

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ESTİTÜSÜ

**BAZI NİTROBENZOFURAZAN–TETRAZİN BOYALARININ TERS
ELEKTRON TALEPLİ DİELS–ALDER TEPKİMLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HATİCE SARI

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. MURAT IŞIK

BİNGÖL- 2025

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ESTİTÜSÜ

**BAZI NİTROBENZOFURAZAN–TETRAZİN BOYALARININ TERS
ELEKTRON TALEPLİ DİELS–ALDER TEPKİMLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HATİCE SARI

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Murat IŞIK

BİNGÖL- 2025

**BAZI NİTROBENZOFURAZAN-TETRAZİN BOYALARININ TERS
ELEKTRON TALEPLİ DİELS-ALDER TEPKİMELERİ**

Doç. Dr. Murat IŞIK danışmanlığında, Hatice SARI tarafından hazırlanan bu çalışma 07/02/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından KİMYA Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Zuhale GERÇEK

İmza :

Üye : Doç.Dr. Murat IŞIK

İmza :

Üye : Doç.Dr. Adnan AYNA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 118Z423

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Tez çalışma süresince benden yardımını, bilgi birikimini ve tecrübesini esirgemeyen, her zaman her şekilde bir hocadan daha fazla yanımda olan hayatımın akışını değiştiren değerli hocam Doç. Dr. Murat IŞIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 ulusal destek programı kapsamında 118Z423 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteği için TÜBİTAK'a minnettarız.

İşim sebebiyle şehir dışında bulunduğum zamanlarda benim adıma tüm iş ve işlemlerimi yürüten sevgili çalışma arkadaşım ve dönem arkadaşım Mustafa BÜRKEK'e teşekkür ediyorum. Organik Kimya çalışma grup arkadaşlarım Şeyma SAVAŞ ve Berfin DOĞRUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi, manevi her konuda bana destek olan sevgili aileme ve ailemin eksikliğini hissettirmeyen değerli arkadaşlarım İlknur KÜÇÜK ve Şule SARAR'a çok teşekkür ederim.

Hatice SARI

Bingöl 2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Klık Kimyası	1
1.1.1. Klık Kimyası Özellikleri	2
1.1.2. Klık Kimyasının Türleri.....	3
1.2. Diels-Alder Reaksiyonları.....	8
1.2.1. Diels-Alder Reaksiyonun Avantajları	10
1.2.2. Tetrazin Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder Reaksiyonu	11
1.2.3. Tetrazinler	11
1.3. Biyoortogonal Tepkimeler	12
1.4. Floresan Problar	13
1.4.1. Florofor ve Floresans Sönümlleme Mekanizmaları	15
1.4.2. Tetrazin Bazlı Floresans Problar	16
1.5. İlgili Araştırmalar	17
1.6. Bu Tez Çalışmasının Amacı.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM	22
2.1. Materyal ve Enstrümental Analiz.....	22

2.2. Organik Sentez Prosedürleri	22
2.2.1. NBD–Tz Bileşiklerinin Sentezi için Genel Yöntem	22
2.2.2. NBD–Tz(H/Me) Bileşikleri ile Nb Bileşiğinin TETDA Tepkimeleri için Genel Prosedür	24
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1. NBD–Tz Bileşiklerinin Sentezi.....	26
3.2. NBD–Tz Bileşiklerinin Nb Dienofili ile TETDA Tepkimeleri	27
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	30
EKLER	34
Ek 1: NMR ve HRMS Kopyaları	34
Ek 2: NBD-TzH bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	35
Ek 3: NBD-TzH bileşiğinin HRMS spektrumu	36
Ek 4: NBD-TzMe bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	37
Ek 5: NBD-TzMe bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	38
Ek 6: NBD-TzMe bileşiğinin HRMS spektrumu.....	39
Ek 7: NBD-TzH-NB bileşiğinin HRMS spektrumu	40

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADIBO	: Azadibenzosiklooktin
Cm	: santimetre
CuAAC	: Cu(I) katalizlenmiş azit-alkin tepkimesi
Cys	: Sistein
DA	: Diels-Alder
DMF	: <i>N, N</i> -Dimetilformamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo-Nükleik Asit
GSH	: Glutasyon
Hcy	: Homosistein
iEDDA	: Ters Elektron Talebi Diels-Alder
TETDA	: Ters Elektron Talebi Diels-Alder
Ns	: nanosaniye
SPAAC	: Gergin Halkalı Azit-Alkin Siklokatılma
TCO	: <i>Trans</i> -Siklookten
THF	: Tetrahidrofuran
TTCO	: Tetrazin <i>trans</i> -Siklookten Ligasyonu
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	“Klik” Reaksiyonun Gösterimi (Kolb vd., 2016)	1
Şekil 1.2.	Nükleofilik Halka Açılma Reaksiyonları (Taşdelen vd., 2016)	3
Şekil 1.3.	Siklokatılma Reaksiyonları(Taşdelen vd., 2016).....	4
Şekil 1.4.	Tiyol-en Katılma Reaksiyonları (Taşdelen vd., 2016).....	4
Şekil 1.5.	Aldehit/Keton-Nükleofil Kondensasyonları (Shieh ve Bertozzi, 2014)...	5
Şekil 1.6.	Cu (I) Katalizörlü Azit-Alkin Siklokatılma (CuAAC) "Klik" Reaksiyonu Mekanizması (Grammel and Hang, 2013).....	6
Şekil 1.7.	Gergin Halkalı Azit - Alkin Siklokatılma (SPAAC) Reaksiyonu Mekanizması (Grammel and Hang, 2013).....	6
Şekil 1.8.	Tetrazin ile <i>trans</i> -siklookten ligasyonu reaksiyonu mekanizması (Kang vd., 2017)	8
Şekil 1.11.	Yaygın floroforlar (POPOP, flöresin, akridin turuncusu, rodamin b) (Lakowicz, 2006).	15
Şekil 1.13.	Bisakrilat prob (Wang vd., 2012)	18
Şekil 1.14.	Monoakrilat prob (Wang vd., 2012)	18
Şekil 1.15.	Bisakrilat ve monoakrilat problemlerinin tiyol ile reaksiyonu (Wang vd., 2012)	19
Şekil 1.16.	Işık araştırma grubu (Işık ve Kısaçam, 2024) tarafından geliştirilen tetrazin-florofor sistemleri (literatür ile kıyaslı).	20
Şekil 1.17.	Işık araştırma grubu (Işık ve Kısaçam, 2024) tarafından geliştirilen kolay erişimli tetrazin-florofor boyaları.	20
Şekil 1.18.	Hedeflenen NBD-Tz bileşiklerinin sentez stratejisi: A. NBD-F ve NBD-Cl ile ticari tetrazinlerin kenetlenme tepkimeleri ve B. NBD-Tz bileşikleri ile Nb gerilimli dienofili arasında gerçekleştirilmesi planlanan TETDA tepkimeleri.....	21
Şekil 3.1.	AminoTzH•HCl ve AminoTzMe•HCl bileşiklerinin NBD-Cl ve NBD-F bileşikleri ile bazik ortamda S _N Ar tipi kenetlenme reaksiyonları.....	27
Şekil 3.2.	NBD-Tz bileşiklerinin Nb dienofili/TETDA siklokatılma tepkimeleri..	28

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Yaygın olarak kullanılan biyoortogonal klik reaksiyonları	7
--	---



BAZI NİTROBENZOFURAZAN–TETRAZİN BOYALARININ TERS ELEKTRON TALEPLİ DİELS–ALDER TEPKİMELERİ

ÖZET

Bu tez çalışmasında, ticari olarak temin edilen aminotetrazinler (aminoTzH•HCl ve aminoTzMe•HCl) ile Floro-Nitrobenzofrozan (NBD-F) amin-reaktif profloroforu kullanılarak Süstitisyon Nükleofilik Aromatik (S_NAr) tepkimesiyle iki Tetrazin bazlı Nitrobenzofrozan (NBD-Tz) bileşiği başarıyla sentezlenmiştir. Elde edilen bileşikler, NMR spektroskopisi ve HRMS analizleriyle detaylı olarak karakterize edilmiştir.

