carretero, R., Bulbuc, N., Bald, T., Tuting, T., Rudensky, A.Y., (Ed.). (2017). Basophils promote tumor rejection via chemotaxis and infiltration of CD8+ T cells. *Cancer Res.* 77:291–302.
- Semenza, GL. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 33:207–14.
- Sen, D., ve Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*, 334(6180), 364–366.
- Sharma, M., Das, M., Stephen-Victor, E., Galeotti, C., Karnam, A., Maddur, M.S., (Ed.). (2018). Regulatory T cells induce activation rather than suppression of human basophils. *Sci Immunol.* 3:eaan0829.
- Siddiqui-Jain A., Grand C.L., Bearss D.J., Hurley L.H. (2002). Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:11593–11598.
- Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y., Seto, H. (2001). Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1262–1263.
- Song, K. S., Lee, W. J., Chung, K. C., Koo, J. S., Yang, E. J., Choi, J. Y., ve Yoon, J. H. (2003). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 23243–23250.
- Stroik, S., Kurtz, K., Lin, K., Karachenets, S., Myers, C. L., Bielinsky, A. K., ve Hendrickson, E. A. (2020). EXO1 resection at G-quadruplex structures facilitates resolution and replication. *Nucleic acids research*, 48(9), 4960–4975.
- Sullivan, R., Paré, GC., Frederiksen, LJ., Semenza, GL., Graham, CH. (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther.* 7:1961–73.
- Sun, J., Corradini, S., Azab, F., Shokeen, M., Muz, B., Miari, K. E., Maksimos, M., Diedrich, C., Asare, O., Alhallak, K., Park, C., Lubben, B., Chen, Y., Adebayo, O., Bash, H., Kelley, S., Fiala, M., Bender, D. E., Zhou, H., Wang, S., Azab, A. K. (2024). IL-10R inhibition reprograms tumor-associated macrophages and reverses drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia*, 38(11), 2355–2365.

- Sun, J., Zhang, H., Wei, W. (Ed.). (2023). Regulation of CD8⁺ T cells infiltration and immunotherapy by circMGA/HNRNPL complex in bladder cancer. *Oncogene* 42, 1247–1262.
- Sun, Z. Y., Wang, X. N., Cheng, S. Q., Su, X. X., ve Ou, T. M. (2019). Developing Novel G-Quadruplex Ligands: from Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid-Protein Interaction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3), 396.
- Swann, J. B., ve Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1137–1146.
- Takahama, K., Takada, A., Tada, S., Shimizu, M., Sayama, K., Kurokawa, R., ve Oyoshi, T. (2013). Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS. *Chemistry & biology*, 20(3), 341–350.
- Takahashi, H., Sakakura, K., Kudo, T., Toyoda, M., Kaira, K., Oyama, T., (Ed.). (2017). Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget*. 8:8633–47.
- Thai, P., Loukoianov, A., Wachi, S., ve Wu, R. (2008). Regulation of airway mucin gene expression. *Annual review of physiology*, 70, 405–429.
- Theruvathu, J. A., Darwanto, A., Hsu, C. W., ve Sowers, L. C. (2014). The effect of Pot1 binding on the repair of thymine analogs in a telomeric DNA sequence. *Nucleic acids research*, 42(14), 9063–9073.
- Treibs, A., Kreuzer, F.H. (1968). Difluorboryl-komplexe von di-und tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Der Chem.*, 718, 208–223.
- Truch, J., Downes, D. J., Scott, C., Gür, E. R., Telenius, J. M., Repapi, E., Schwessinger, R., Gosden, M., Brown, J. M., Taylor, S., Cheong, P. L., Hughes, J. R., Higgs, D. R., ve Gibbons, R. J. (2022). The chromatin remodeller ATRX facilitates diverse nuclear processes, in a stochastic manner, in both heterochromatin and euchromatin. *Nature communications*, 13(1), 3485.
- Valton, A. L., ve Prioleau, M. N. (2016). G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity?. *Trends in genetics*, 32(11), 697–706.
- Valton, A. L., Hassan-Zadeh, V., Lema, I., Boggetto, N., Alberti, P., Saintomé, C., Riou, J. F., ve Prioleau, M. N. (2014). G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *The EMBO journal*, 33(7), 732–746.
- van Wietmarschen, N., Merzouk, S., Halsema, N., Spierings, D. C. J., Guryev, V., ve Lansdorp, P. M. (2018). BLM helicase suppresses recombination at G-quadruplex motifs in transcribed genes. *Nature communications*, 9(1), 271.
- Varricchi, G., Loffredo, S., Galdiero, M.R., Marone, G., Cristinziano, L., Granata, F., (Ed.). (2018). Innate effector cells in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Immunol*. 53:152–60.

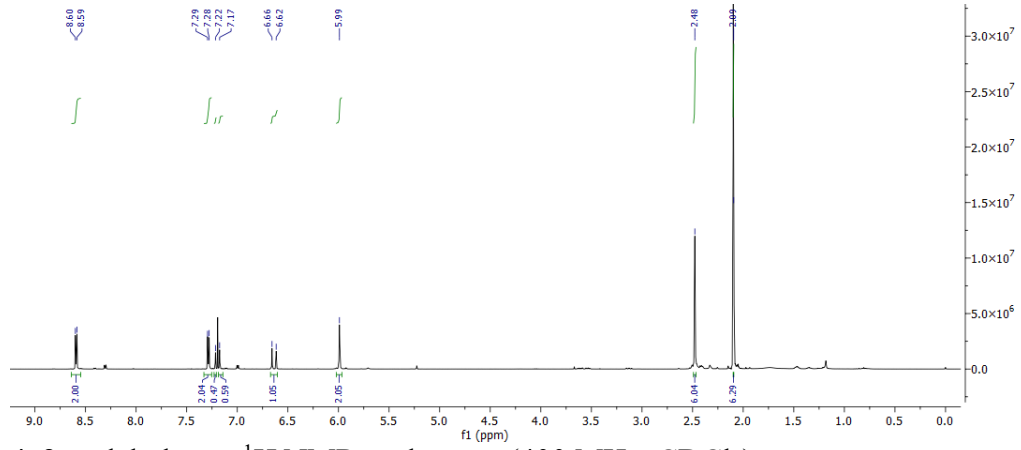
- Varshney, D., Spiegel, J., Zyner, K. (Ed.). (2020). The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 459–474.
- Voronov, E., Carmi, Y., ve Apte, R. N. (2014). The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Frontiers in physiology*, *5*, 114.
- Wang, Y., ve Patel, D. J. (1993). Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure*, *1*(4), 263–282.
- Wang, Y., Zhou, H., Ju, S., Dong, X., Zheng, C. (2025) The solid tumor microenvironment and related targeting strategies: a concise review. *Front. Immunol.* *16*:1563858.
- Wang, Z., He, X., Zhang, X., Spiegel, J., Flynn, S. M., ve Balasubramanian, S. (2026). Degradation of G-quadruplex-binding proteins in chromatin using G4-ligand-based proteolysis-targeting chimeras. *Nature chemistry*, 10.1038/s41557-026-02111-y.
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927). The Metabolism Of Tumors In The Body. *J Gen Physiol.* *8*:519–30.
- Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M. (Ed.). (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *20*, 7–24.
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K. B., Lee, C. N., ve Hsieh, C. Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, *22*(10), 1517–1527.
- Wei, D., Todd, A. K., Zloh, M., Gunaratnam, M., Parkinson, G. N., ve Neidle, S. (2013). Crystal structure of a promoter sequence in the B-raf gene reveals an intertwined dimer quadruplex. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(51), 19319–19329.
- Worsley, CM., Veale, RB., Mayne, ES. (2022). The acidic tumour microenvironment: Manipulating the immune response to elicit escape. *Hum Immunol.* *83*:399–408.
- Xiang, X., Poliakov, A., Liu, C., Liu, Y., Deng, Z.B., Wang, J., (Ed.). (2009). Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer.* *124*:2621–33.
- Yi, M., Li, T., Niu, M. (Ed.). (2024). Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 176.
- Zhang, D. H., Fujimoto, T., Saxena, S., Yu, H. Q., Miyoshi, D., ve Sugimoto, N. (2010). Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors. *Biochemistry*, *49*(21), 4554–4563.
- Zhang, L., Er, J. C., Ghosh, K. K., Chung, W. J., Yoo, J., Xu, W., Zhao, W., Phan, A. T., ve Chang, Y. T. (2014). Discovery of a structural-element specific G-quadruplex "light-up" probe. *Scientific reports*, *4*, 3776.

- Zhang, S., Wu, Y., Zhang, W. (2014). G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands. *ChemMedChem*, 9(5), 899–911.
- Zhang, X., Dhir, S., Melidis, L., Chen, Y., Yu, Z., Simeone, A., Spiegel, J., Adhikari, S., ve Balasubramanian, S. (2025). Optical control of gene expression using a DNA G-quadruplex targeting reversible photoswitch. *Nature chemistry*, 17(6), 875–882.
- Zhang, X., Wang, J., ve Hu, M. H. (2024). Promising G-Quadruplex-Targeted Dibenzoquinoxaline Type-1 Photosensitizer Triggers DNA Damage in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ACS pharmacology & translational science*, 7(7), 2174–2184.
- Zheng, N., Zhang, S., Wu, W., Zhang, N., Wang, J. (2021). Regulatory mechanisms and therapeutic targeting of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Pharmacol Res.* 166:105507.
- Zhou, J., Bourdoncle, A., Rosu, F., Gabelica, V., ve Mergny, J. L. (2012). Tri-G-quadruplex: controlled assembly of a G-quadruplex structure from three G-rich strands. *Angewandte Chemie*, 124(44), 11164-11167.
- Żubertowski, J., Rapp, M., Dolicher, J., Rubiś, B., ve Dembska, A. (2025). Investigation of simple BODIPY dyes as G-quadruplex recognizing ligands. *RSC advances*, 15(7), 5220–5231.

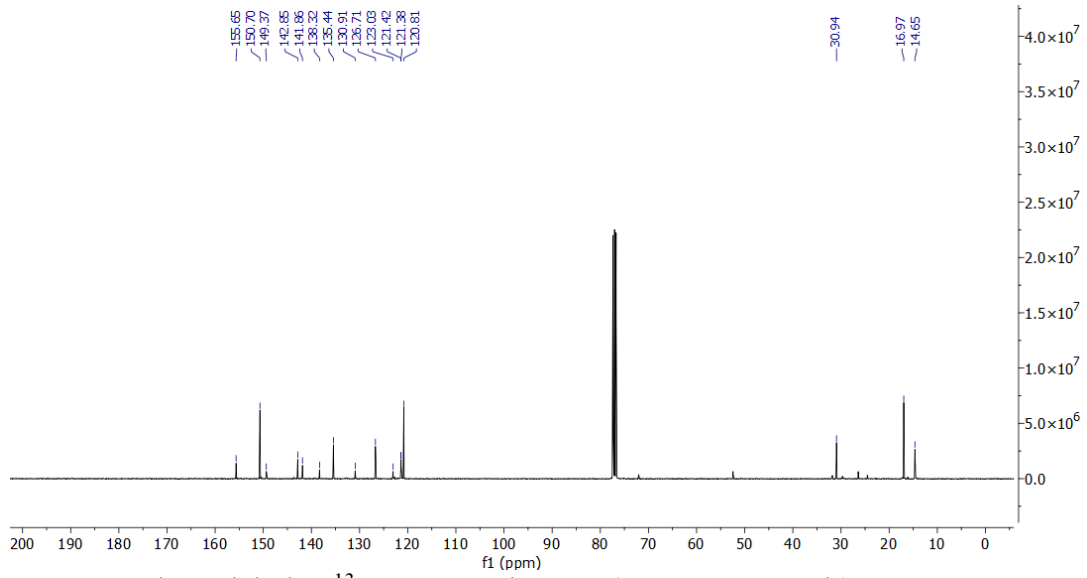
EKLER

EK-1. 1 nolu molekülün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).EK-2. 1 nolu molekülün ^{13}C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl_3).

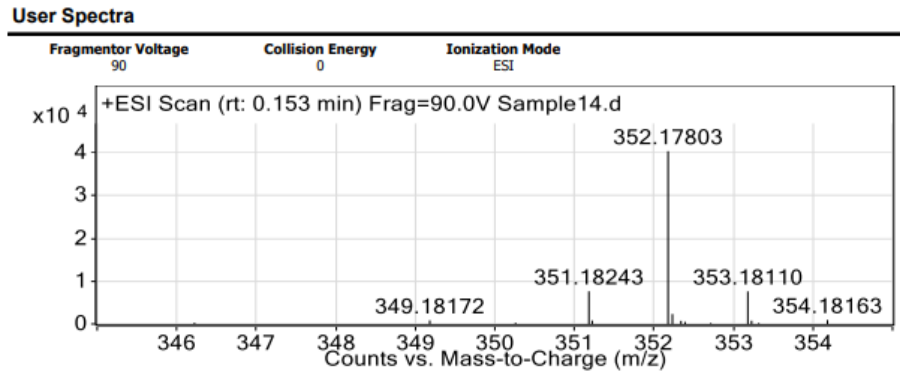
EK-3. 1 nolu molekülün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)



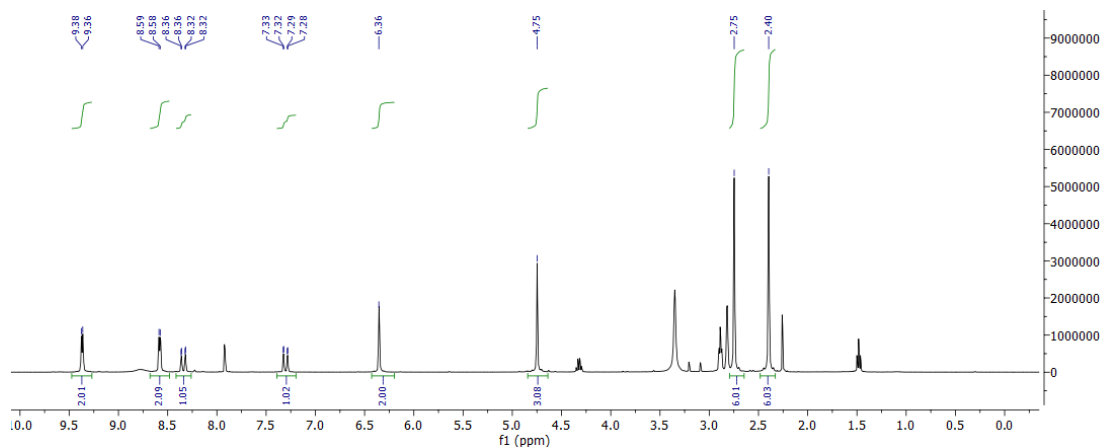
EK-4. 2 molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



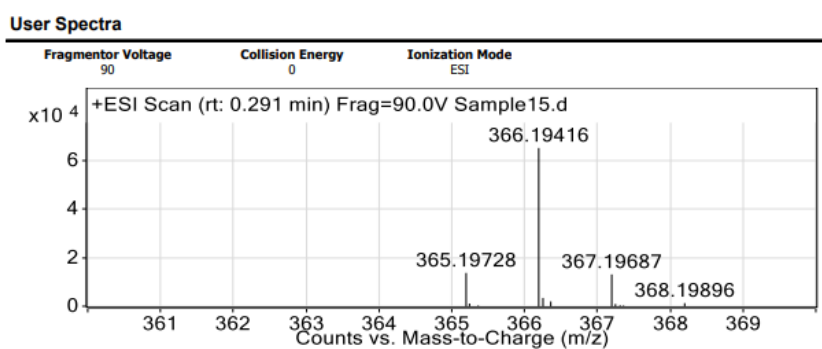
EK-5. 2 nolu molekülün ¹³C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl₃).



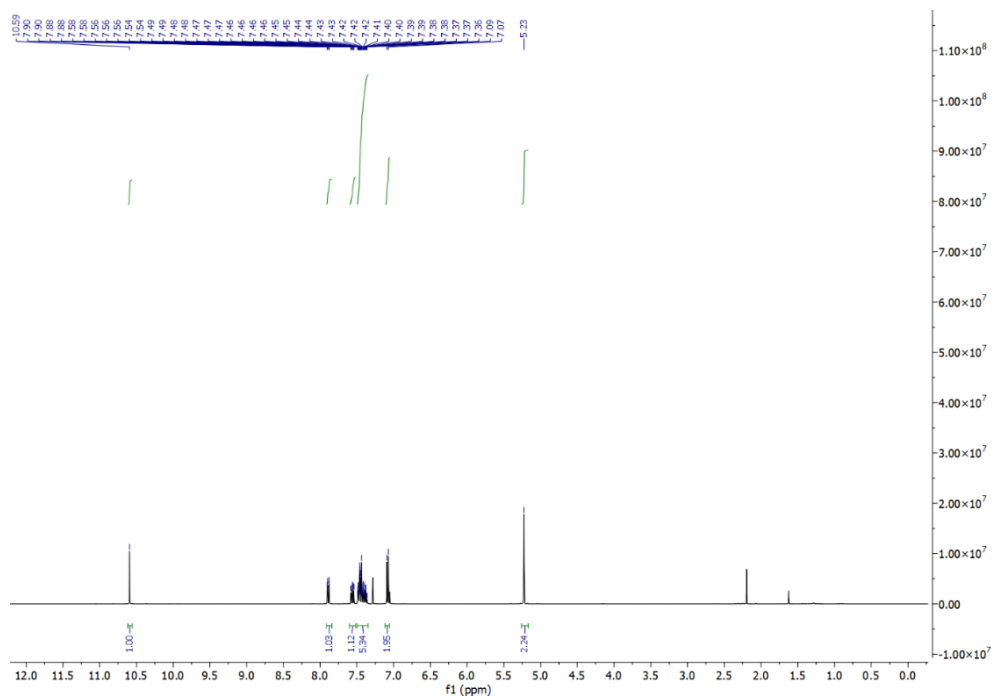
EK-6. 2 molekülünün kütle spektrumu.



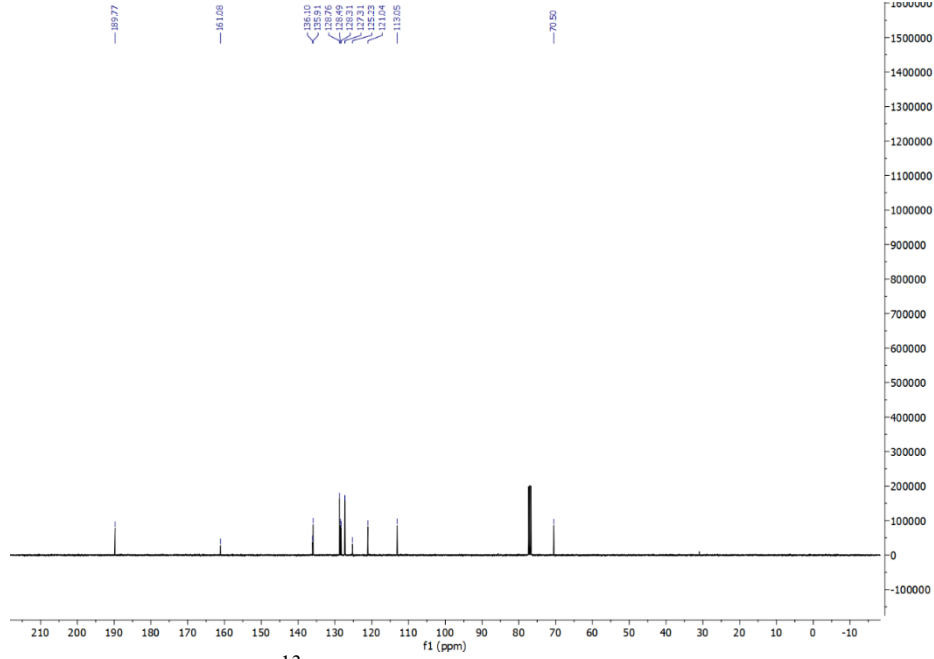
EK-7. NGL-1 molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

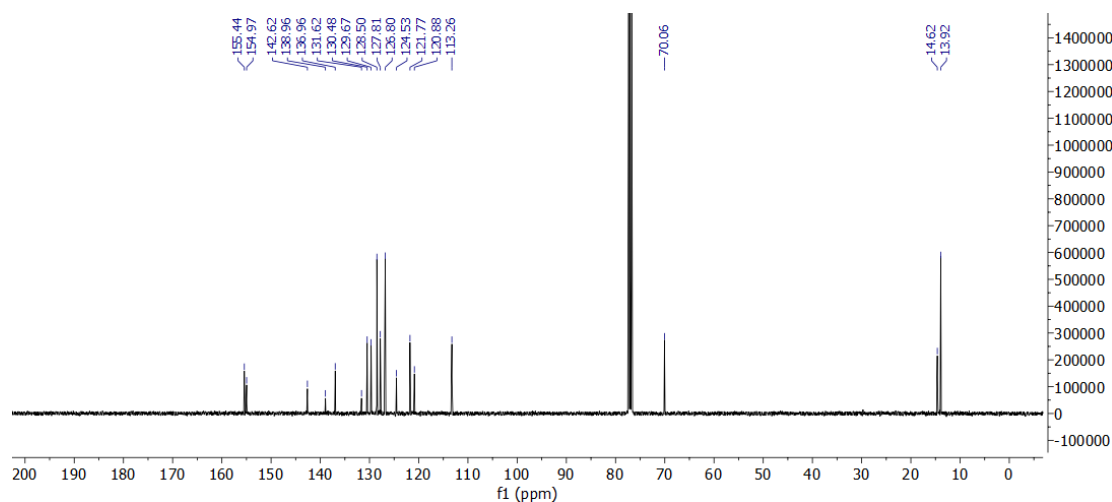


EK-8. NGL-1 molekülünün kütle spektrumu.

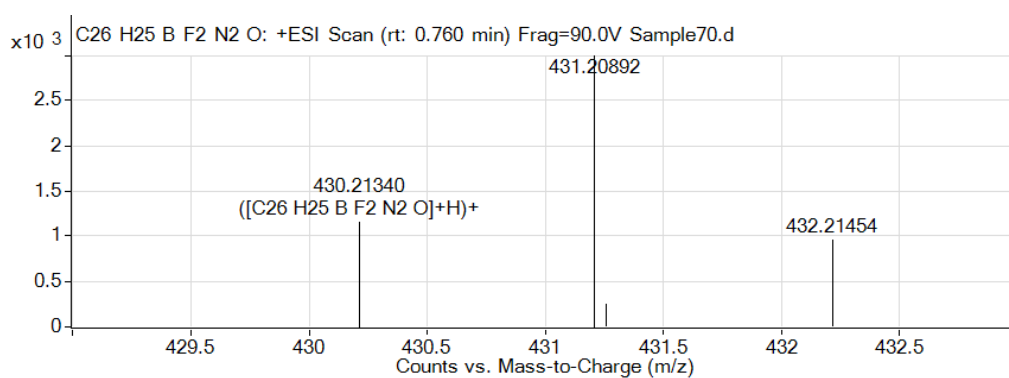


EK-9. 3 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

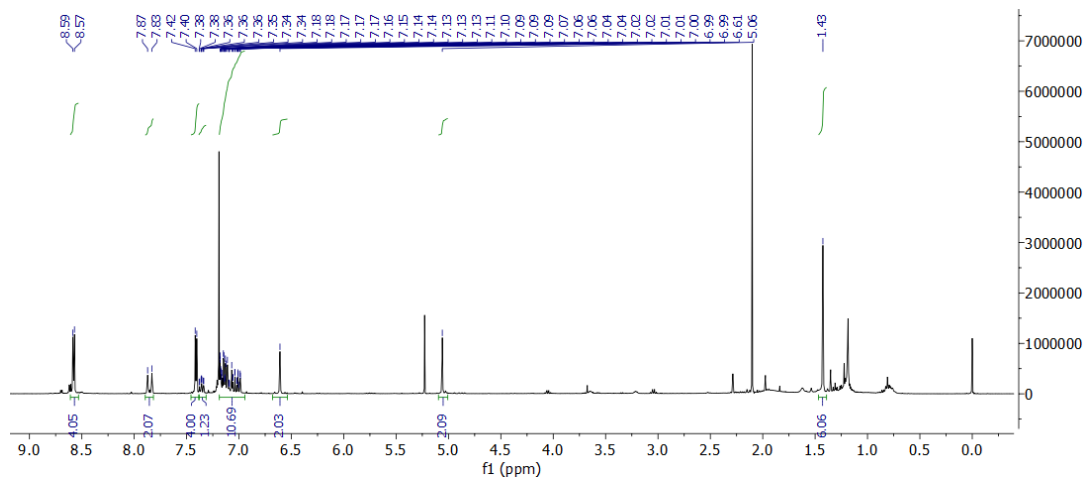




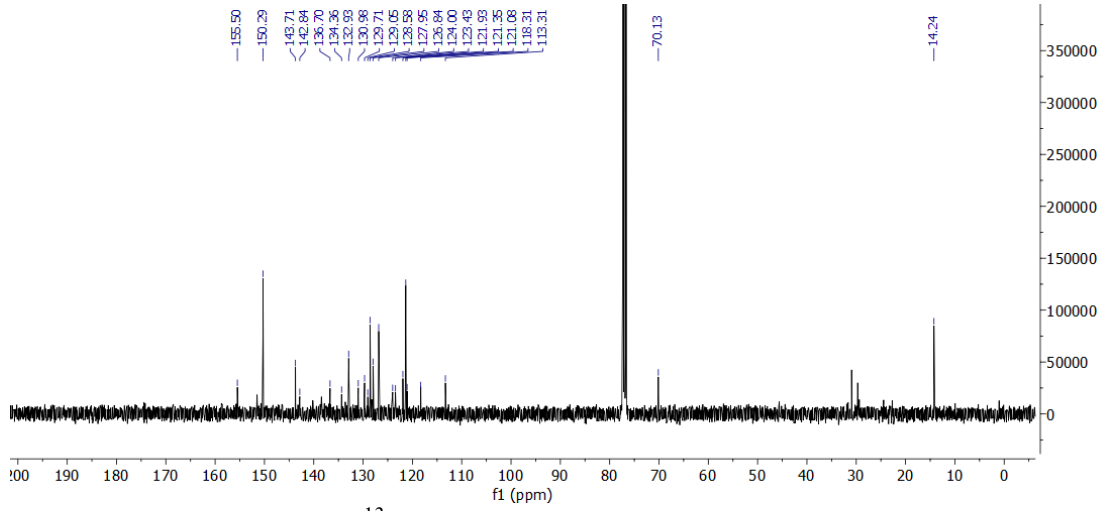
EK-13. 4 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



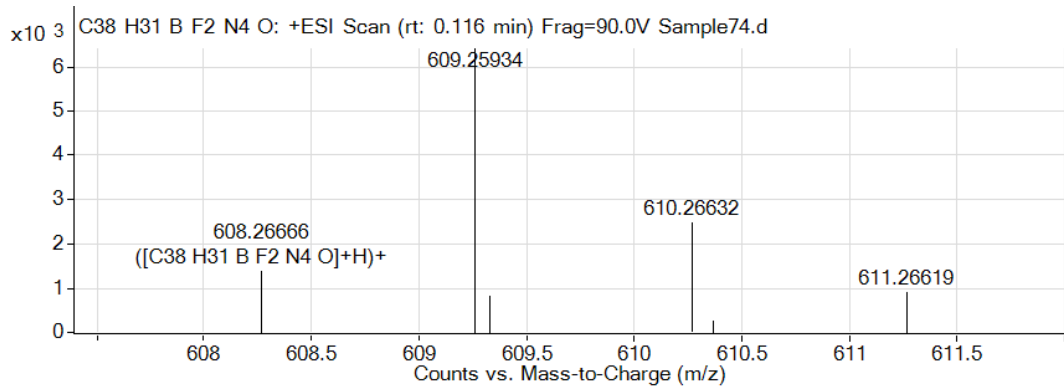
EK-14. 4 nolu molekülünün kütle spektrumu.



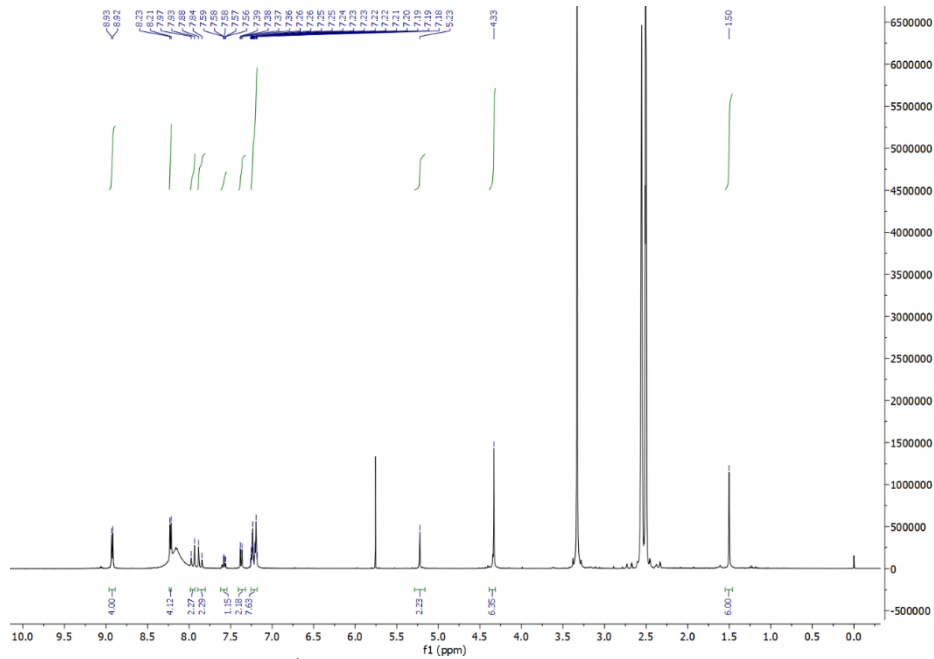
EK-15. 5 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



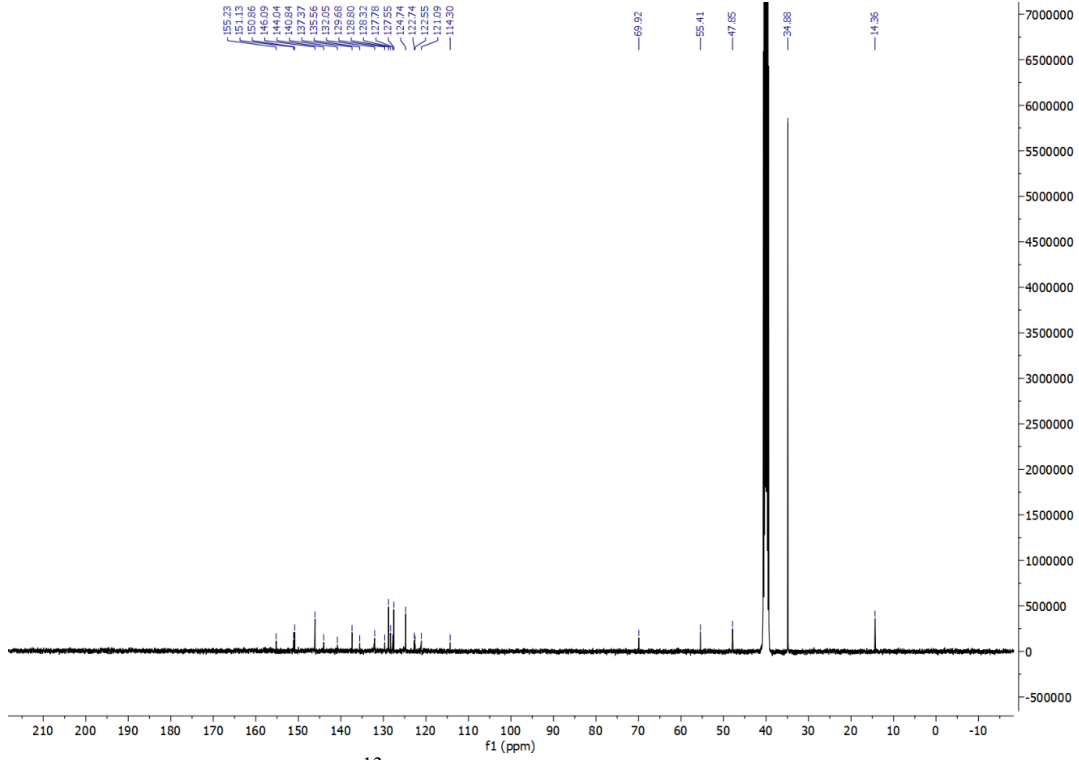
EK-16. 5 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



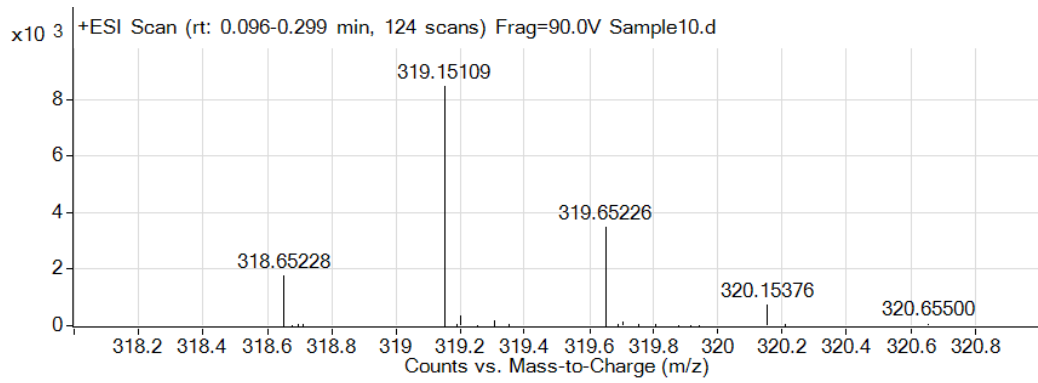
EK-17. 5 nolu molekülünün kütle spektrumu.



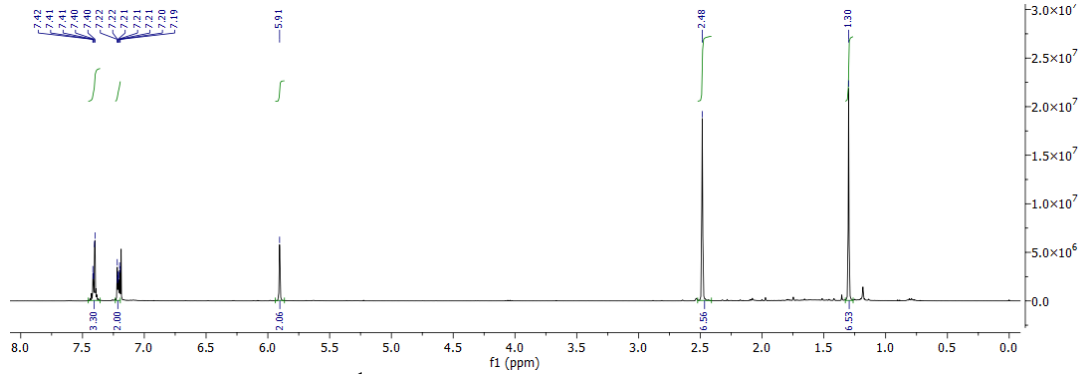
EK-18. NGL-2 molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



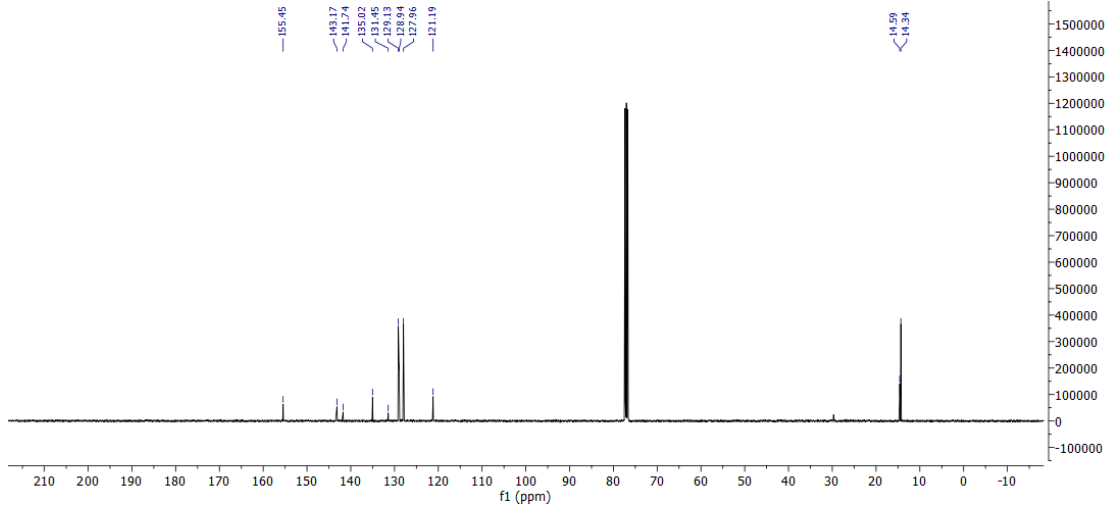
EK-19. NGL-2 molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