NBD-Tz bileşiklerinin diklorometan (DCM) çözeltilerinde floresans ışıma göstermediği, ancak halka gerilimli *egzo*-norbornen-2-metanol Norbornen (Nb) ilavesiyle sarı-turuncu renkli floresans özelliği kazandığı belirlenmiştir. Bu reaksiyonun, HRMS analiziyle dihidropiridazin yapısındaki siklokatılma ürünleri oluşturduğu gösterilmiştir.

Ticari olarak kolay erişilebilen S_NAr tepkenleri ve Nb dienofilinin kullanımı, NBD-Tz bileşiklerinin sentezini basitleştirmiştir. Ayrıca, Ters Elektron Talepli Diels Alder (TETDA) tepkimesinin bilhassa H-sonlu NBD-Tz ile hızlıca gerçekleşmesi, biyoortogonal kimya alanındaki bu tür yöntemlerin daha geniş bir araştırmacı kitlesine ulaşmasını sağlayacak potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nitrobenzofurazan, Tetrazin, Florofor, Ters Elektron Talepli Diels-Alder, Norbornen.

INVERSE ELECTRON DEMAND DIELS–ALDER REACTIONS OF SOME NITROBENZOFURAZANE–TETRAZINE DYES

ABSTRACT

In this thesis study, two NBD-Tz compounds were successfully synthesized via S_NAr reaction using commercially available aminotetrazines (aminoTzH•HCl and aminoTzMe•HCl) and the NBD-F amine-reactive profluorophore. The synthesized compounds were thoroughly characterized using NMR spectroscopy and HRMS analysis.

It was determined that the NBD-Tz compounds did not exhibit fluorescence emission in DCM solutions but gained yellow-orange fluorescence properties upon the addition of the strained dienophile *exo*-norbornene-2-methanol (Nb). HRMS analysis confirmed that this reaction produced cycloaddition products with a dihydropyridazine structure.

The use of commercially accessible S_NAr reactants and the Nb dienophile simplified the synthesis of NBD-Tz compounds. Furthermore, the rapid execution of the TETDA reaction, particularly with H-terminal NBD-Tz, demonstrates its potential to make such methods in bioorthogonal chemistry more accessible to a broader research community.

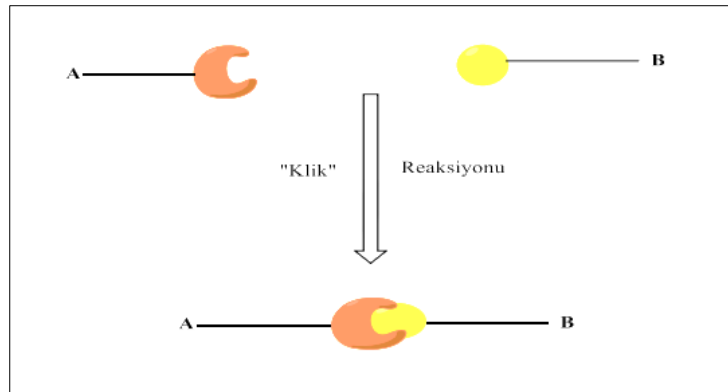
Keywords: Nitrobenzofurazane, Tetrazine, Fluorophore, Inverse Electron Demand Diels-Alder, Norbornene.

1. GİRİŞ

1.1. Klik Kimyası

Günümüzde “klik” kimyası olarak bilinen azit-alkin tepkimesi, 1950 yılında Alman kimyager Rolf Huisgen tarafından keşfedilmiştir. Yüksek sıcaklıkta gerçekleşen Huisgen reaksiyonlarında katalizör kullanılmadığı için reaksiyon süreleri uzundur. Bu tepkimelere “klik kimyası” adını kazandıran K. Barry Sharpless, 2001 yılında yayımladığı öncü çalışmasıyla bu kavramı, daha uygun koşullarda gerçekleşen reaksiyonları tanımlamak üzere yeniden ele almıştır (Kolb vd., 2001). Sharpless, bu çalışmasıyla 2022 Nobel Kimya Ödülü’ne layık görülmüştür. Bu bağlamda, Sharpless, “klik kimyası” terimini, çeşitli fonksiyonel grupların ılıman şartlar altında kolay ve hızlı bir şekilde sentezlendiği organik reaksiyonları tanımlamak için kullanmıştır (Kolb vd., 2001).

Klik kimyası, birbirleriyle seçici ve hızlı bir şekilde reaksiyona giren fonksiyonel gruplar arasında gerçekleşen reaksiyonları ifade eder. Başta biyoloji, kimya, malzeme bilimi ve ilaç sanayi olmak üzere, “klik kimyası” çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, Şekil 1’de şematize edildiği gibi, A ve B gibi iki molekülün yüksek verimle ve yan ürün oluşturmadan birleşmesine dayanır. Klik reaksiyonları, termodinamik olarak en az 20 kcal/mol enerji gereksinimiyle karakterize edilmektedir (Gandhi vd., 2012).



Şekil 1.1. “Klik” Reaksiyonun Gösterimi (Kolb vd., 2016)

1.1.1. Klik Kimyası Özellikleri

Klik reaksiyonları, geniş kapsamlı uygulama alanı, yüksek verimlilik, basit reaksiyon kurulumu ve üstün çok yönlülük gibi özellikleriyle öne çıkmaktadır. Bu reaksiyonlarda, çözücünün kolayca uzaklaştırılabilmesi ve kromatografik olmayan yöntemlerle yan ürünlerin etkin biçimde ayrıştırılabilmesi, sürecin ekonomik ve çevresel açıdan avantaj sağlamasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, bu yöntem hem küçük hem de büyük ölçekli üretim süreçlerine uyarlanabilmekte; basit reaksiyon koşulları, zararsız yan ürün oluşumu ve su ile oksijene karşı gösterdiği dayanıklılık, pratik kullanımını desteklemektedir.

- **Çok seçici:** Klik kimyası reaksiyonu, yalnızca alkin ve azit fonksiyonel grupları arasında gerçekleşmektedir. Bu nedenle, deoksiribo nükleik asitte (DNA) bulunan diğer organik fonksiyonel gruplar – örneğin amino ve karboksil grupları – ile etiketlenmiş proteinlere müdahale edilmemektedir. Başka bir deyişle, bu reaksiyon biyolojik organizma içindeki doğal kimyasal süreçlerle etkileşime girmemektedir.

- **Doğal biyomoleküllerde azit ve alkin fonksiyonel grupları yoktur:** Bahsi geçen grupların DNA ve proteinlere özel olarak tanıtılması gerekmektedir. Doğal bir sonuç olarak çapraz tepkimeler yoluyla enterferans gözlenmez.

- **Klik kimyası suda gerçekleşebilir:** Sulu Dimetilsülfoksit (DMSO), *N,N*-Dimetilformamid(DMF), Tetrahidrofuran (THF), asetonitril, alkoller ya da saf su gibi ortamlarda gerçekleşebilmektedir. Reaksiyon biyo-uyumludur ve canlı hücrelerde gerçekleşebilmektedir.

- **Reaksiyon kantatif ve hızlıdır:** Reaksiyon, yüksek hız ve kantatif dönüşümler göstermektedir. Görece düşük sıcaklıklarda dahi yüksek reaksiyon hızlarına sahip olup, aşamalı büyüme polimerlerinin kantatif sentezi için pratik ve etkili bir yöntem sunmaktadır.