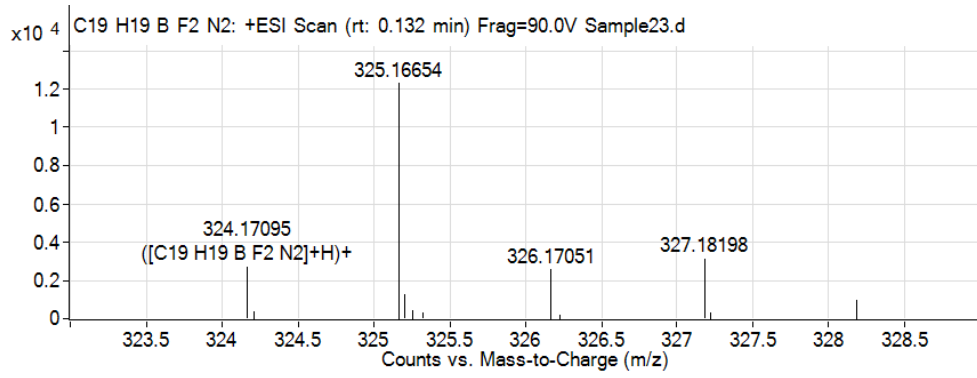
EK-20. NGL-2 molekülünün kütle spektrumu



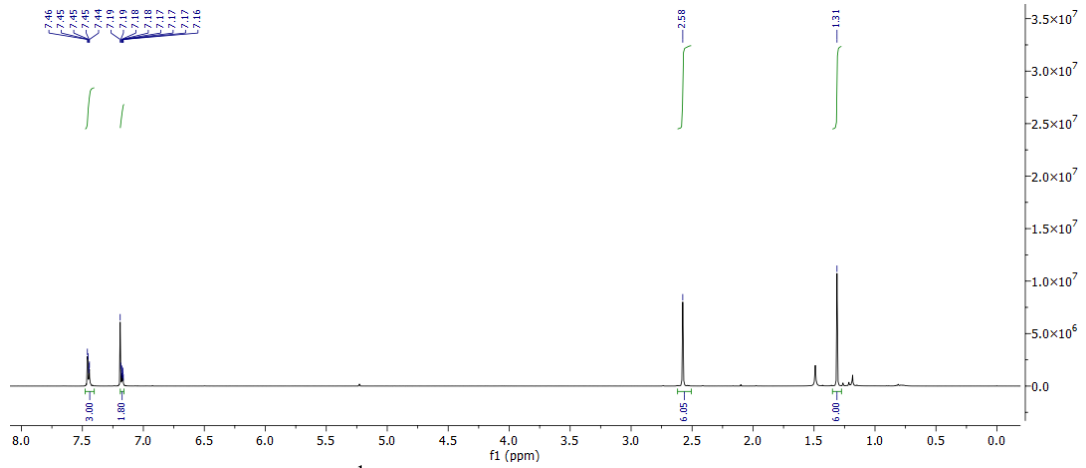
EK-21. 6 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



EK-22. 6 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



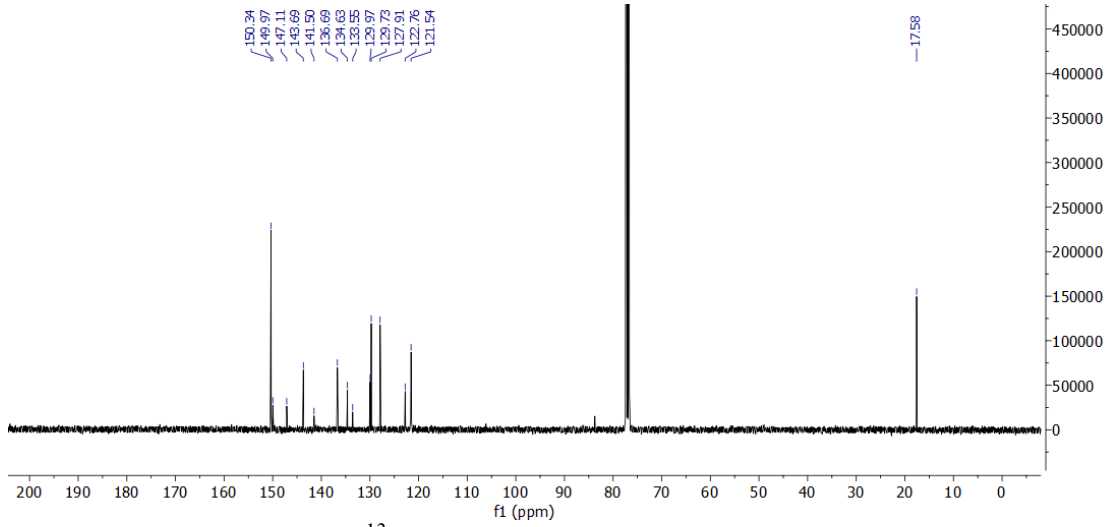
EK-23. 6 nolu molekülün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)



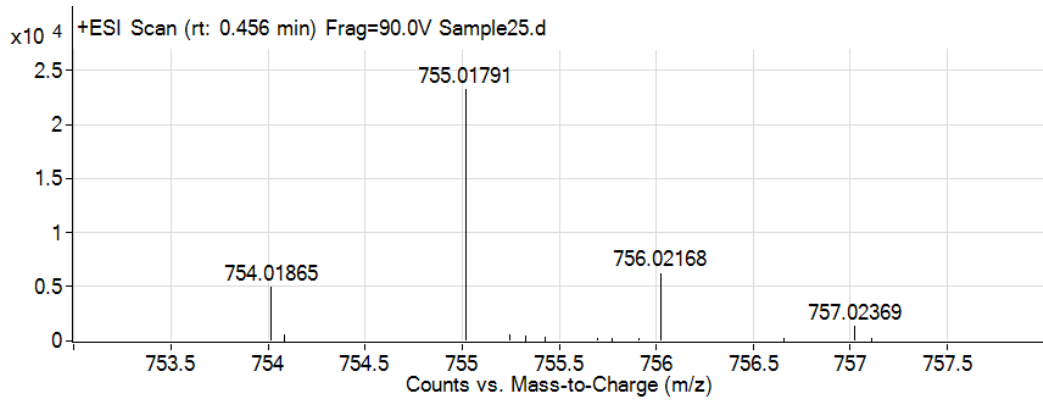
EK-24. 7 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

Mass spectrum plot showing relative intensity (Y-axis, 0 to 5 x 10³) versus mass-to-charge ratio (X-axis, 574.5 to 578.5). The plot is titled "C19 H17 B F2 I2 N2: +ESI Scan (rt: 0.103 min) Frag=90.0V Sample24.d". The base peak is at m/z 575.95579. Other labeled peaks include m/z 574.95886, which is identified as [C19 H17 B F2 I2 N2]⁺, and a smaller peak at m/z 577.0.

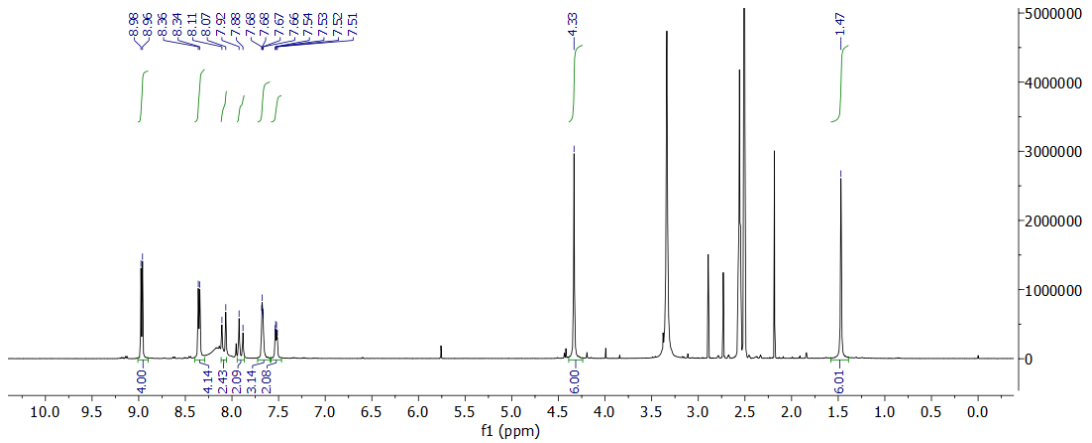
EK-27. 8 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



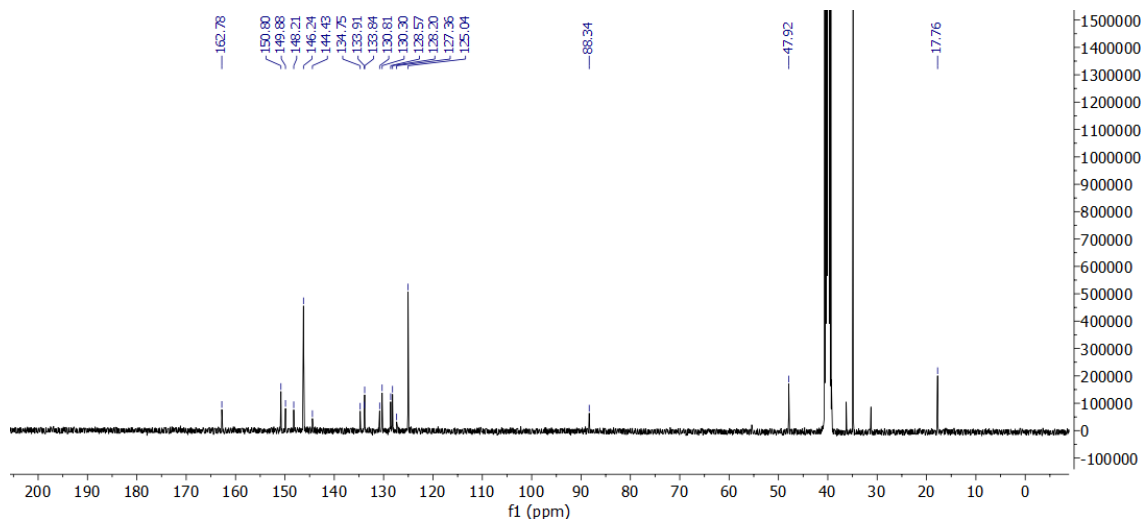
EK-28. 8 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



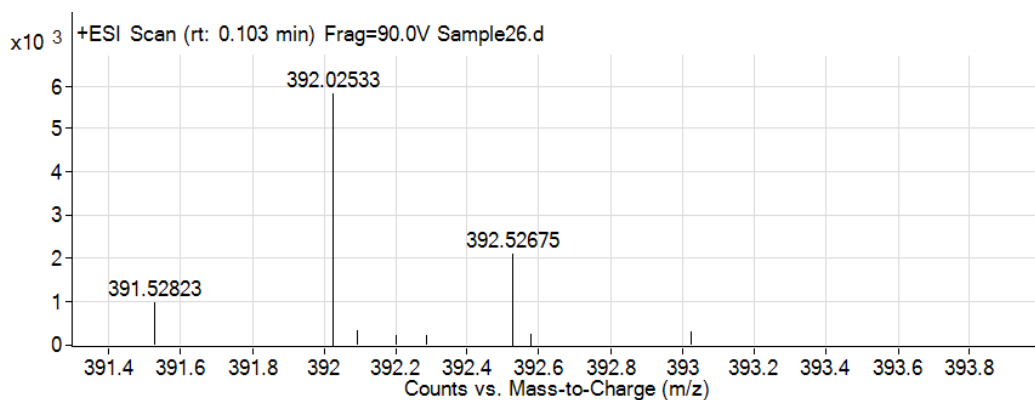
EK-29. 8 nolu molekülün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)



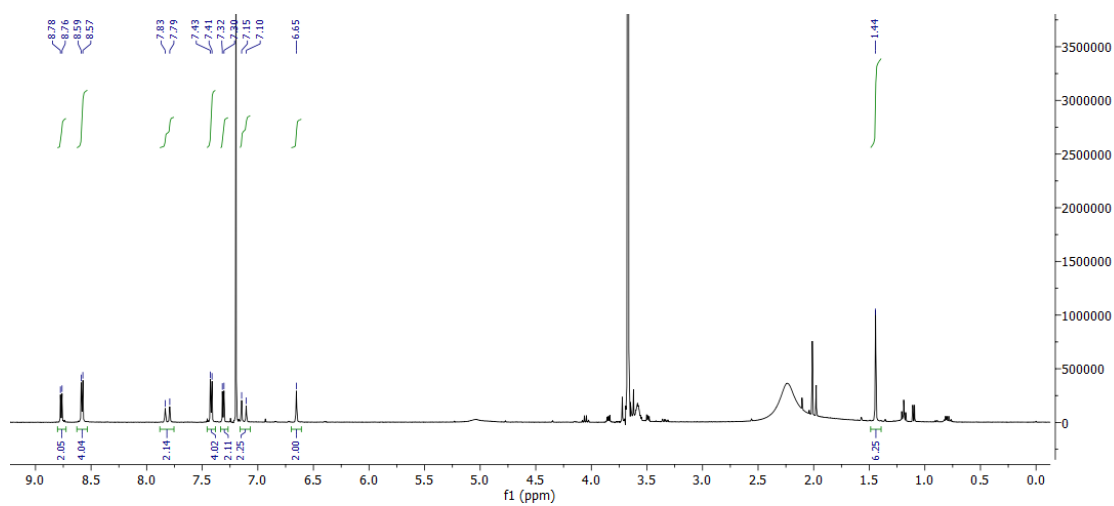
EK-30. NGL-3 molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

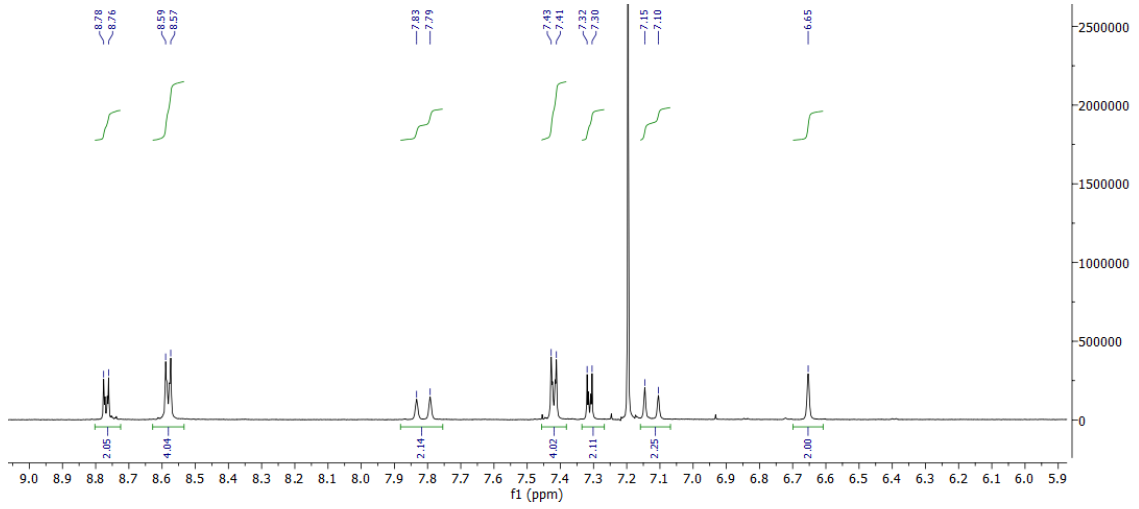


EK-31. NGL-3 molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

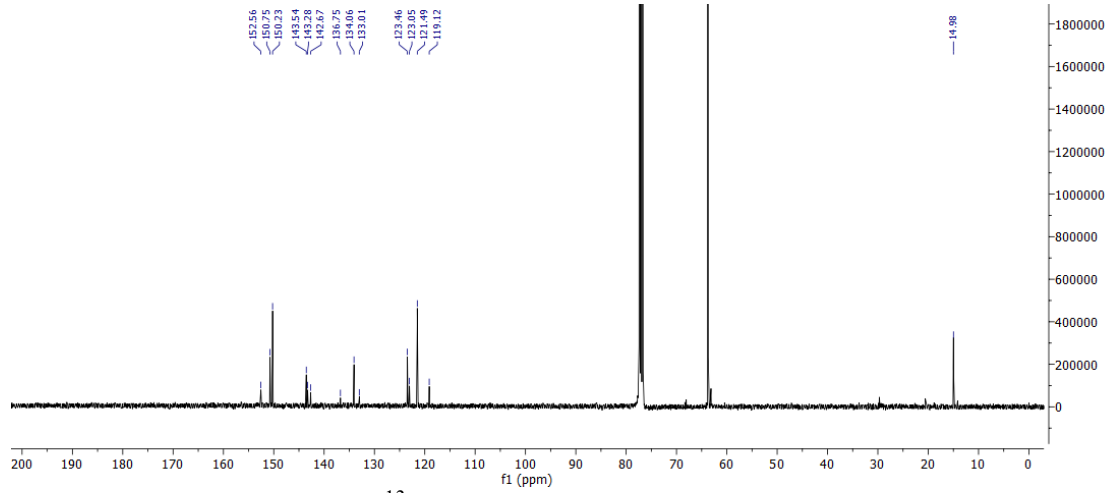


EK-32. NGL-3 molekülün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)

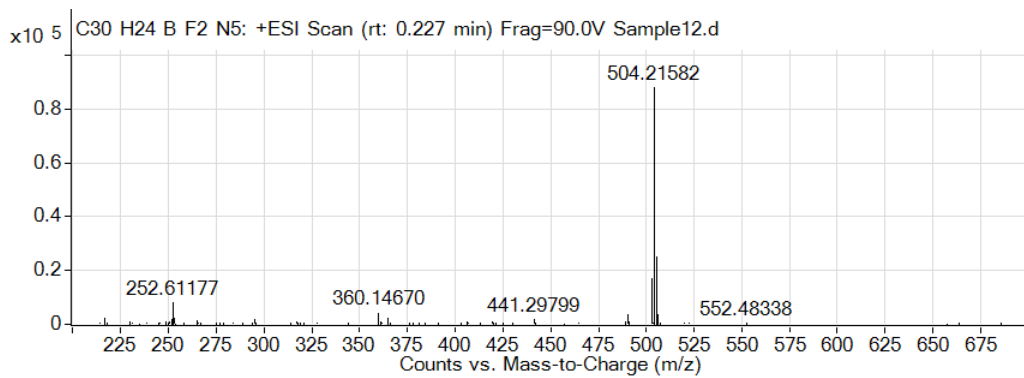




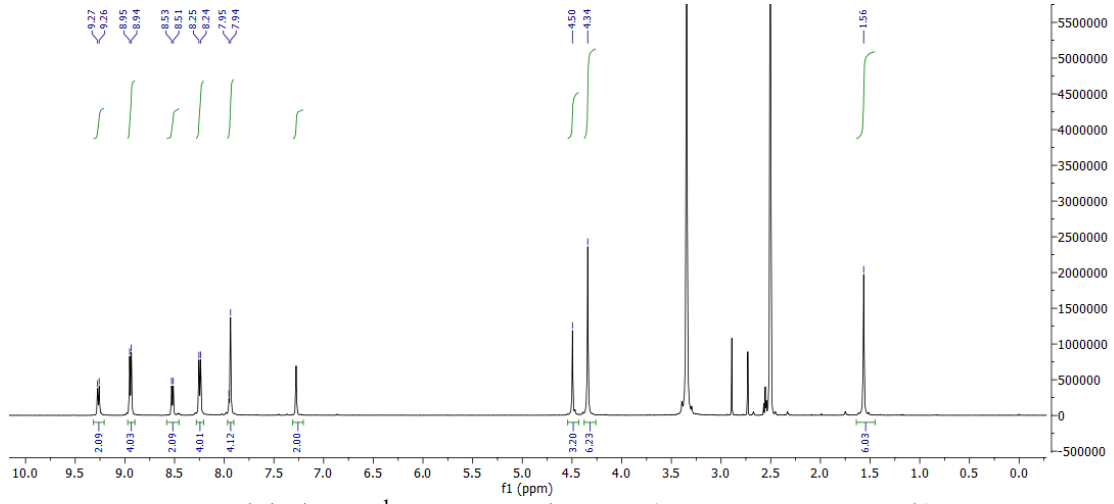
EK-33. 10 nolu molekülün ^1H NMR spektrumu (üst) ve genişletilmiş spektrum (alt) (400 MHz, CDCl_3).



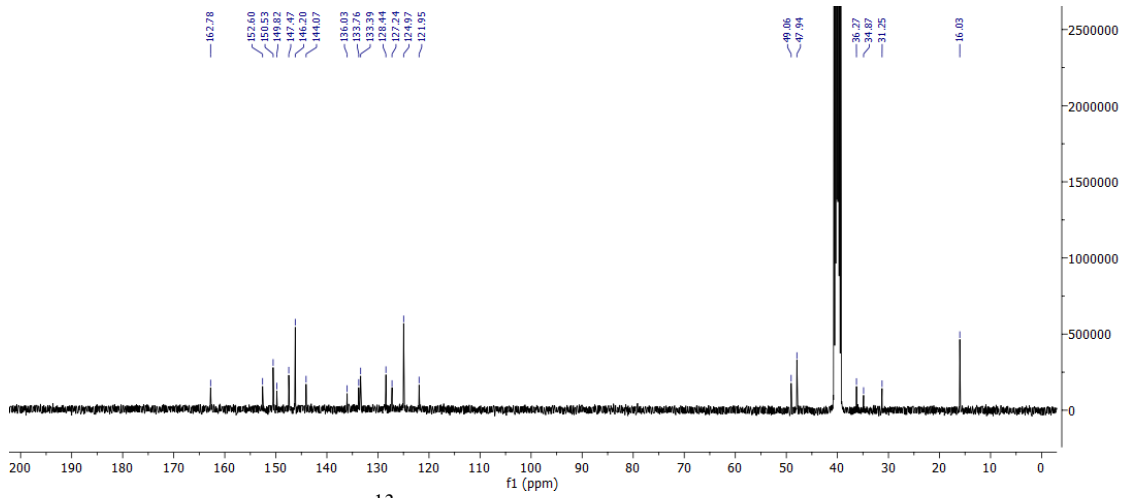
EK-34. 10 nolu molekülün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



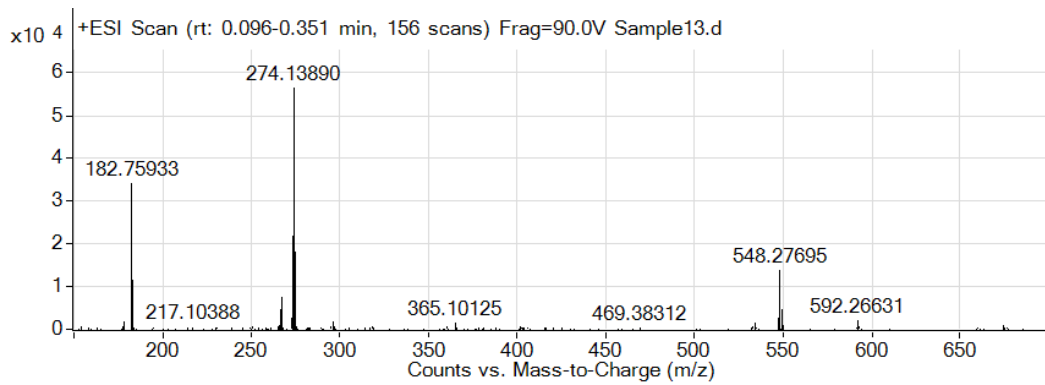
EK-35. 10 nolu molekülün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)



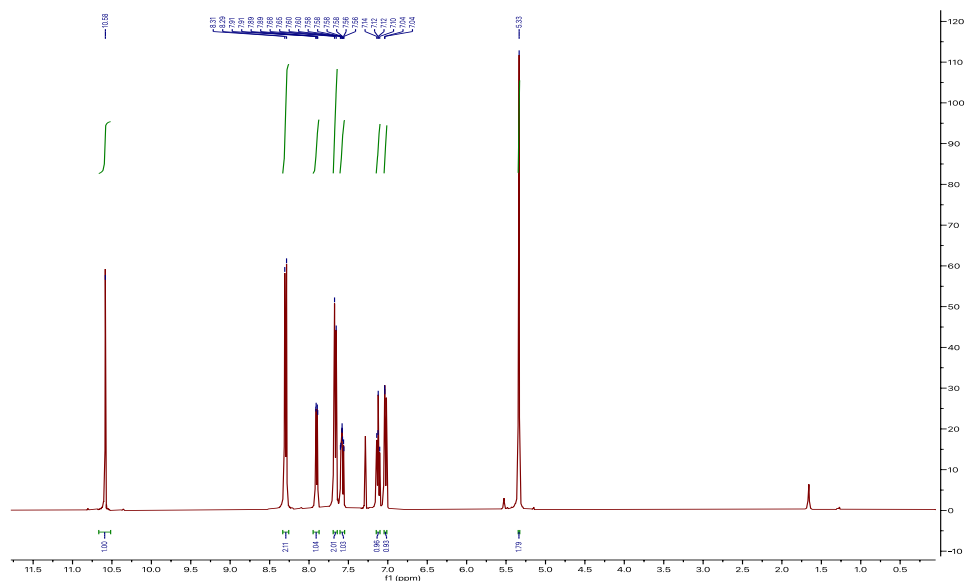
EK-36. NGL-4 molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



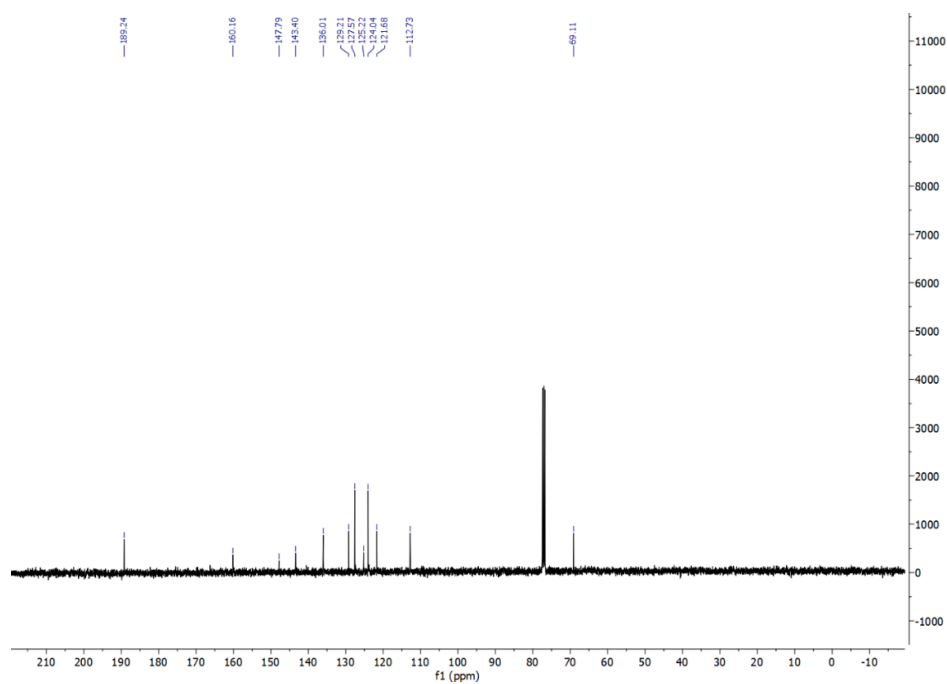
EK-37. NGL-4 molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$). Yıkama ve tepkimeler sırasında örnek içinde kalan DMF (162.78, 34.87, 31.25) çözücülerin de pikleri spektrumda görünmektedir.



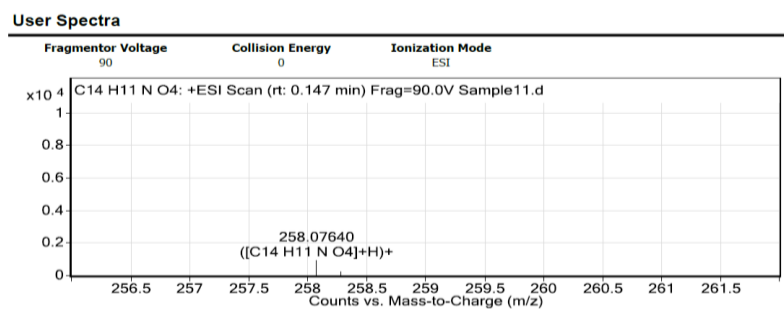
EK-38. NGL-4 molekülünün yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (QTOF-LC/MS)



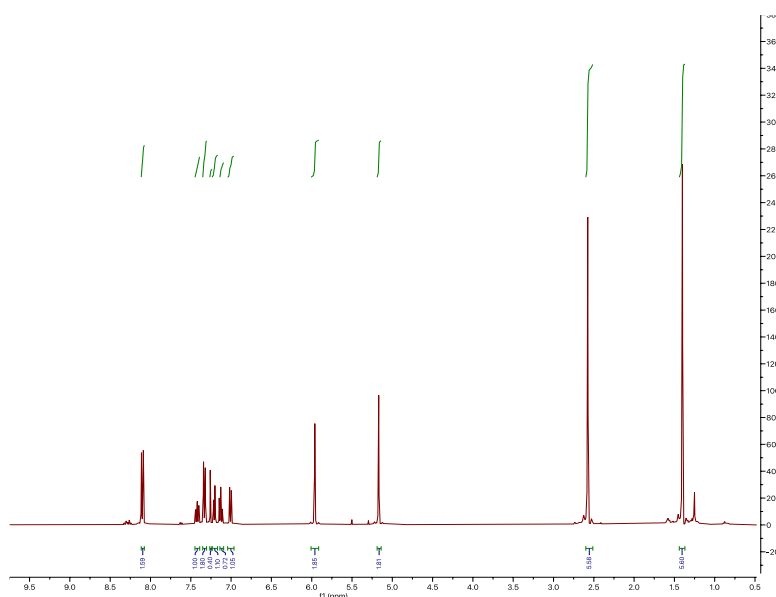
EK-39. 11 nolu molekülün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



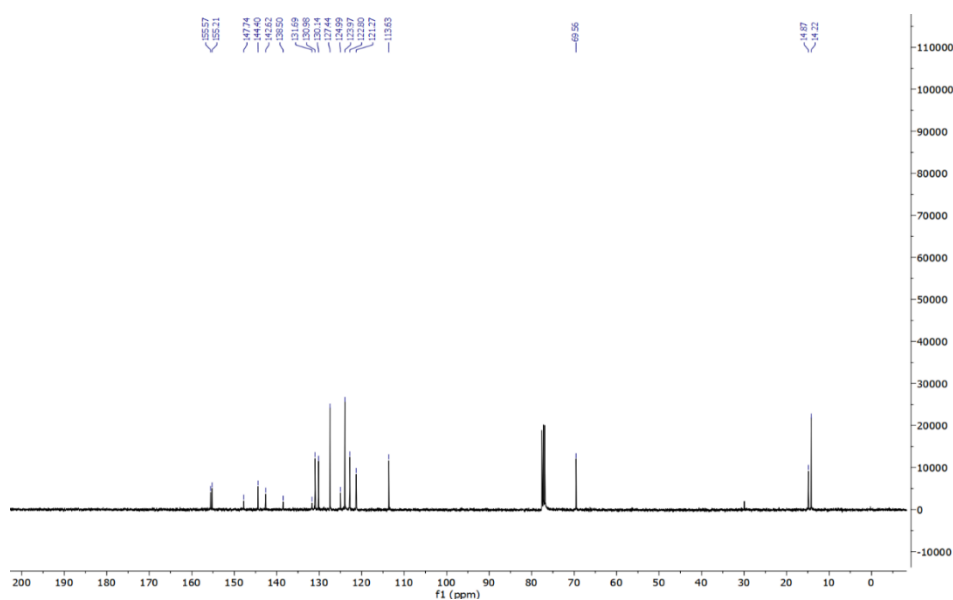
EK-40. 11 nolu molekülün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



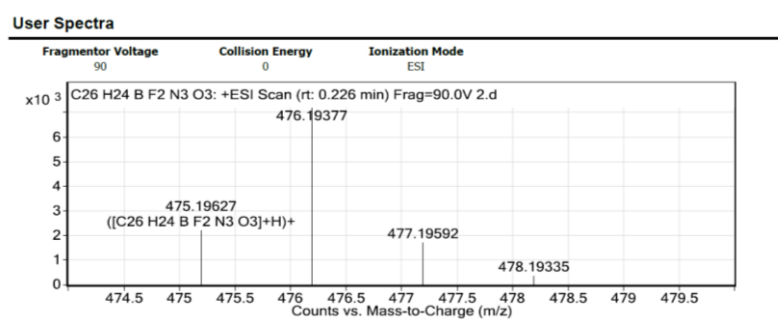
EK-41. 11 nolu molekülün kütle spektrumu.



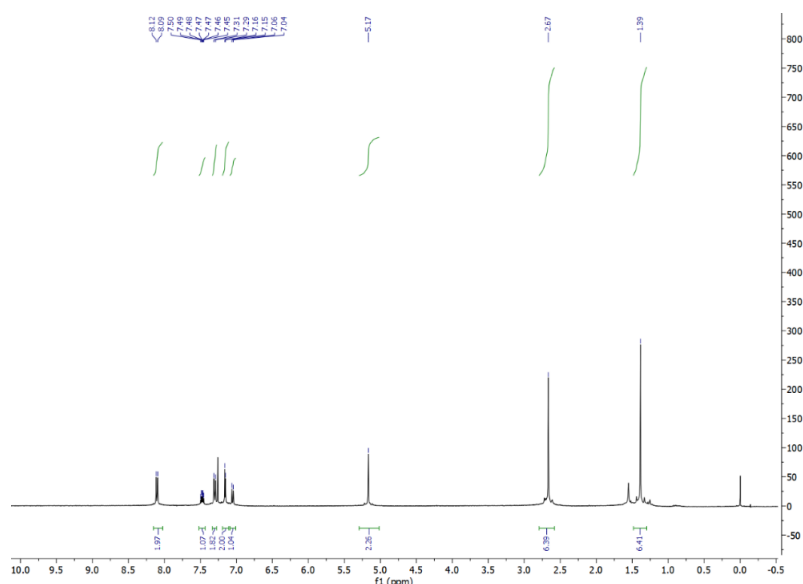
EK-42. 12 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



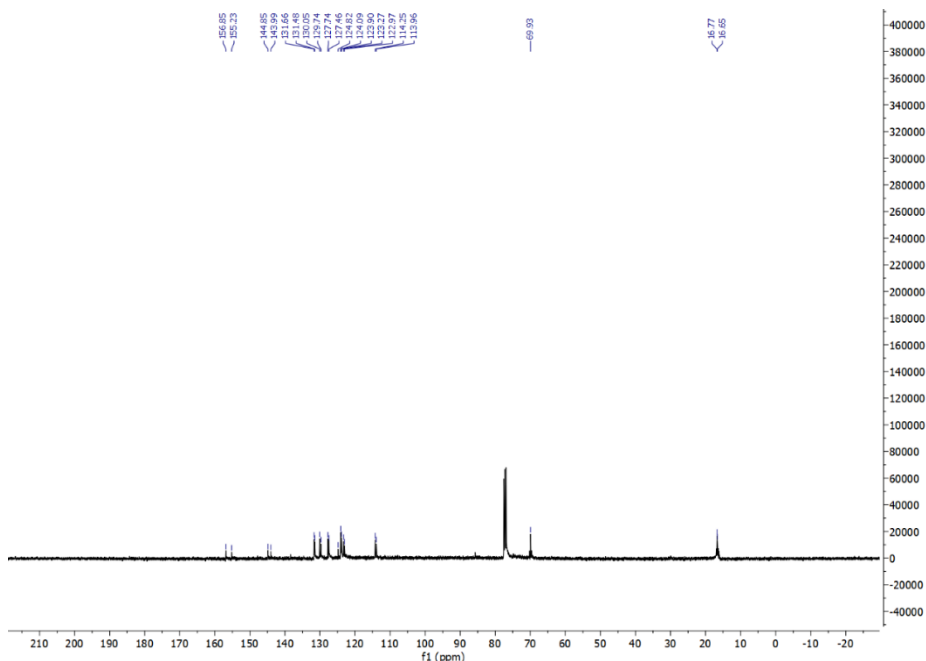
EK-43. 12 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



EK-44. 12 nolu molekülünün kütle spektrumu.