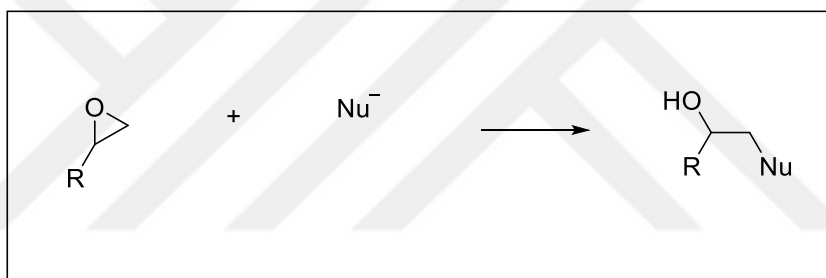
- **Reaksiyon pH'a duyarsızdır:** pH kontrolüne ve asit-baz ilavesine gerek yoktur. En iyi sonuçları 4-11 pH aralığında vermektedir (El-Sagheer ve Brown, 2010).

1.1.2. Klık Kimyasının Türleri

Klık kimyasının en yaygın örnekleri arasında nükleofilik halka açılma reaksiyonları, siklokatılma reaksiyonları, tiyol-en katılma reaksiyonları ve aldehit/keton-nükleofil kondensasyonları kimyası yer almaktadır.

1.1.2.1. Nükleofilik Halka Açılma Reaksiyonları

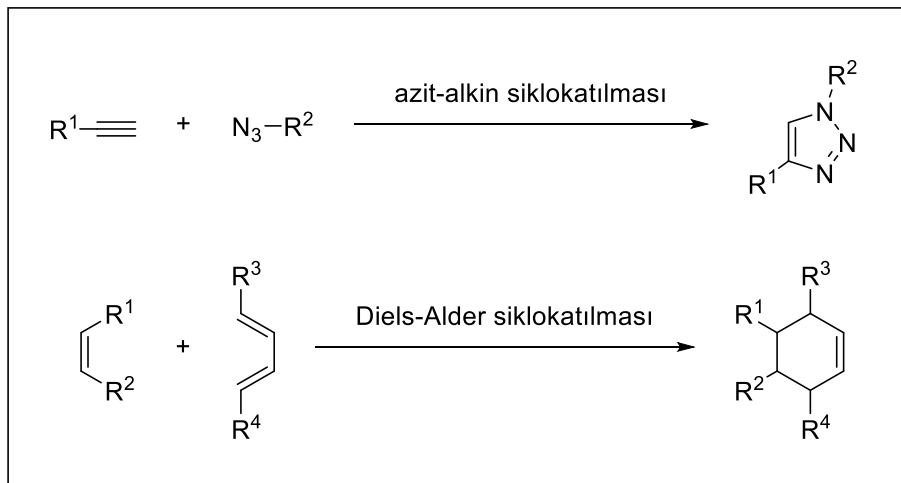
Bu reaksiyonlar, başta aziridinler ve epoksitler olmak üzere siklik sülfatlar, aziridinyum iyonları gibi heterosiklik bileşiklerin halka açılması sonucu oluşan bileşikler kapsamaktadır. Şekil 2’de, nükleofilik halka açılma reaksiyonları genel olarak şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Nükleofilik Halka Açılma Reaksiyonları (epoksit açılması) (Taşdelen vd., 2016)

1.1.2.2. Siklokatılma Reaksiyonları

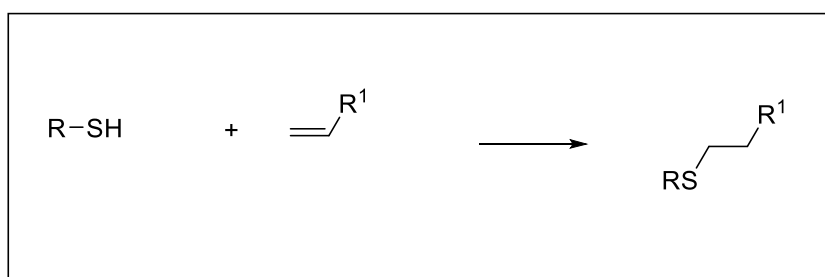
Bu reaksiyonlar, Huisgen, Hetero Diels-Alder ve 1,3-dipolar siklokatılma reaksiyonlarını içermektedir. Reaksiyon mekanizması, bir ucunda alkin, diğer ucunda azit bulunan grupların triazol halkası oluşturarak kenetlenmesiyle gerçekleşmektedir. Ancak, azit ve alkinlerin katalizör yokluğunda gerçekleşebilmesi için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyduğu not edilmelidir. Şekil 3’te siklokatılma reaksiyonlarına yer verilmiştir.



Şekil 1.3. Siklokatılma Reaksiyonları(Taşdelen vd., 2016)

1.1.2.3. Tiyol-en Katılma Reaksiyonları

Tiyol-ene reaksiyonu (aynı zamanda alken hidrotiyolasyonu olarak da bilinir), bir tiyol ($R-SH$) ile bir alken ($R_2C=CR_2$) arasında gerçekleşen ve sonucunda tiyoeter ($R-S-R^1$) oluşturan bir organik reaksiyondur. Yüksek verim, stereoselektivite, hızlı reaksiyon kinetiği ve termodinamik olarak güçlü bir itici kuvvete sahip olması nedeniyle, bu reaksiyon klik kimyası reaksiyonları arasında kabul edilmektedir. Tepkime genel şeması, Şekil 4’de gösterilmiştir.

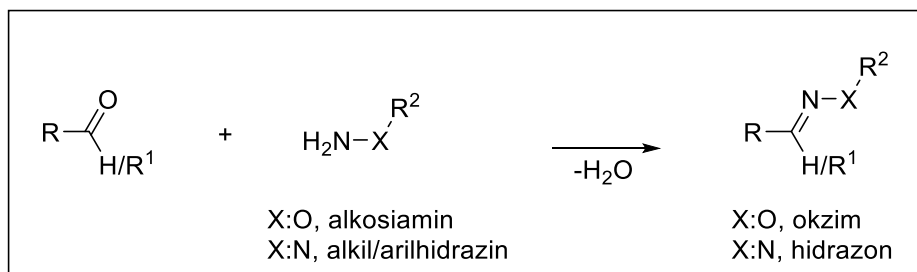


Şekil 1.4. Tiyol-en Katılma Reaksiyonları (Taşdelen vd., 2016)

1.1.2.4. Aldehit/Keton-Nükleofil Kondensasyonları

Aldehitlerin, alkoksiaminler veya hidrazinler gibi α -etki gösteren amin-bazlı nükleofiller ile oksim veya hidrazon fonksiyonel grupları oluşturarak kondenzasyonu, biyolojik

sistemlerde yaygın olarak kullanılan ilk kemoselektif ligasyon reaksiyonlarından biri olarak bilinmektedir (Şekil 5). Ancak, bu reaksiyonun biyoortogonalitesini sınırlayan önemli bir faktör, hücre içi metabolitlerde aldehit ve ketonların doğal olarak bulunmasıdır.