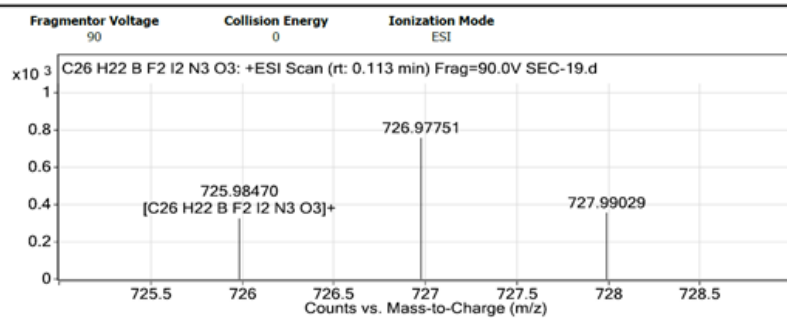


EK-45. 13 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

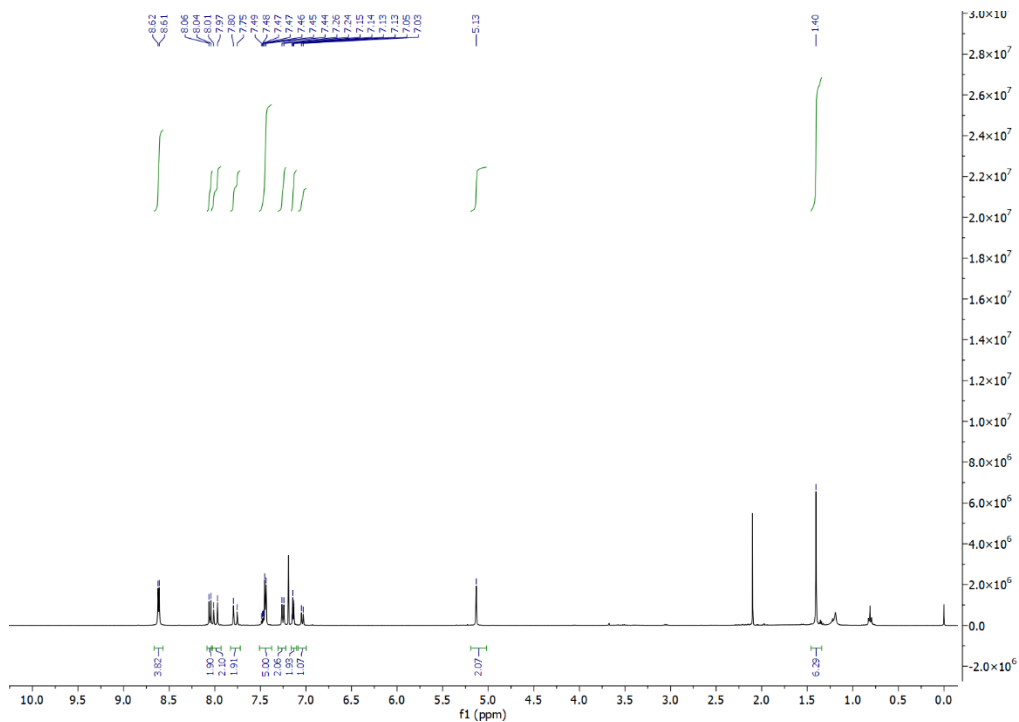


EK-46. 13 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).

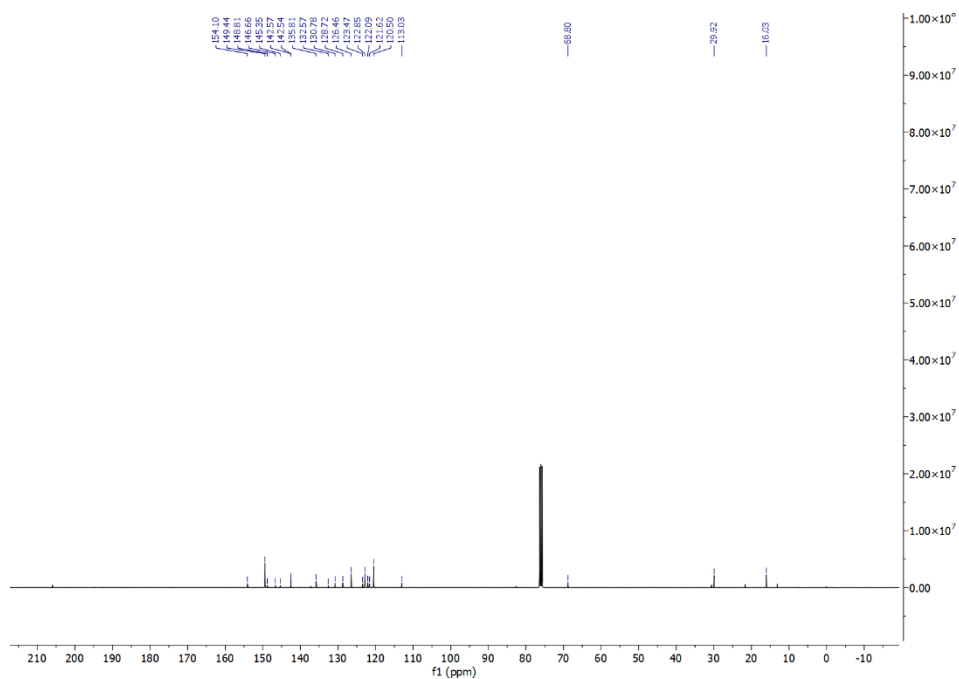
User Spectra

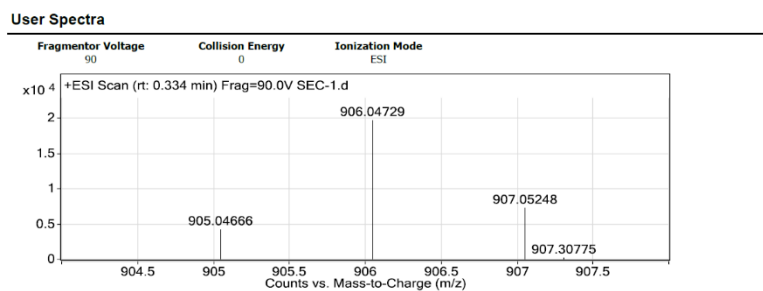


EK-47. 13 nolu molekülünün kütle spektrumu.

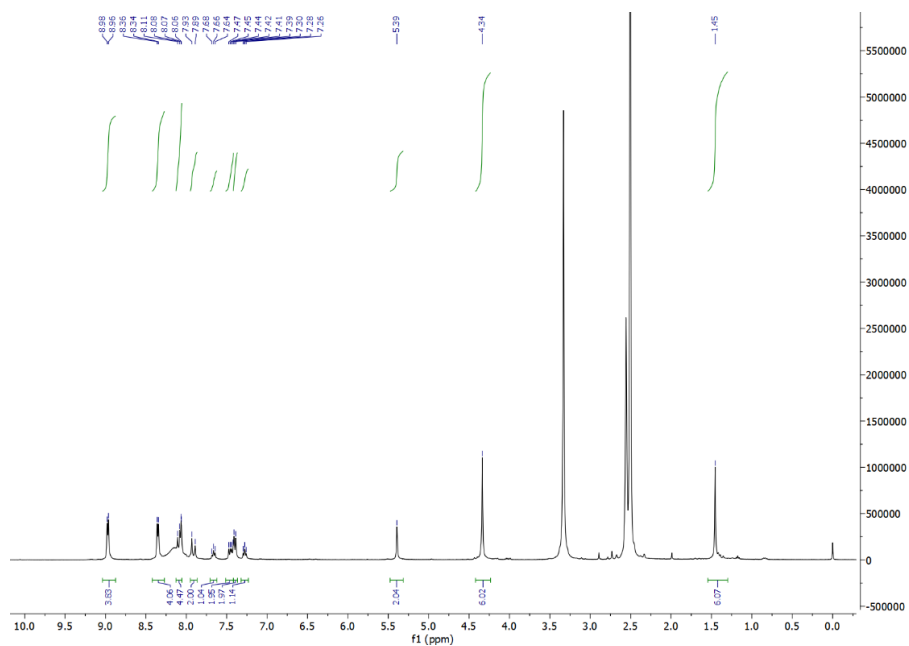


EK-48. 14 nolu molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).

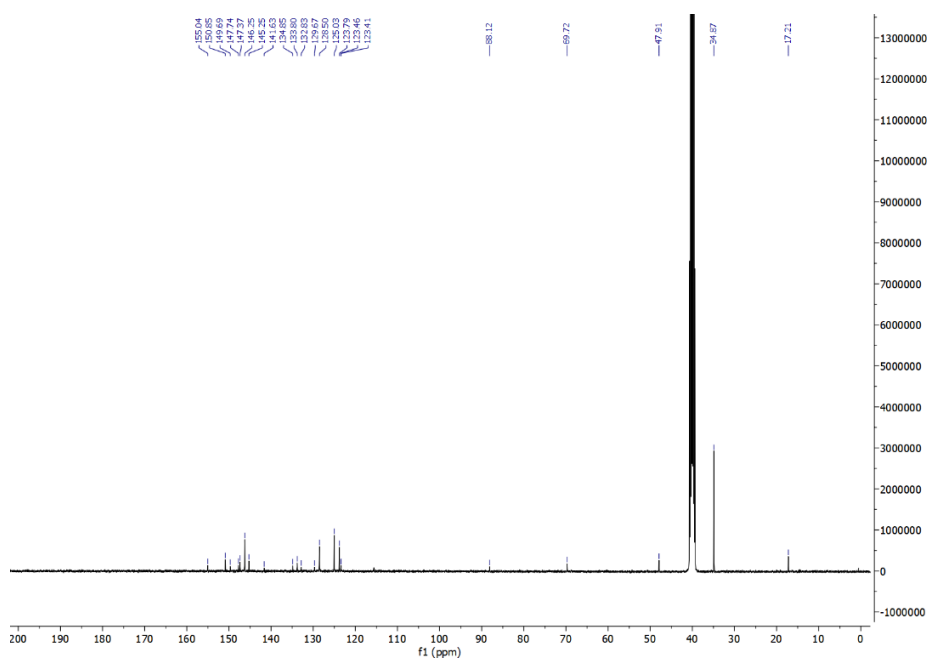




EK-50. 14 nolu molekülünü kütle spektrumu.

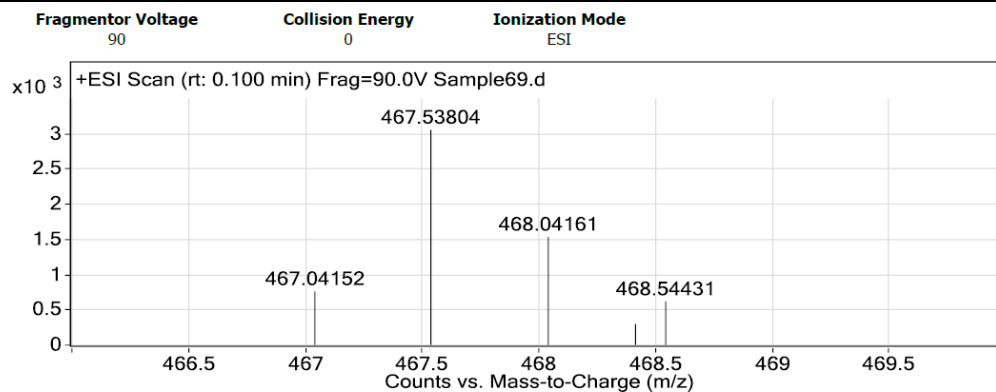


EK-51. NGL-5 molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-*d*₆).

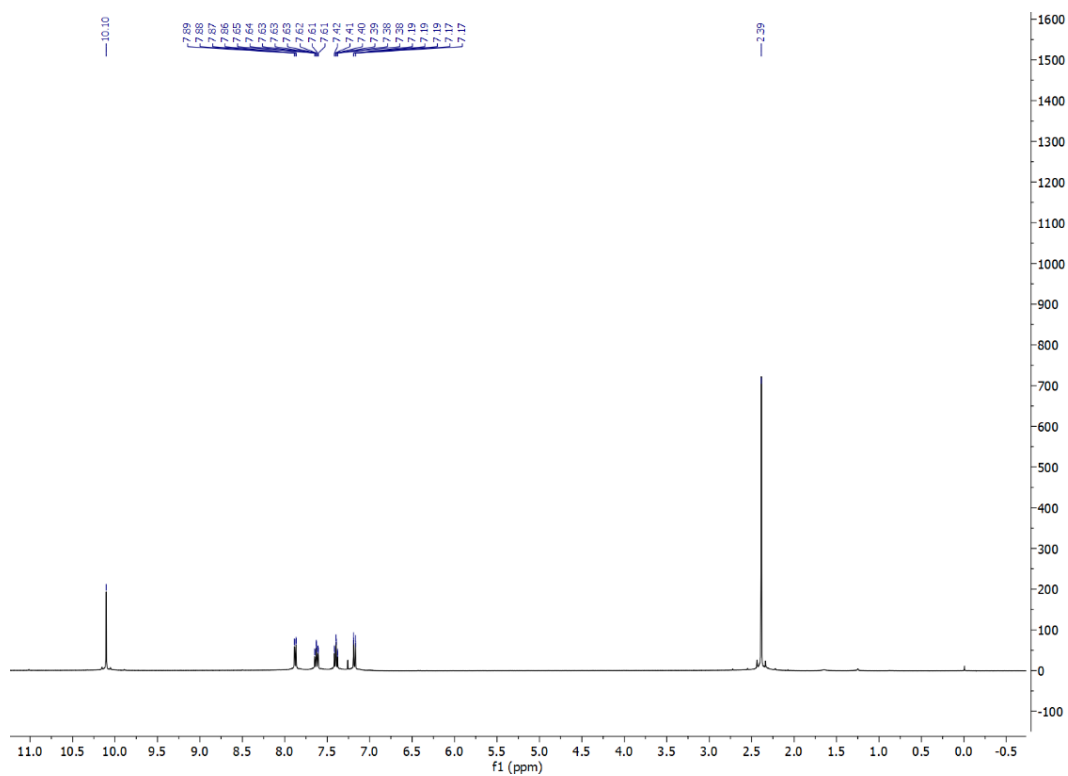


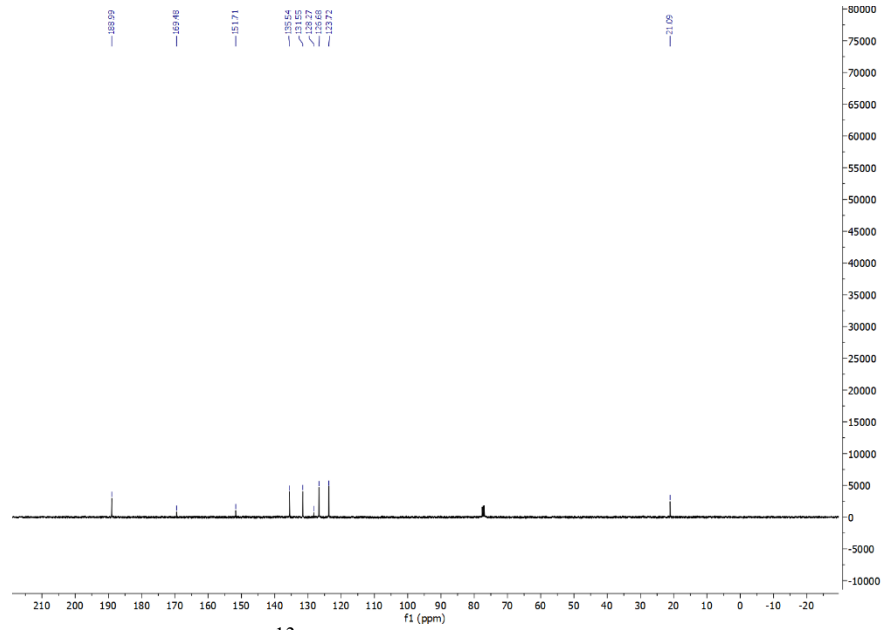
EK-52. NGL-5 molekülünün ¹³C NMR spektrumu (101 MHz, DMSO-*d*₆).

User Spectra

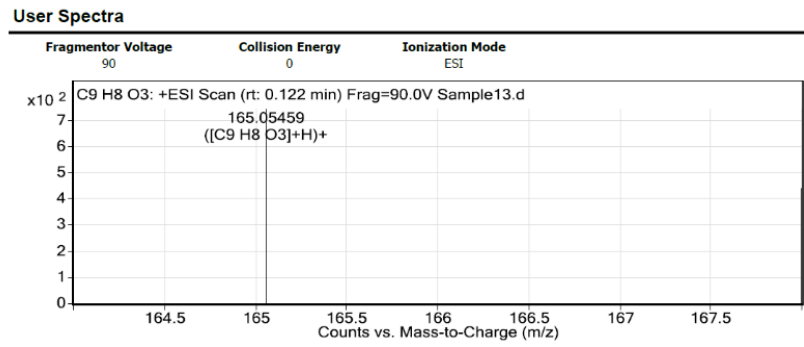


EK-53. NGL-5 molekülünün kütle spektrumu.

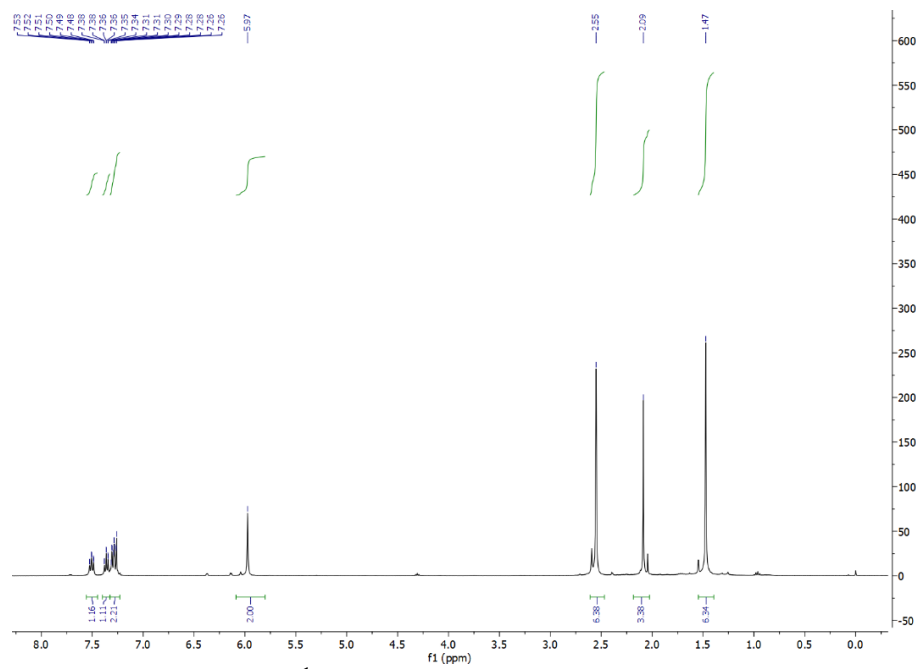
EK-54. 15 nolu molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



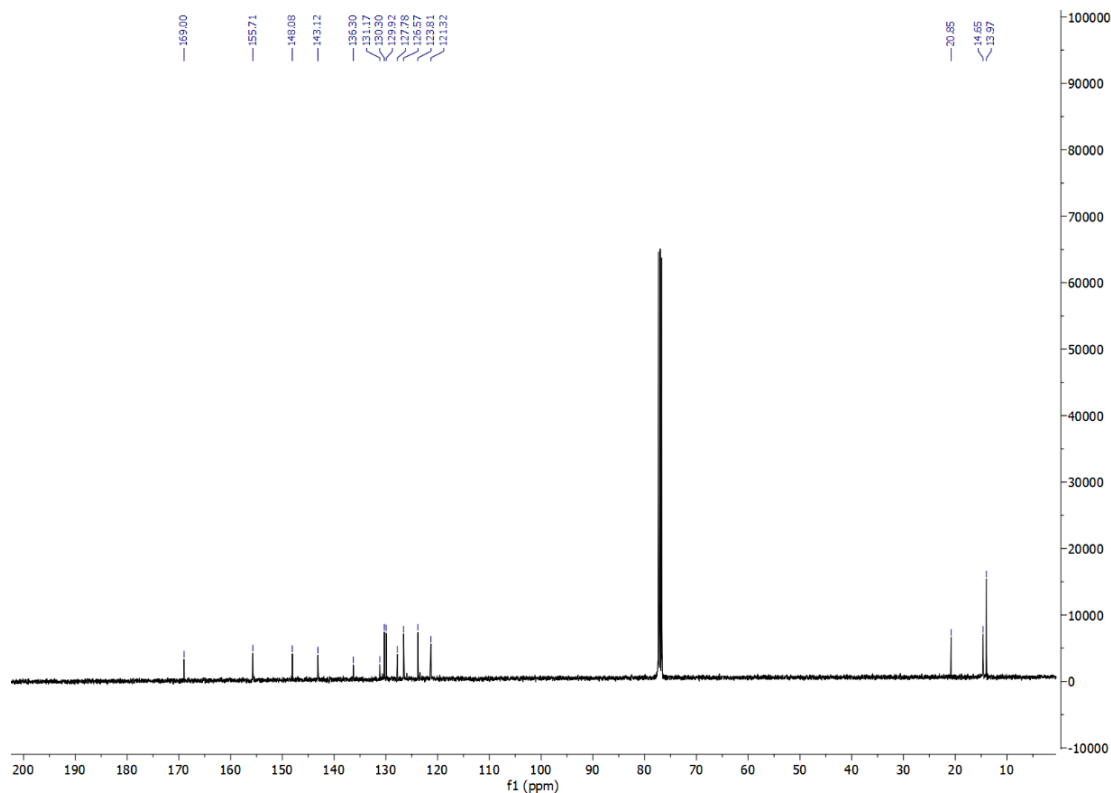
EK-55. 15 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



EK-56. 15 nolu molekülünün kütle spektrumu.

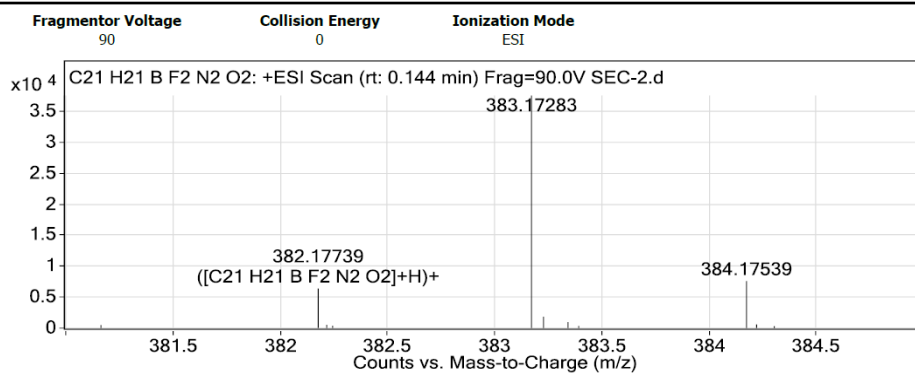


EK-57. 16 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

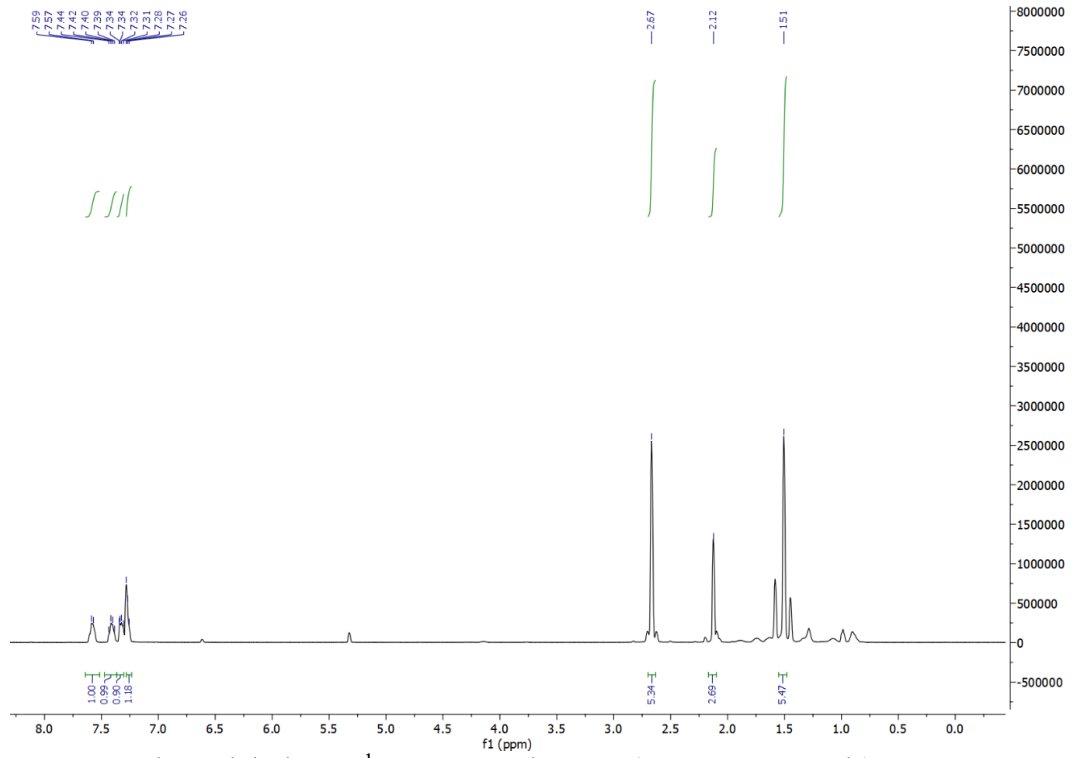


EK-58. 16 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).

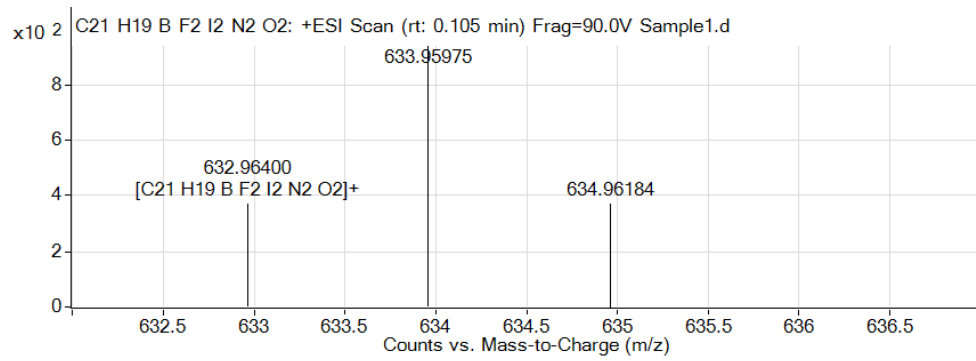
User Spectra



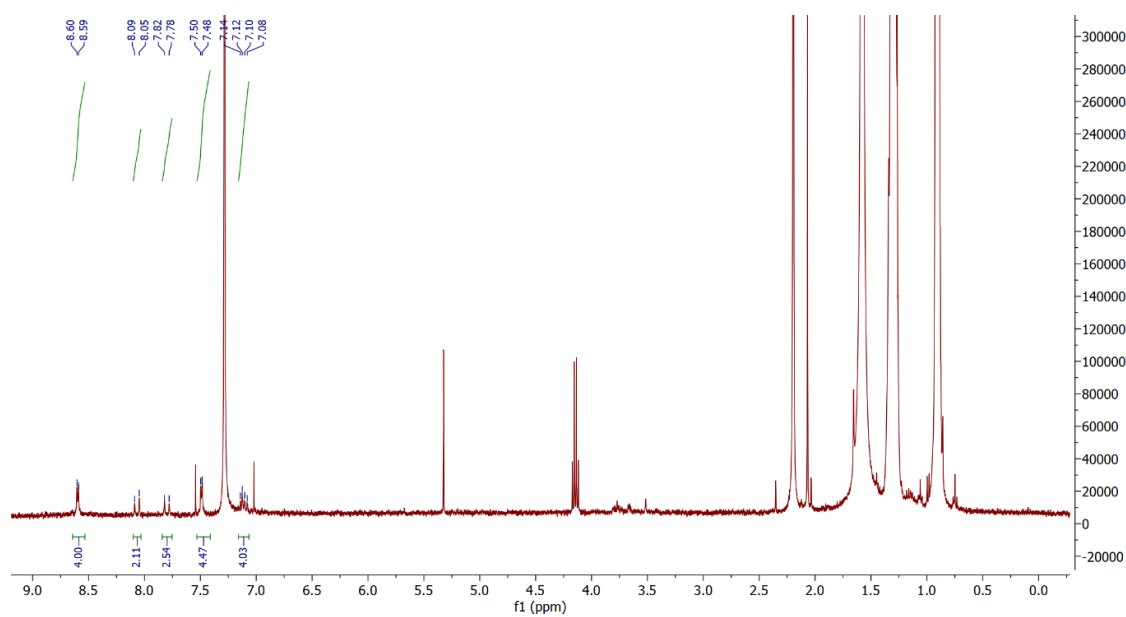
EK-59. 16 nolu molekülünün kütle spektrumu.



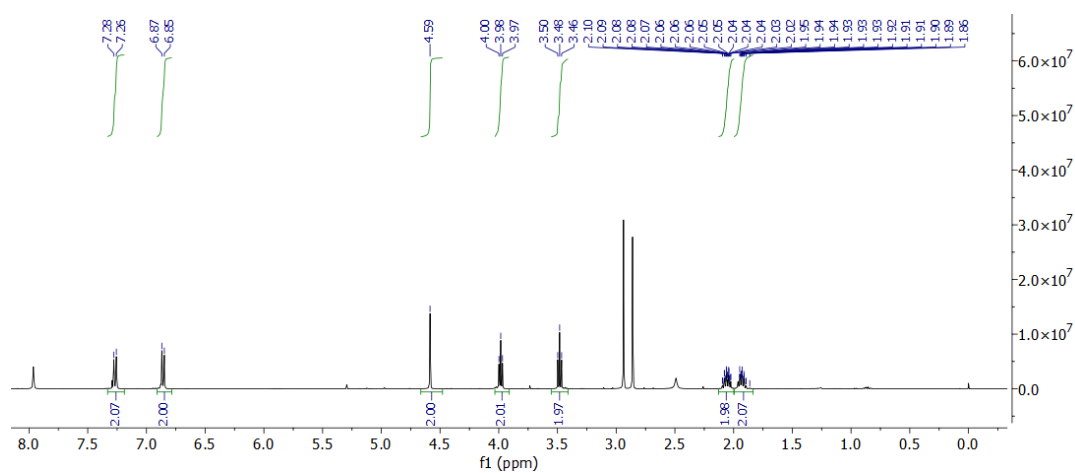
EK-60. 17 nolu molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



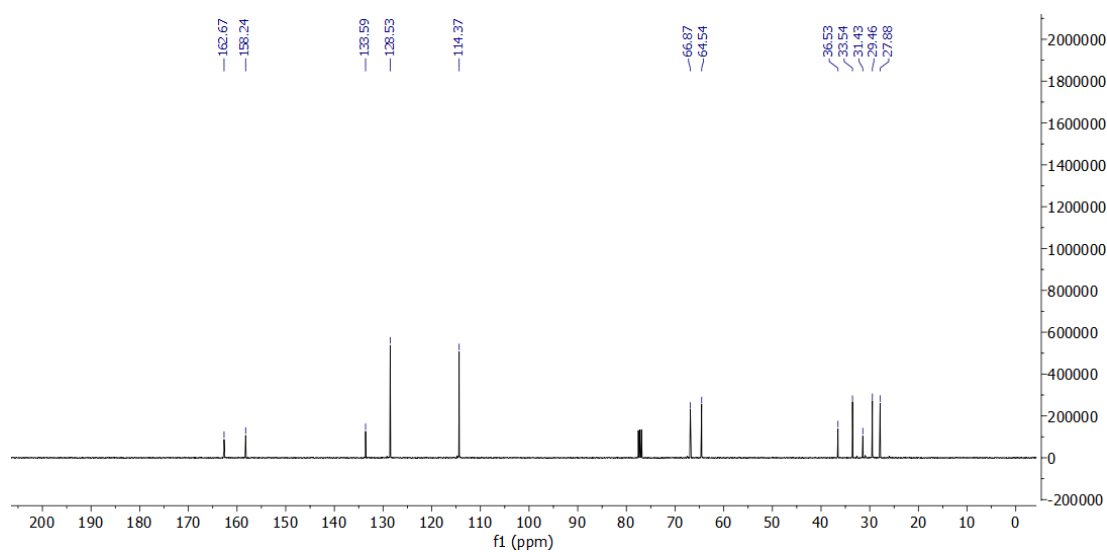
EK-61. 17 nolu molekülünün kütle spektrumu.



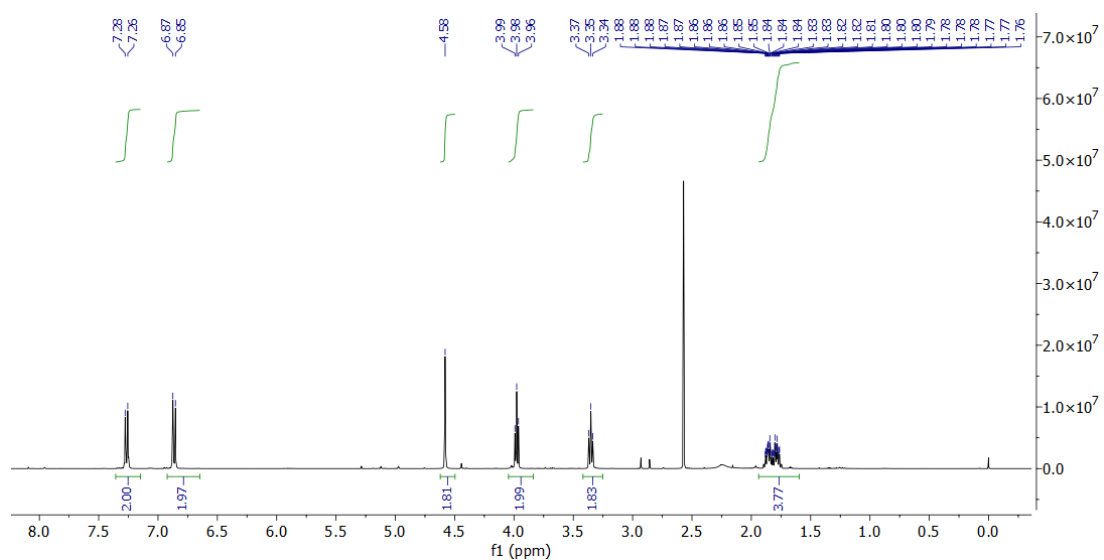
EK-62. 18 nolu molekülün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



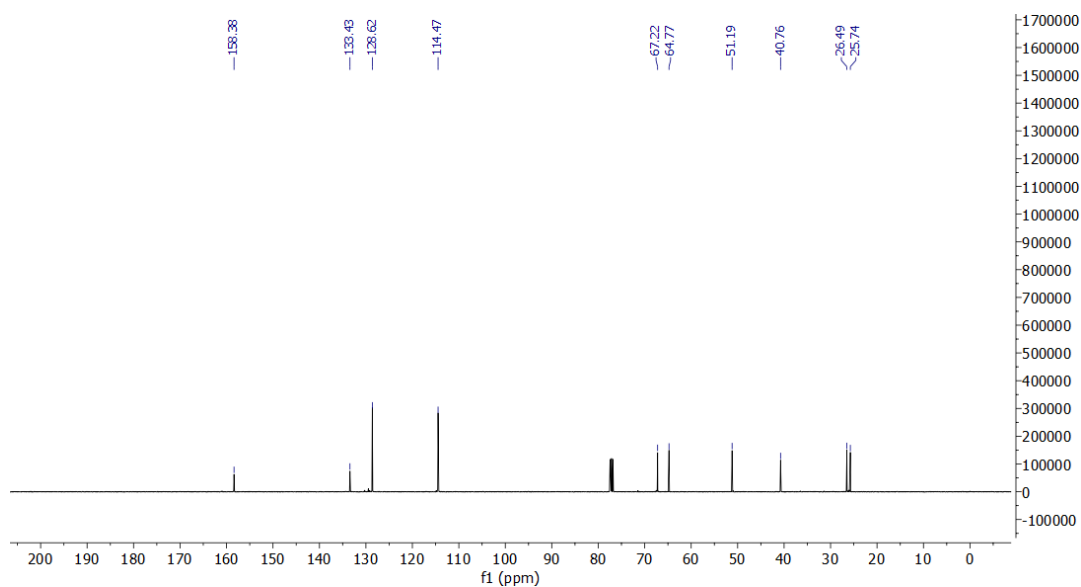
EK-63. 20 nolu molekülün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



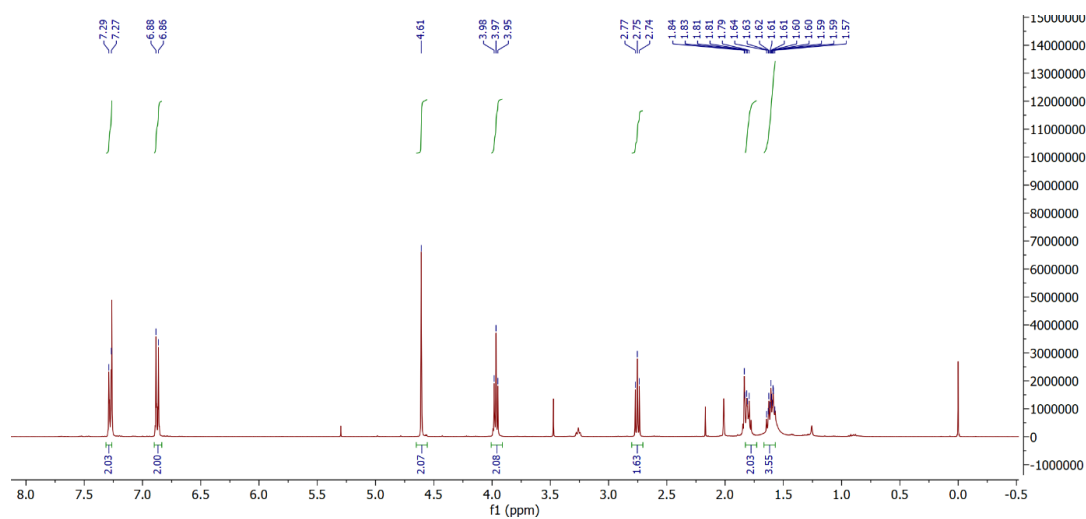
EK-64. 20 nolu molekülün ¹³C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl₃).