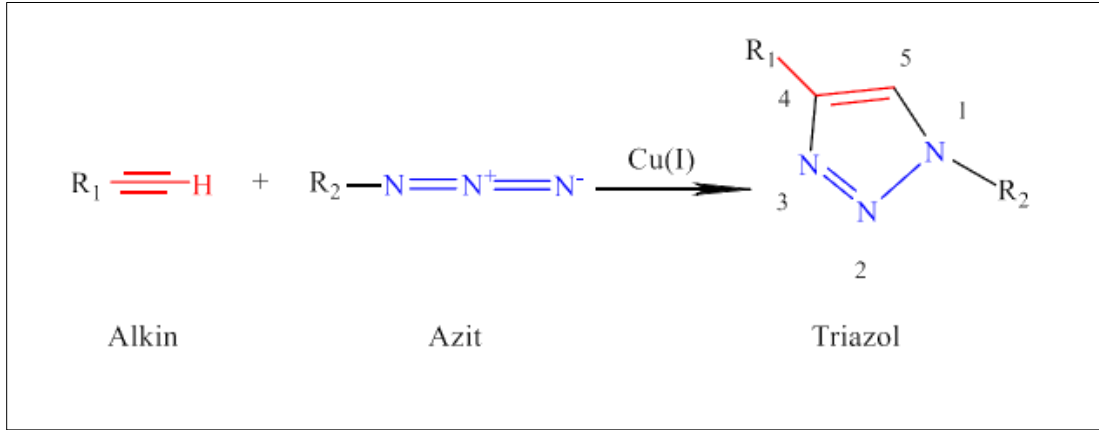
Şekil 1.5. Aldehit/Keton-Nükleofil Kondensasyonları (Shieh ve Bertozzi, 2014)

Klik kimyası, Cu(I) katalizlenmiş ve Cu(I) katalizlenmemiş olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Cu(I) katalizlenmiş azit-alkin klik kimyası (CuAAC), reaksiyonun Cu(I) iyonları aracılığıyla gerçekleşmesine dayanırken, gergin halkalı azit-alkin siklokatılma (SPAAC) klik kimyası ve tetrazin *trans*-siklookten ligasyonu (TCO) gibi reaksiyonlar sitotoksik özellik gösteren bakır iyonlarına ihtiyaç duymamaktadır.

Öte yandan, iyi bilinen bakır içermeyen azit-fosfin reaksiyonu, fosfinlerin kararsızlığı ve yavaş kinetiği nedeniyle sınırlı bir ilgi görmüş ve araştırmacıları diğer klik reaksiyonlarına yönlendirmiştir.

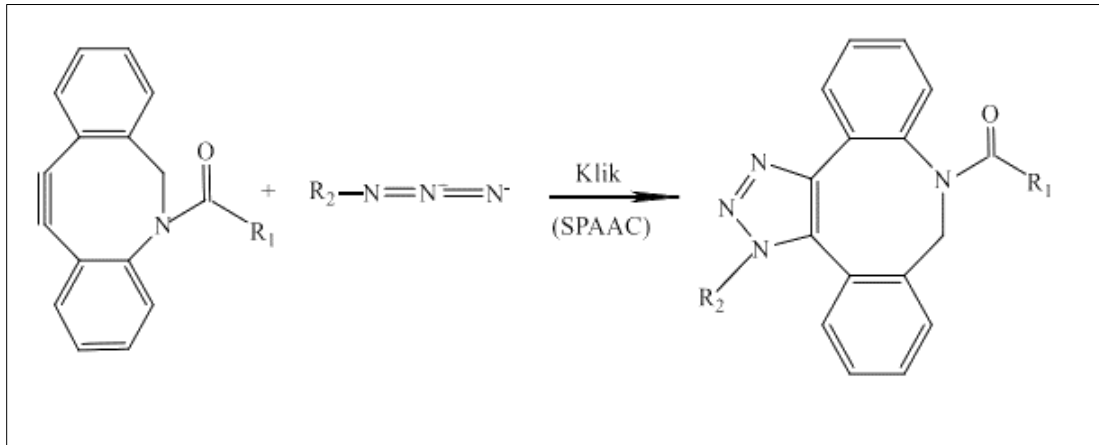
Genel olarak, klik reaksiyonları, seçicilik, biyouyumluluk, stabilite ve reaktivite açısından üç gruba ayrılmaktadır:

- **Cu(I) Katalizörlü Azit-Alkin Siklokatılma (CuAAC) Klik Reaksiyonu:** Bu reaksiyon türü, en gözde klik reaksiyonu olarak ön plana çıkmaktadır. Muhteşem bir anahtar kilit ilişkisinde birleşme özelliği bulunmaktadır. Bu reaksiyonu gözde kılan ise uygulanabilirliği, verimliliği, yüksek sıcaklık istememesi gibi nitelikleridir. Cu(I) katalizi kullanılması reaksiyonun 107 kat daha hızlı olmasını sağlarken verimini de arttırmıştır (Meyvacı, 2016). Bakırın toksik etkisinden ötürü, hücre etiketlenmesinde veya canlı içinde kullanılması önerilmemektedir. Diğer klik reaksiyonlarına kıyasla reaksiyon hızı düşüktür. Şekil 6'da reaksiyon genel şeması gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Cu(I) Katalizörlü Azit-Alkin Siklokatılma (CuAAC) "Klik" Reaksiyonu Mekanizması (Grammel and Hang, 2013)

• **Gergin Halkalı Azit-Alkin Siklokatılma (SPAAC) "Klik" Reaksiyonu:** SPAAC reaksiyonları, düşük aktivasyon enerjilerinden ötürü katalizöre ihtiyaç duymamaktadır. Bu nedenle toksik Cu(I) türlerine ihtiyacı bertaraf ederler. Azadibenzosiklooktin (ADIBO=DBCO) bazlı reaktifler, azit fonksiyonlu moleküllerin arka planda etiketlenmesine izin vermektedir. Azit-DBCO reaksiyonları son derece seçicidir. Bu sebeple bu reaksiyonlar ile tetrazin trans-siklookten ligasyonu reaksiyonları çift etiketleme yaklaşımı için idealdir (Grammel ve Hang, 2013). Şekil 7'de ise reaksiyon mekanizmasına yer verilmiştir.



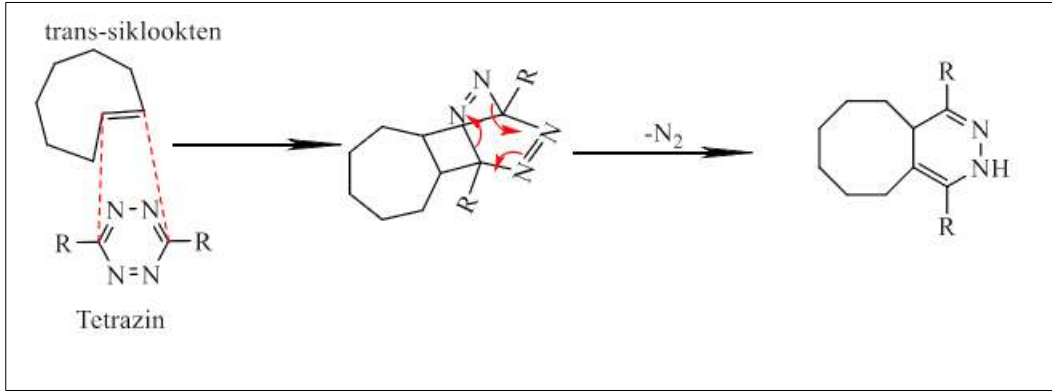
Şekil 1.7. Gergin Halkalı Azit-Alkin Siklokatılma (SPAAC) Reaksiyonu Mekanizması (Grammel and Hang, 2013)

• **Tetrazin *trans*-Siklookten Ligasyonu (TTCO):** Çok hızlı reaksiyon kinetiğine sahip olması, son on yılda en fazla tercih edilen klik reaksiyonu olmasını sağlamıştır. Hücre içinde biyomolekül etiketlenmesine olanak tanımaktadır; bunu sitotoksik bakır iyonlarına ihtiyaç duymadan yüksek tepkime hızları ile gerçekleşmesine borçludurlar. Canlı sistemler içinde gerçekleşen pek çok biyokomiyasal reaksiyondan hiçbir şekilde etkilenmeden ve herhangi bir olumsuz durum (yan ürün vb.) yaratmadan gerçekleşmektedir (Sletten ve Bertozzi, 2009).

Canlı sistem içinde protein etiketleme, protein modifikasyonu, kanserli doku görüntüleme, pozitron emisyon tomografi gibi canlı içi uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bakır katalizli reaksiyonlarının, toksik etkisi ile bakırın DNA hasarına yol açması nedeniyle canlı içi uygulamalarda tetrazin *trans*-siklookten reaksiyonu aha çok tercih edilmektedir. Proteinler ile polimerlerin birleşme reaksiyonunda verimler yüksek seyreder. Tüm bunlarla birlikte süper hızlı reaksiyon kinetiğine de sahiptir. Tablo 1’de Ters Elektron Talebi Diels Alder (IEDDA veya TETDA) reaksiyonu ile diğer klik reaksiyonların kinetiği karşılaştırılmıştır. Reaksiyon tetrazin molekülü ile *trans*-siklookten arasında ters elektron talebiyle ortama azot gazı vererek birleşmesi esasına dayanmaktadır. Şekil 8’de reaksiyon mekanizmasına yer verilmiştir.

Tablo 1.1. Yaygın olarak kullanılan biyoortogonal klik reaksiyonları

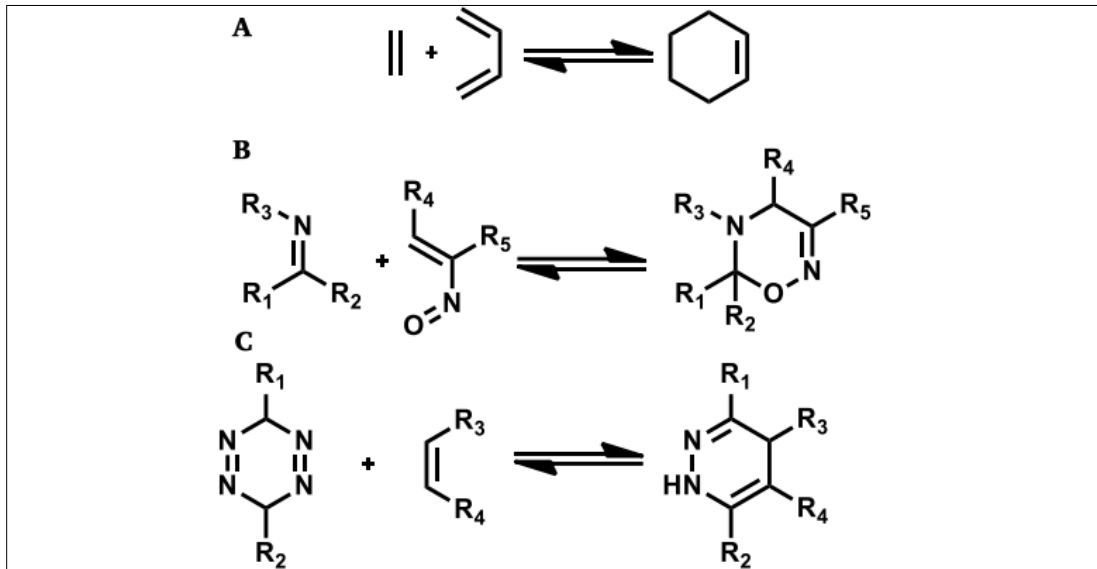
Reaksiyon İsmi	Reaktifler	Reaksiyon Hızı [$M^{-1}s^{-1}$]
Staudinger	Fosfin-Azit	$2,2 \times 10^{-3}$
CuAAC	Alkin-Azit	$10^{-2} - 10^{-4}$
Yetersiz Elektronlu AAC	Diflorosiklooktin-Azit	8×10^{-3}
Gergin Halka AAC	Biarilazasiklooktinon-Azit	1
IEDDA (TETDA)	Tetrazin-Siklookten	$3,8 \times 10^5$
IEDDA (TETDA)	Tetrazin-Norbornen	1-10



Şekil 1.8. Tetrazin ile *trans*-siklookten ligasyonu reaksiyonu mekanizması (Kang vd.,2017)

1.2. Diels-Alder Reaksiyonları

Organik kimyada en iyi bilinen klik reaksiyonlarından biri olan Diels-Alder (DA) reaksiyonu, 1928 yılında Otto Diels ve Kurt Alder tarafından keşfedilmiştir. DA reaksiyonunun sıklıkla tercih edilmesinin sebebi hızlı, basit, geniş alanlarda uygulanabilirliği ve ılıman reaksiyon koşullarında gerçekleşebilir olmasıdır (Png vd., 2017). DA reaksiyonları, karbon-karbon bağlarının eş zamanlı oluşumunu ve yıkımını kapsamaktadır (Peterson ve Palmese, 2009).



Şekil 1.9. Diels-Alder reaksiyonları (A: normal elektron talepli Diels-Alder reaksiyonu, B: hetero Diels-Alder reaksiyonu, C: ters elektron talepli Diels-Alder reaksiyonu)(Peterson ve Palmese, 2009)

Dienofilin en düşük enerjili boş molekül orbitali (LUMO) ile dienin en yüksek enerjili dolu molekül orbitali (HOMO) eşleşmesiyle DA reaksiyonunun etkinliğinin, elektronca fakir dienofiller ve elektronca zengin dienler kullanılarak arttığı saptanmıştır (Png vd., 2017). DA reaksiyonu, sabit bir siklohekzen ürünü elde edebilmek üzere elektronca fakir dienofil ve elektronca zengin dien arasında doğrudan bir [4+2] siklokatalıma reaksiyonu olarak meydana gelmektedir (Şekil 9A). Dien ve dienofil aynı molekülün bir parçası ise, intramoleküler DA siklokatalıma olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte DA reaksiyonlarından dienofilden veya dien en az birinin heteroatom içerdiği bilinmektedir. Bu reaksiyonun tamamı hetero-DA reaksiyonu olarak isimlendirilmiştir (Şekil 9B) (Gregoritz ve Brandl, 2015).

DA reaksiyon mekanizması bir diradikali kapsayan tek basamaklı bir mekanizma veya iki basamaklı bir mekanizma ile gerçekleşip gerçekleşmediği DA reaksiyonunun keşfinden itibaren bir tartışma konusu olmuştur. Bugün halen daha geçerli olan görüş ise DA siklokatalımanın halkalı bir geçiş durumunu içeren eş zamanlı bir reaksiyon olduğu yönündedir (Woodward ve Katz, 1959; Houk vd., 1986; Dewar vd., 1986).

DA mekanizması, etilen ve 1,3 butadien reaksiyon partnerleri kullanılarak açıklanmıştır. Ayrıca, reaksiyon partnerleri içinde ters elektron dağılımı sebebiyle yavaş reaksiyon kinetiğine sahip bir yapıdadır. Elektronca zengin olan dienler ile elektronca fakir olan dienofillerin reaksiyona girmesiyle oluşan bu siklokatalıma çok daha hızlı ilerlemektedir. Bu sebeple, tipik DA reaktanlarında “iyi” dienler alkil zincirleri gibi elektron veren grupları ikame eden, reaktif dienofiller ise ketonları, karboniller, nitriller, karboksiller veya halojenler gibi elektron çeken grupları yapılarında bulundurmaktadır. DA siklokatalıması, tahmin edilebilir sterekimyaya sahip olmasıyla büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca ekonomik ve yüksek verimlidir. Doymamış 6 üyeli halkaları sentezlemek üzere kullanılan en güçlü yöntemlerden biri olarak ön plana çıkmaktadır (Nicolaou vd., 2002).

Frontier Molekül Orbital (FMO) teorisine göre, dienlerin en yüksek dolu molekül orbitali (HOMO), dienofilin en düşük boş molekül orbitali (LUMO) ile etkileşime girerek reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar. 2008 yılında birbirlerinden bağımsız bir şekilde hem Fox hem Hilderbrand araştırma grupları tarafından potansiyel bir klik kimyası yöntemi olarak raporlanmıştır. Ayrıca 2008 yılından itibaren hem malzeme alanında hem de

biyokimya alanındaki kullanımı her geçen gün artmıştır (Png vd., 2017). DA reaksiyonu ve hetero-DA reaksiyonları dahil olmak üzere farklı siklokatalizma reaksiyonları klik reaksiyonu olarak kullanılmıştır. Ayrıca, söz konusu reaksiyonların tamamı arasında konjugasyon yöntemleri açısından sınırlı uygulanabilir veya tamamen uygulanamaz bir durum tespit edilmemiştir (Ramapanicker ve Chauhan, 2016).