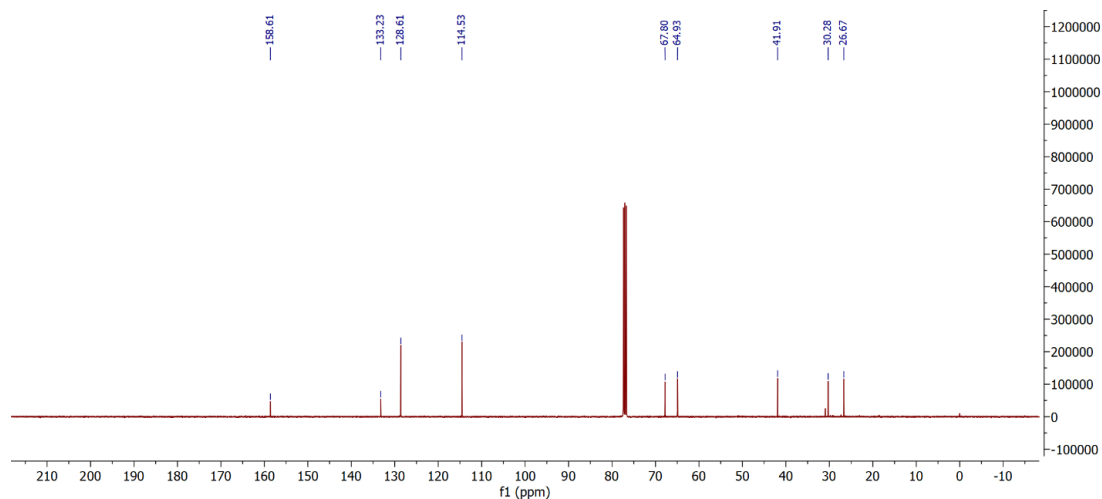
EK-65. 21 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



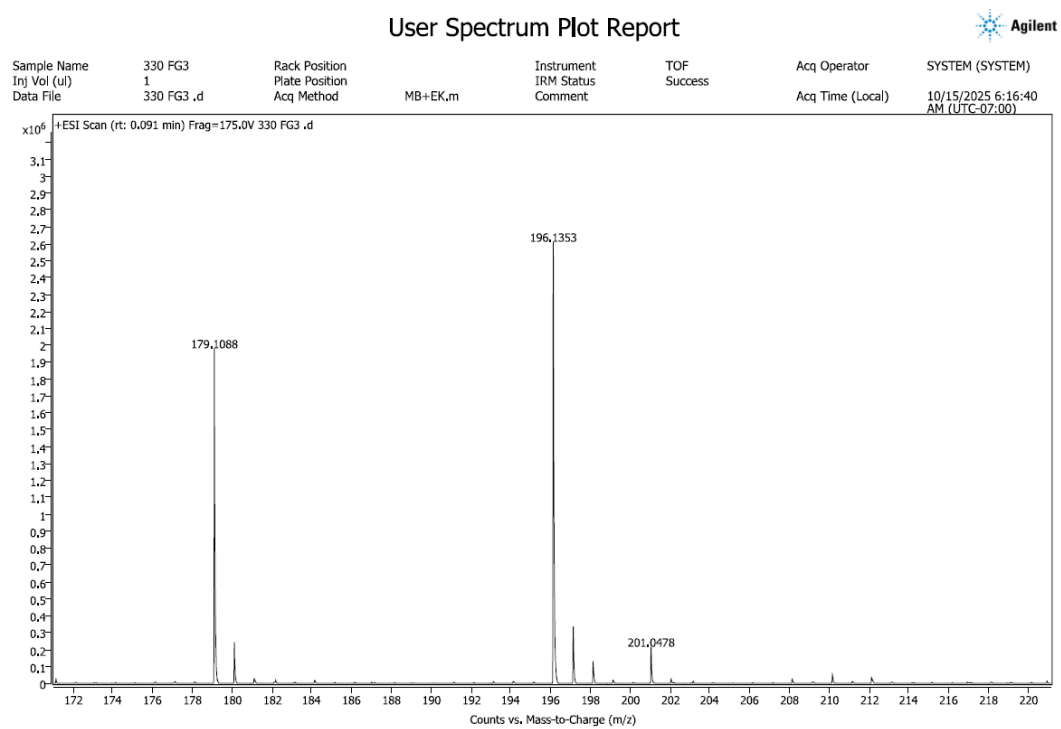
EK-66. 21 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



EK-67. 22 nolu molekülünün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



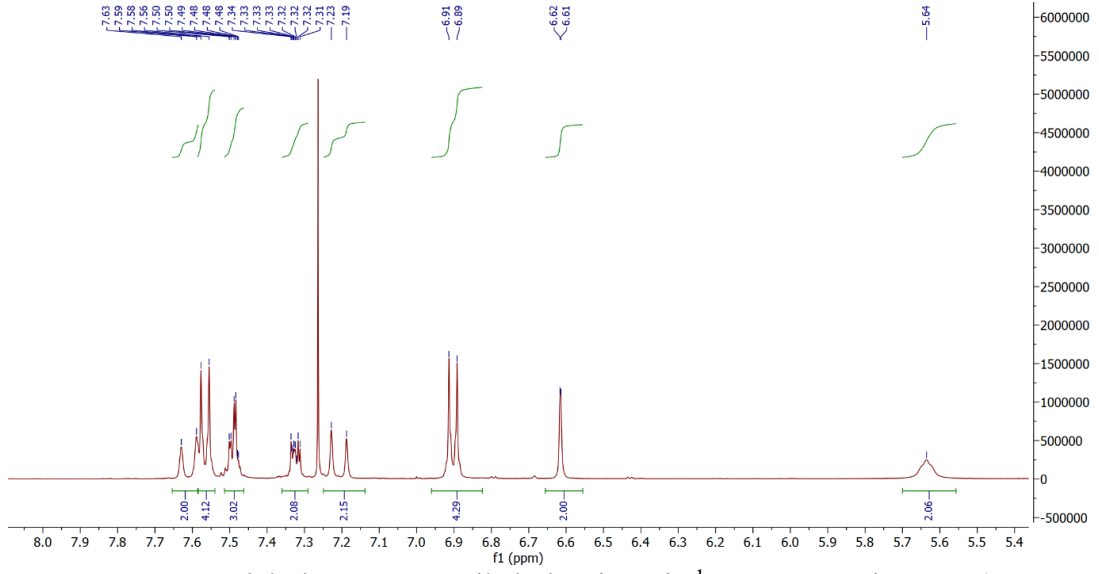
EK-68. 22 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



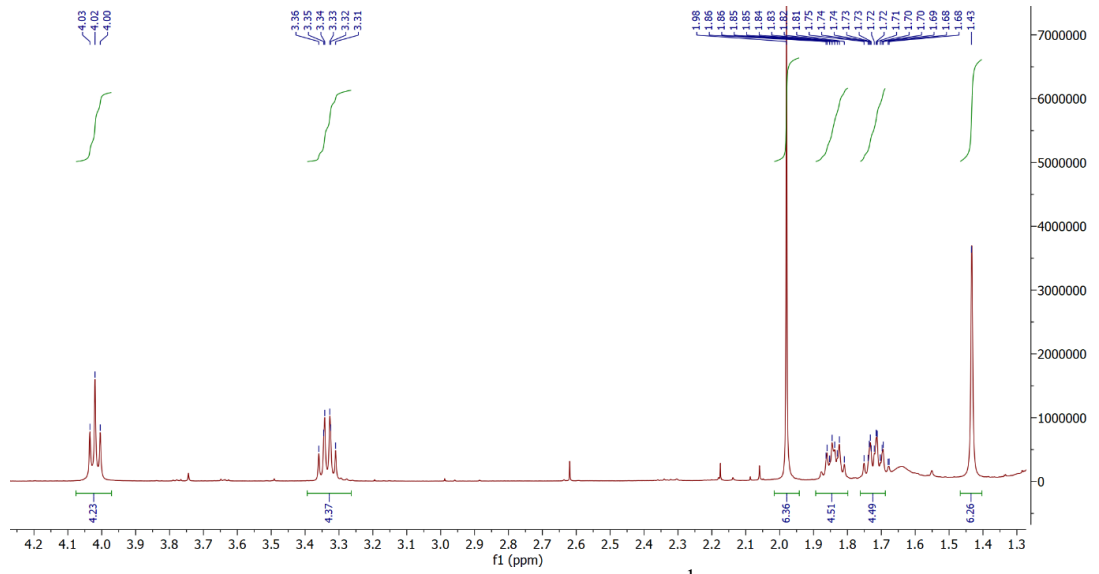
EK-69. 22 nolu molekülünün kütle spektrumu.

13C NMR spectrum of compound 10. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 200 to 0. The y-axis represents intensity, ranging from -100,000 to 1,200,000. The spectrum shows several peaks, with the most intense at approximately 77 ppm. Labeled peaks are listed at the top: 190.82, 170.14, 163.96, 132.03, 129.95, 114.73, 67.76, 39.17, 30.94, 26.38, and 23.37.

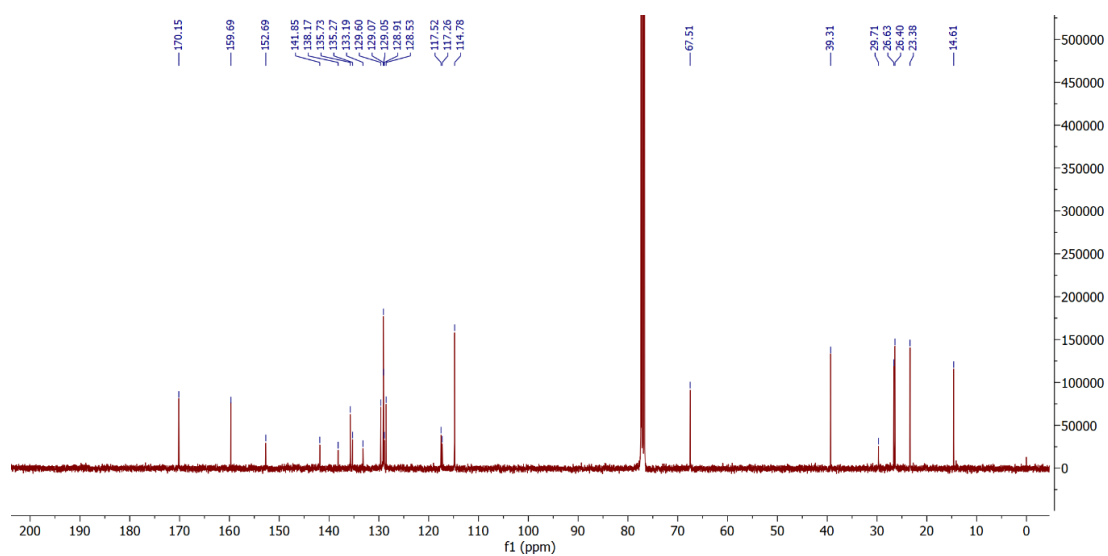
EK-72. 24 nolu molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



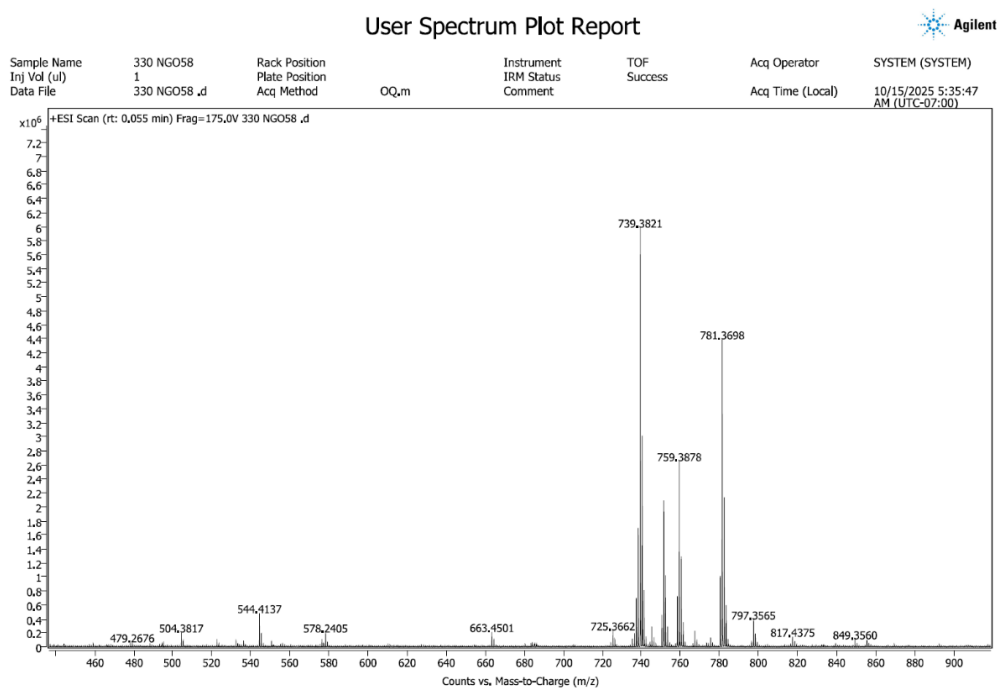
EK-73. NGL-7 molekülünün aromatik bölgesine ait ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



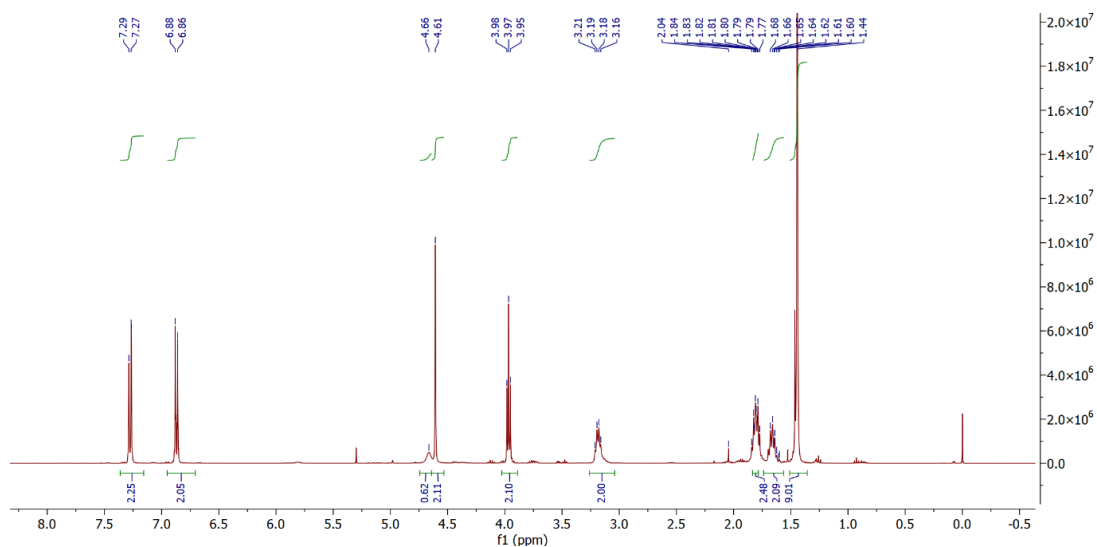
EK-74. NGL-7 molekülünün alifatik bölgesine ait ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



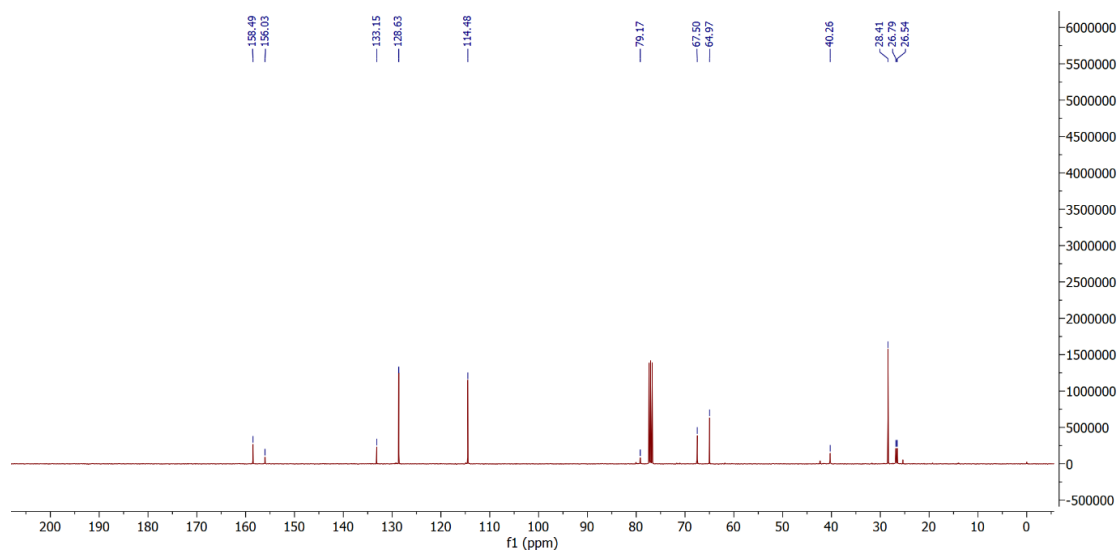
EK-75. NGL-7 molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



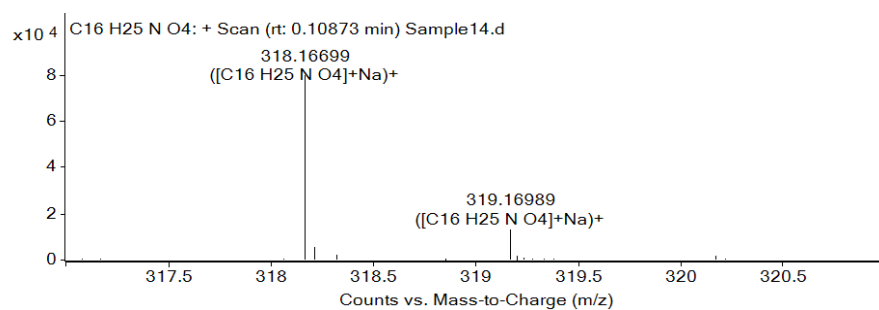
EK-76. NGL-7 molekülünün kütle spektrumu.