1.2.1. Diels-Alder Reaksiyonun Avantajları

Diels-Alder reaksiyonu, organik kimya alanının en önemli tepkimelerinden biridir. A reaksiyonu, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar açısından giderek daha büyük bir önem kazanmaktadır (Nicolaou vd., 2002). Uygun dien-dienofil çiftleri kolaylıkla sentezlenebilmekte ve ilgili moleküller hassas fonksiyonel gruplar ile modifiye edilebilmektedir. DA reaksiyonu, sulu ortamda gerçekleşebilmesi sayesinde toksik ve pahalı çözücülere olan ihtiyacı ortadan kaldırarak önemli avantajlar sunmaktadır. İlginç bir şekilde, hidrojen bağlarının aktifleştirilmiş kompleks ile etkileşimi ve hidrofobik etkileşimlerin güçlenmesi, DA reaksiyonunun su içinde önemli ölçüde hızlanmasına neden olmaktadır (Meijer vd., 1998). DA reaksiyonunun en dikkat çekici özelliklerinden biri, reaksiyon kinetiğinin ılıman koşullarda nispeten yavaş olmasına rağmen oda sıcaklığında gerçekleşebilir olmasıdır (De Araújo vd., 2006).

Tıbbi cihazlarda ve farmasötik ürünlerde kullanılan malzemelerin güvenliği ve saflığı ön koşul olduğundan, DA reaksiyonu, hedeflenen nanoparçacıkların geliştirilmesinde veya polimer-ilâç konjugasyonlarının hazırlanmasında oldukça kullanışlı bir biyo-konjugasyon reaksiyonu olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, hem reaksiyon hızının hem de denge dönüşümünün, dien-dienofil çiftinin ikame modeline bağlı olduğu bilinmektedir (Koehler vd., 2012). Genellikle katalizör veya başlatıcı gerektirmemesi ve yan ürün oluşmaması, elde edilen ürünün ekstra saflaştırma gerektirmemesini sağlamaktadır. DA reaksiyonunun bu özellikleri, özellikle polimerler, proteinler, dendrimerler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin reaksiyona dahil olduğu durumlarda büyük önem taşımaktadır. DA reaksiyonu, sulu ortamda ve katalizörsüz bir şekilde oda sıcaklığında gerçekleşmesiyle yan ürün oluşturmaz. Bu özelliği sayesinde, ilâç salımı ve doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilen hidrojeller gibi *in situ* oluşan malzemelerin hazırlanmasında etkili bir çapraz bağlanma metodu olarak kullanılmaktadır (Koehler vd., 2012).

1.2.2. Tetrazin Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder Reaksiyonu

Ters elektron gereksinimli Diels-Alder (iEDDA veya TETDA) reaksiyonu, 1949 yılında Deno ve Bachmann tarafından keşfedilmiş olup, elektronca zengin bir dienofil ile elektronca fakir bir dien arasındaki özel bir reaksiyon mekanizmasını temsil etmektedir (Bachmann ve Deno, 1949). Genellikle elektronca fakir dienofiller ve elektronca zengin dienler arasındaki normal elektron gereksinimli DA reaksiyonuna ek olarak, iEDDA reaksiyonu, reaktantlar arasındaki elektron dağılımına alternatif bir reaksiyon olarak tanımlanmıştır. Reaksiyon mekanizması boyunca, elektronca zengin bir dienofil ile elektronca fakir bir dien arasında altı üyeli bir halka oluşmaktadır (Şekil 9C) (Gregoritz ve Brandl, 2015). iEDDA reaksiyonu, geleneksel DA reaksiyonlarıyla benzer şekilde birçok farklı uygulama alanında önemli katkılar sağlamaktadır. Yüksek verimlilik, ılıman reaksiyon koşulları ve hızlı reaksiyon kinetiği sayesinde, iki molekülün kolayca birleşmesini sağlayarak karmaşık moleküllerin sentezinde, ilaç ve malzeme biliminde, biyoetiketleme uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.2.3. Tetrazinler

Tetrazin reaktif birimi, iEDDA reaksiyonu için en reaktif dienlerden biri olup, bu reaksiyon mekanizmasında kritik bir rol oynamaktadır. Dört azot atomu içeren altı üyeli bir aromatik halka yapısına sahip olan tetrazin, üç farklı izomere sahiptir. Bu izomerler arasında 1,2,4,5-tetrazin, iEDDA reaksiyonunda en yaygın kullanılan form olup, bazı durumlarda “s-tetrazin” olarak da adlandırılmaktadır. iEDDA reaksiyonu, tersinmez bir reaksiyon türü olup, biyoetiketleme amacıyla geleneksel DA reaksiyonuna kıyasla daha yaygın olarak tercih edilmektedir (Kang vd., 2016).

Tetrazin kimyası, tarihte ilk kez Carboni ve Lindsey tarafından rapor edilmiş olup, (Carboni ve Lindsey, 1959) son yıllarda yeni sentez yöntemlerinin geliştirilmesi ve biyo-ortogonalite kavramının ortaya çıkmasıyla yeniden ilgi görmeye başlamıştır. *Trans*-siklookten (TCO), iEDDA reaksiyonu için kritik bir reaktant olup, 2008 yılında Royzen ve çalışma arkadaşları tarafından etkin sentezi için yeni bir fotokimyasal yöntem geliştirilmiştir (Royzen vd., 2008). Bu önemli gelişmeyi takiben, 2012 yılında Yang vd.

tarafından tetrazin sentezi için Lewis asit katalizörünü içeren etkili bir sentez metodu önerilmiştir (Yang vd., 2012). Bu ve benzeri çalışmalar, tetrazin kimyasının yalnızca klasik bir sentez yöntemi olarak kalmayıp, aynı zamanda biyo-organik kimyada yeni ufuklar açan önemli bir metod haline gelmesine olanak sağlamıştır.

1.3. Biyoortogonal Tepkimeler

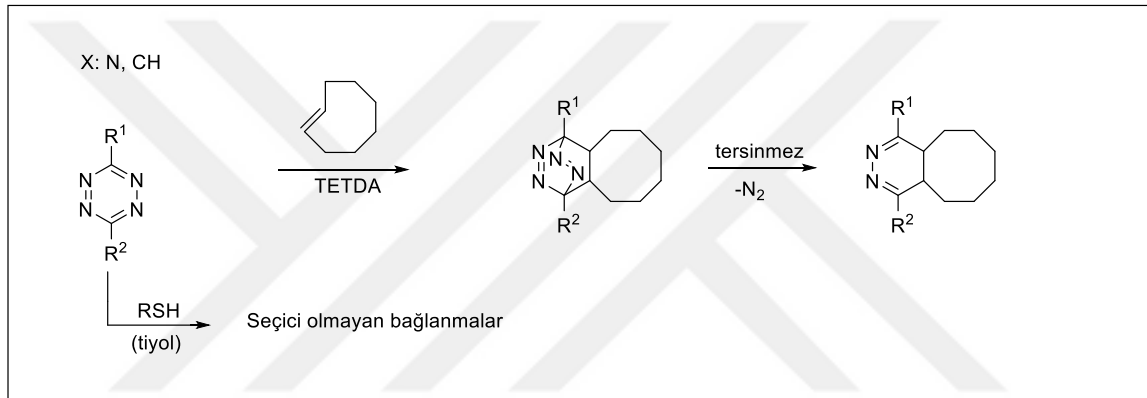
Biyoortogonal tepkimeler, bütün sisteme müdahale etmeden veya biyomoleküller arasında herhangi bir etkileşime gerek kalmaksızın biyolojik sistemler içinde sürebilen kimyasal tepkimeler olarak tanımlanmıştır (Patterson vd., 2014). Biyoortogonal kimya, biyomoleküllerin fonksiyonlarını, yapısı ve canlı sistemlerle hücre manipülasyonlarını inceleyerek reaksiyonun gerçekleşmesine kolaylık sağlayan kuvvetli bir araç olarak geliştirilmiştir (Qin vd., 2018).

Uygun koşullarda etkili ve seçici olarak ilerleyebilen bir kısım biyoortogonal reaksiyonlar hızlı kinetiğe sahip, sulu ortamlara karşı duyarlı, yüksek seçicilik ve doğal olarak oluşan fonksiyon gruplarıyla uyumlu özellikler taşımaktadır (Zheng vd., 2015). Biyoortogonal tepkimelerin ideal tamamlayıcı bileşenleri, biyolojik sistemlere karşı toksik ve inert olmamalıdır, fakat biyolojik ortamlarda yer aldıklarında birbirleri ile seçici, rekaktif ve biyouyumlu olmaları gerekmektedir (Zheng vd., 2015). Bahsi geçen özellikleriyle biyoortogonal tepkimeler, biyomolekülleri kendi doğal konumlarında etiketlemede oldukça kuvvetli bir araçtır. Hedef biyomoleküllere dahil edilen işlevsel grupla, biyoortogonal tepkimeler için seçici partner moleküler olarak kullanılarak iki adımlı tespit ve görüntülemede bu araçtan yararlanılmaktadır. Öte yandan biyoortogonal moleküllerin parçalanma reaksiyonları, ön ilaçların zaman-mekansal aktivasyonunun ve hücre içi proteinlerin kontrol edilmesini sağlamaktadır. Biyoortogonal tepkimeler, *in vivo* olarak moleküllerin, ön ilaçlarda olduğu gibi, mekânsal-zamansal olarak kontrol edilmesi ve süper çözünürlükte görüntülenmesi, post-translasyon modifikasyonlarının açıklanması için kullanılmıştır (Nikić vd., 2014).

Bioortogonal reaksiyonlar için özellikle fiziksel koşullar altında sağlamlık oldukça önemli bir durumdur. Bu tip dayanıklılıkları sağlamak için bazı reaksiyonlar tasarlanmış ve uygulanmıştır. Bu reaksiyonlar; Staudinger reaksiyonu ,bakır katalizörlüğünde azid-alkin

sikloadisyonu ve daha sonra geliştirilen ikinci nesil tepkimelerden olan azid-alkin sikloadisyonları (SPAAC), alkin-nitron sikloadisyonları (SPAN), tetrazin ligasyonu (s-tetrazin)dur. Bu reaksiyona Şekil 10 'da yer verilmiştir. Bu reaksiyonlar içinde özellikle tetrazin ligasyonu canlı yapılarında uygulanabilir oluşuyla oldukça fazla uygulama alanı bulmuştur.

Bahsi geçen reaksiyonların sınırlılıkları ise kısaca şöyle ifade edilebilir. Staudinger reaksiyonu oksijen varlığında kararsız olan fosfora dayanırken bakır katalizli reaksiyonda ise bakır canlı yapılarda toksik etkiye neden olmaktadır.



Şekil 1.10 Dienler olarak tetrazinler veya triazinler kullanılarak gerçekleştirilen biyoortogonal iEDDA reaksiyonları

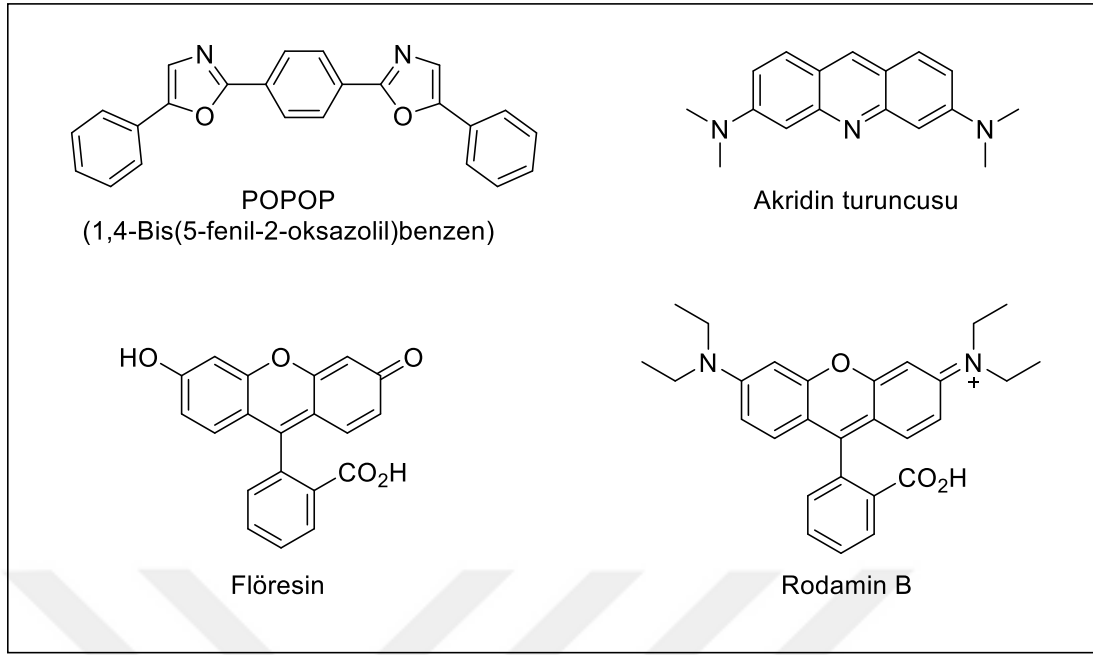
1.4. Floresan Problar

Floresan görüntüleme için kullanılan problar, hedef gözetmeyen problar ve hedefli problar olarak ikiye ayrılır. Hedef gözetmeyen problar, sistemik izlemelerde kullanılmaktadırlar. Hedefli problar, (florokrom, florofofor veya kromofor bileşikler) hedef bölgedeki hücrelerin reseptörlerine veya hedef analite doğrudan kovalent bağ veya moleküller arası etkileşimler ile bağlanırlar. Hedefli problara örnek olarak kanserli hücrelerin takibinde kullanılan problar verilebilir. Bunlara ilave olarak aktive edilebilen hedefli problar (activable probes) denilen bir grup prob, enzim çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Bu problarda iki veya daha fazla kromofor bileşik hücreye belli bir yakınlık derecesinde bağlanır (peptid bağlayıcılarla) ancak bu yakınlık öyle bir derecede olur ki birbirlerinin etkisini sönmümlendirerek ışımaya yapmazlar ancak tutundukları peptid bağlayıcı kırılır ve serbest hale

gelirse bu bileşikler normal floresan özellik göstermeye başlarlar. Geliştirilmiş bazı florofor probalar ise hedef moleküllere bağlanmadıklarında ışımaya yapmaz ya da düşük düzeyde ışımaya yaparlar. Ancak hedeflerine bağlandıktan sonra ışımalarını yoğunlaştırırlar (Tunç, 2019).