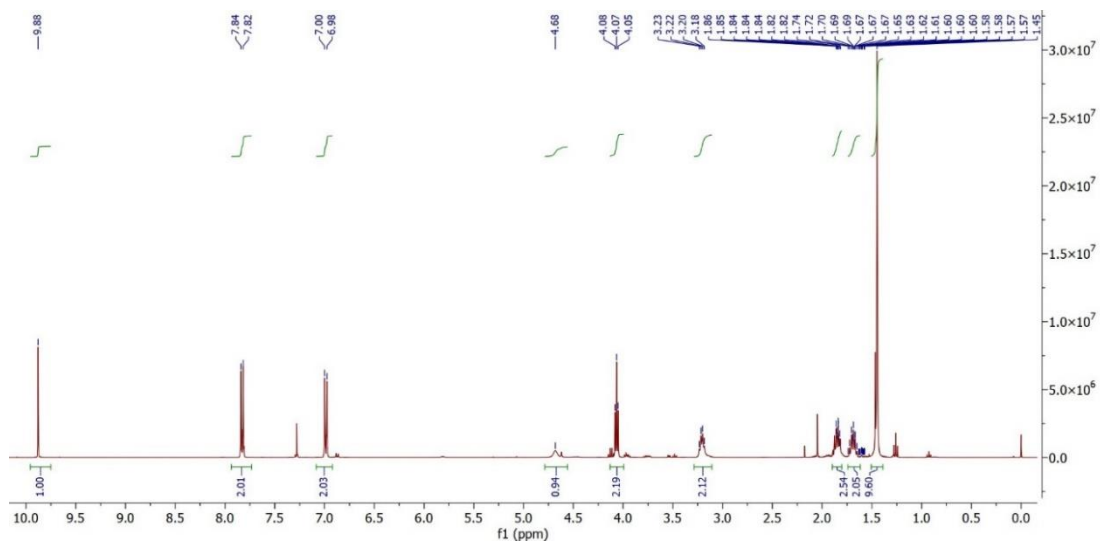
EK-77. 25 nolu molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



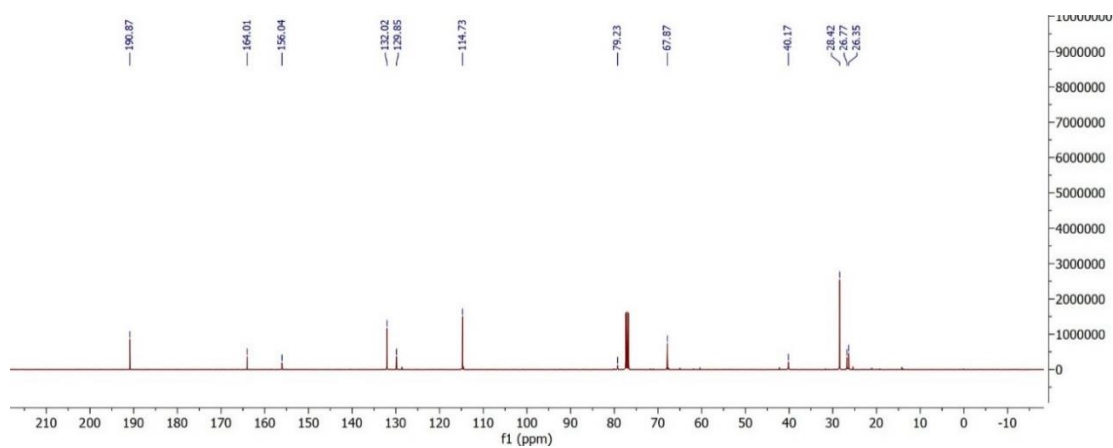
EK-78. 25 nolu molekülünün ¹³C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl₃).



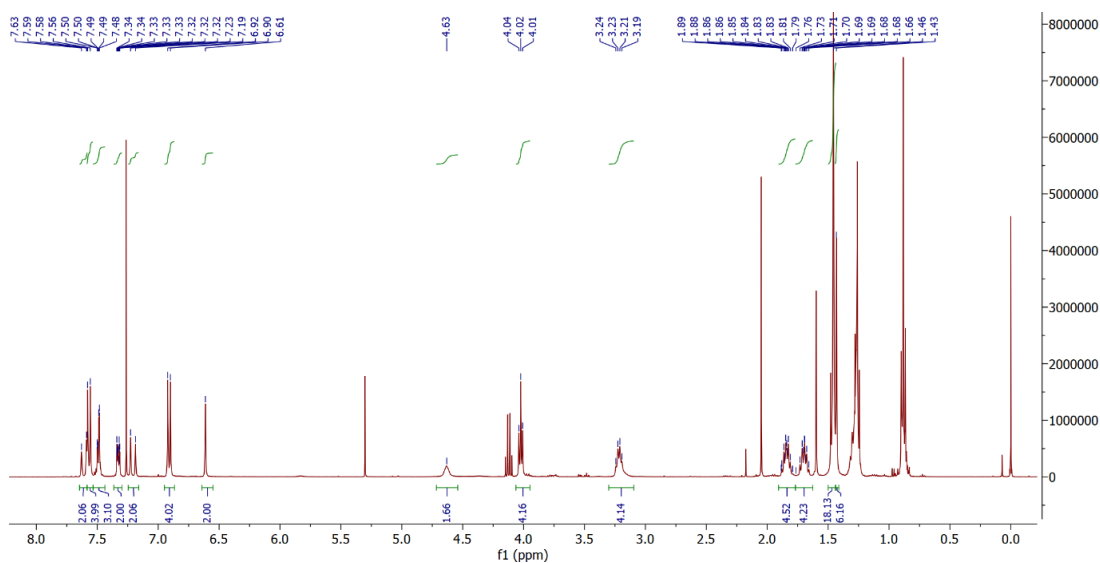
EK-79. 25 nolu molekülünün kütle spektrumu.



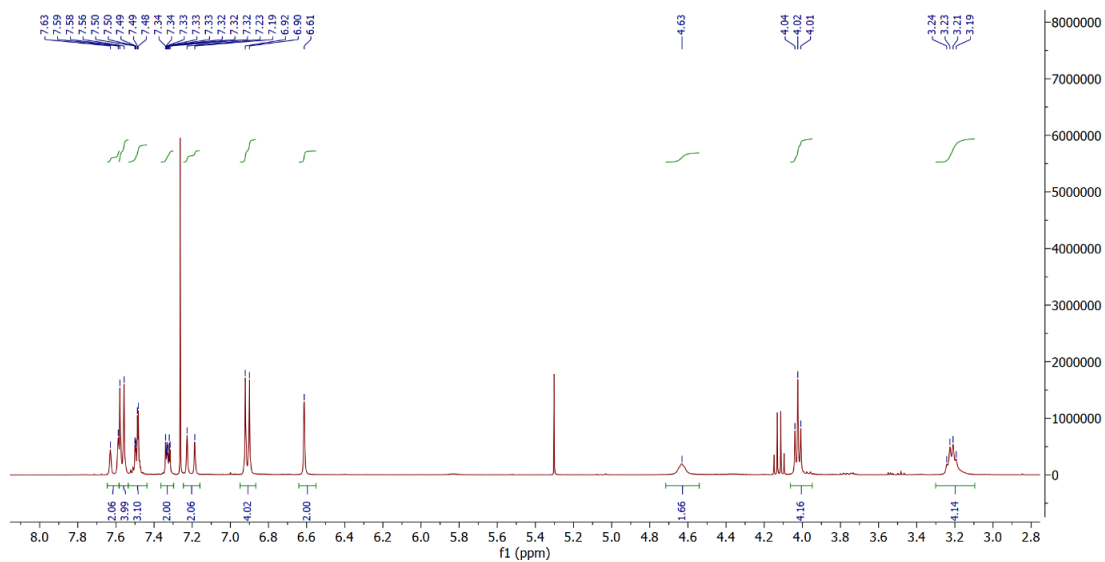
EK-80. 26 nolu molekülün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



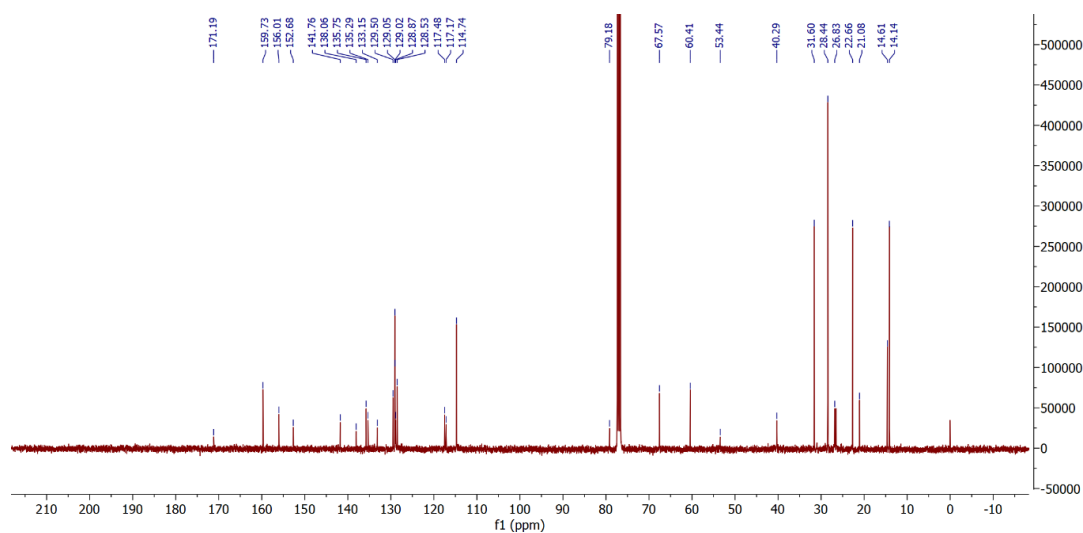
EK-81. 26 nolu molekülün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).



EK-82. 27 nolu molekülün ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).



EK-83. 27 nolu molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).

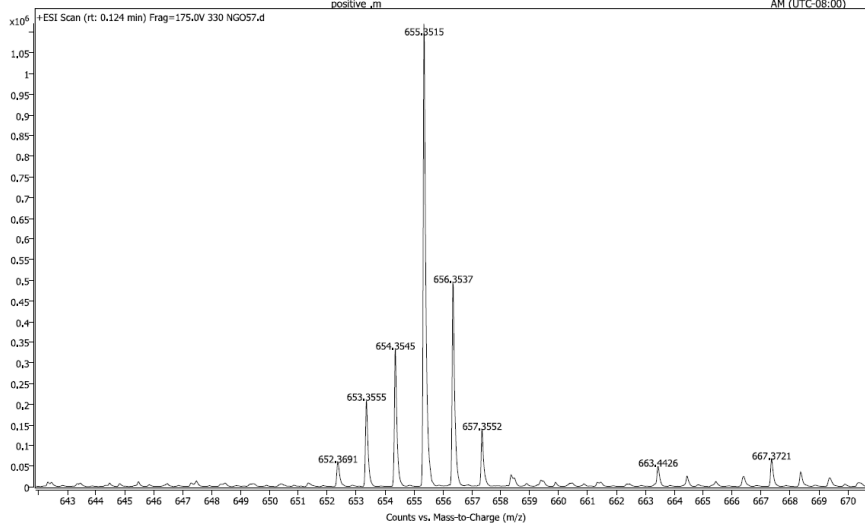


EK-84. 27 nolu molekülünün ¹³C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl₃).

User Spectrum Plot Report



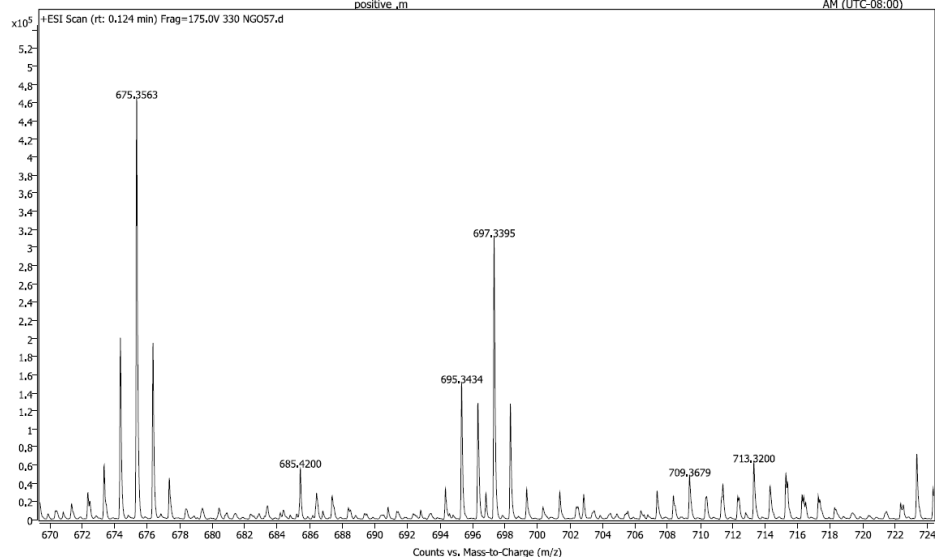
Sample Name	330 NGO57	Rack Position		Instrument	TOF	Acq Operator	SYSTEM (SYSTEM)
Inj Vol (ul)	1	Plate Position		IRM Status	Success	Acq Time (Local)	12/17/2025 3:20:20
Data File	330 NGO57.d	Acq Method	200-2000+175 V_	Comment			AM (UTC-08:00)



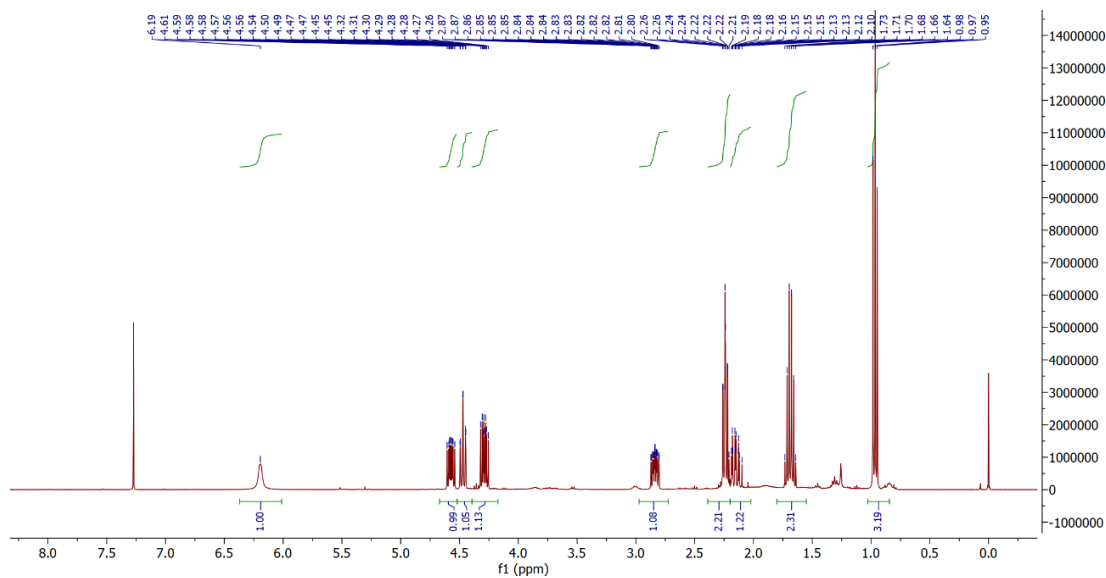
User Spectrum Plot Report



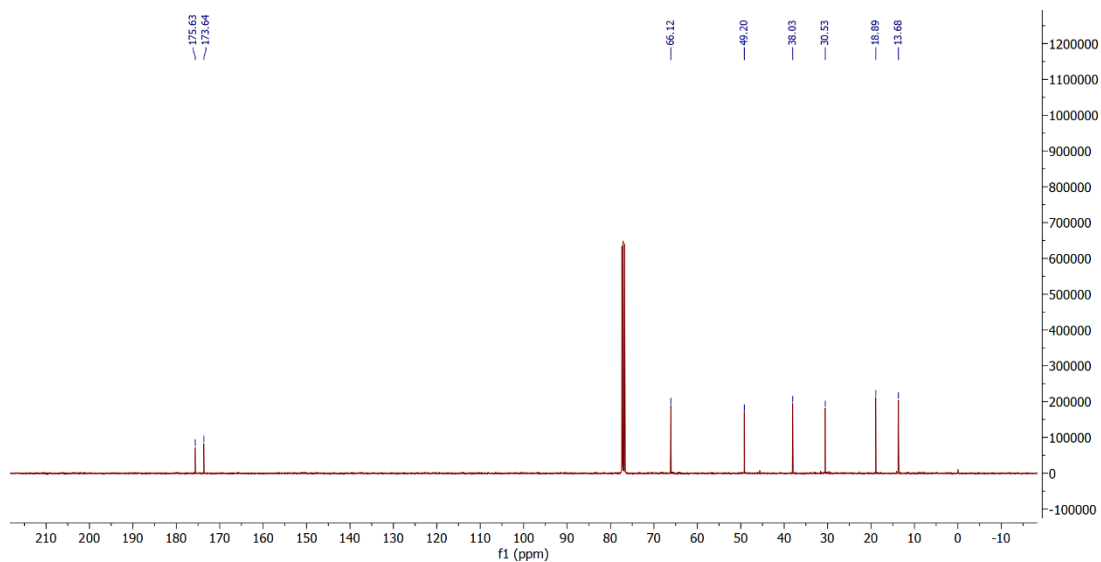
Sample Name	330 NGO57	Rack Position		Instrument	TOF	Acq Operator	SYSTEM (SYSTEM)
Inj Vol (ul)	1	Plate Position		IRM Status	Success	Acq Time (Local)	12/17/2025 3:20:20
Data File	330 NGO57.d	Acq Method	200-2000+175 V_	Comment			AM (UTC-08:00)



EK-85. NGL-8 molekülünün kütle spektrumu.



EK-86. AHL1 molekülünün ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).



EK-87. AHL1 molekülünün ¹³C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl₃).

13C NMR spectrum of compound 10. The x-axis is chemical shift f1 (ppm) from 210 to -10. The y-axis is intensity from -100,000 to 1,100,000. Peaks are labeled with their chemical shifts: 175.65, 173.80, 66.12, 49.21, 36.15, 34.25, 30.67, 25.13, 22.37, and 13.91.

EK-89. AHL2 molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3).