Herhangi bir maddeden elektronik olarak uyarılmış durumlardan ortaya çıkan ışığın emisyonu lüminesans olarak adlandırılmaktadır. Lüminesans, uyarılmış durumun yapısına bağlı olarak floresans ve fosforesans olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Lüminesansda, enerji kaynaklarından bazıları, en düşük enerjili “temel enerji” düzeyinde olan orbitalin bir elektronunu yüksek enerjili “uyarılmış” bir enerji düzeyine getirmektedir. Ardından elektron üzerinde bulunan fazla enerjiyi ışımaya yaparak harcamaktadır. Böylelikle “temel” enerji düzeyine geri dönerek lüminesansı meydana getirmektedir (Lakowicz, 2006). Floresans olayı söz konusu olduğunda ise molekül absorpsiyon yaparak temel elektronik ve titreşimsel durumdan uyarılmış hale geçmektedir. Molekül uyarılmış durumdan titreşimsel enerjisinin fazlasını moleküler arası çarpışmalar ile dağıtmaktadır. Ardından molekül bir ışın yayarak temel enerji düzeyine geri döner. Bu bağlamda tipik bir floresans yaşamömrü 10 nanosaniye (ns) civarlarındadır. Uyarılmış durumdan temel hal duruma geri dönüş arasındaki ortalama zaman bir floransın ömrünü tanımlamaktadır. Işık hızı bakımından 1 ns ışık ömrü dikkate alınmalıdır. Çünkü ışık, bir ns’de bir ayak boyu ya da yaklaşık 30 cm yol almaktadır. Pek çok florofor, ns’nin altında ömre sahiptir. Bunun nedeni ise floresansın kısa zaman aralıklı ve zaman bağımlı emisyon ölçümünden ötürü fazla gelişmiş optik ve elektronik bir sistem gerektirmesidir (Lakowicz, 2006).

Fosforesans, temel durumda aynı spin yönelimine sahip olan uyarılmış elektron olarak tanımlanan uyarılmış triplet durumdaki ışığın emisyonu olarak açıklanmaktadır. Temel durum geçişleri yasaktır ve emisyon oranları yavaştır. Haliyle fosforesansın ömrü çoğu zaman saniyeler ile milisaniyeler arasında olmaktadır. Fosforesans ile karanlıkta parlayan eşyalarda olduğu gibi daha uzun ömür mümkündür. Fosforesans maddeleri, ışığa maruz kaldıktan sonra birkaç dakika parlamaya devam ederken, uyarılan fosfor yavaş yavaş temel durumuna geri dönmektedir. Floresans işlemi tipik olarak aromatik moleküllerden meydana gelmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan florofor örneklerine Şekil 10’da yer verilmiştir.

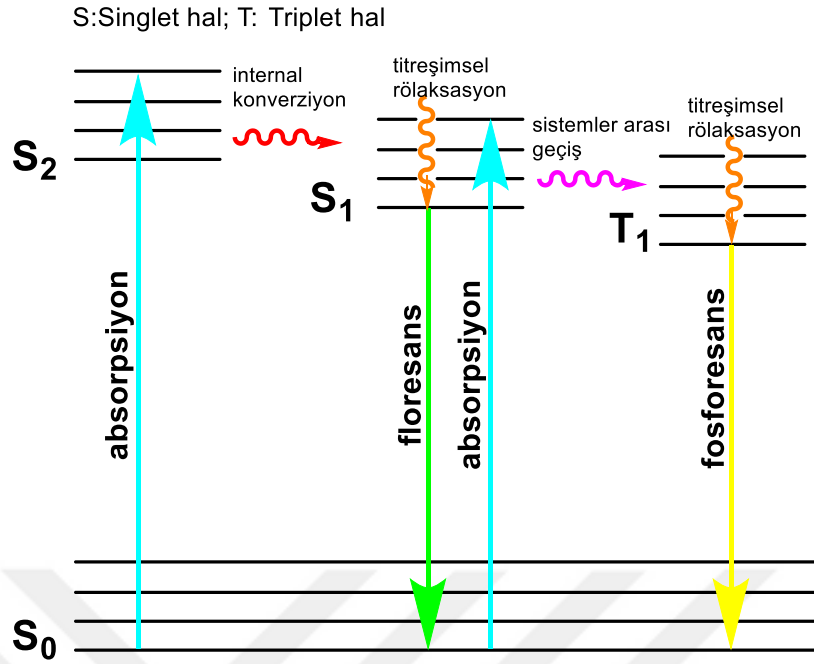


Şekil 1.11. Yaygın floroforlar (POPOP, flöresin, akridin turuncusu, rodamin b) (Lakowicz,2006)

1.4.1. Florofor ve Floresans Sönümlleme Mekanizmaları

Florofor boyalar; bir kimyasal bileşiğe bağlandığında ona floresan özellik kazandıran floresan boya maddesi veya reaktif boyalara denir. Floresansı özellik ise floroforun ışığa maruz kalması sonunda uyarılması ve bu uyarılma ile florofor molekülün zayıf bağlı elektronlarından birinin daha yüksek enerji düzeylerine çıkması sonucu oluşur. S_1 veya S_2 düzeyleri olarak tanımlanan singlet durumlardan (singlet states) sonra elektron temel haline (ground state) geri dönerken (S_0) dışarıya enerji verir. Dışarıya enerji verme iki şekilde olur. Floresan molekül ışıma yapmadan ısı enerjisi yayabilir ya da ışıma yaparak floresan foton yayabilir. Floresan foton yayma durumunda floresan ışıma gerçekleşmiş olur.

Jablonski diyagramı da floresanslar için titreşim seviyelerini içerir. Bir molekül bir foton emdiğinde, o fotonun enerjisi molekül iç enerjisi seviyesini artırır. Uyarılmış molekül enerjiyi serbest bıraktığında ise bunu bir foton biçiminde yapabilir. Elektronun triplet durumdan temel duruma dönerken yaptığı ışımaya fosforesan (phosphorescence) ışıma denir.



Şekil 1.12. Jablonski diyagramı

Floroforların floresans etkisi yüksek olan grupları içeren yapılar olduğundan bahsetmiştik. Florofor yapı ışık tarafından uyarılınca S_0 seviyesinden uyarılmış hali olan S_1 seviyesine geçer. Uyarılmış flofor S_0 seviyesine foton emisyonu ile dönerse floresans oluşur ancak foton S_0 temel haline ışımasız relaksasyon ile de dönebilir. Floresans emisyon şiddetinin farklı bir molekül kullanılarak azaltılması olayına floresans sönümlleme denilir.

Sönümlleme iki şekilde gerçekleşebilir. Biri statik sönümlleme diğeri ise dinamik sönümlmedir. Statik sönümlmede, floresans madde ve sönümleyici etkileşimi yapan maddenin bir araya gelmesi sonucu floresans emisyonu yapmayan bir kompleks yapı gerçekleşir. Dinamik sönümlmede ise esas florofor bileşik ile sönümleyici maddelerin çarpışması esastır. Floresans sönümlmede azalan floresans şiddeti vardır (Gedikli, 2023).

1.4.2. Tetrazin Bazlı Floresans Problar

Biyoortogonal olarak aktive edilebilir floresans problar, biyolojik molekülleri ve süreçleri görüntülemek ve izlenmesini kolaylaştırmak için paha biçilmez araçlar olarak ön plana çıkmaktadır. Tetrazin (1,2,4,5-tetrazin veya Tz) bağlama reaksiyonları ise günümüze kadar geliştirilen en kullanışlı biyoortogonal reaksiyonlardan biri olarak kabul edilebilir; çünkü

bu reaksiyon diğer klik reaksiyonlarının aksine, bir katalizör gereksinimine ihtiyaç duymaz. Reaksiyonlarda bakır kullanımı (sitotoksik bakır) istenen hızlarda tepkime eldesi için yeterlidir (Işık ve Kısaçam, 2024).

İEDDA reaksiyonu olarak, biyoortogonal uygulamalar için yaygın olarak kullanılan bir reaktif türü olan *trans*-siklookten (**TCO**) oldukça kullanışlı bir reaksiyondur çünkü fenillenmiş ($R_2 = \text{Ph}$) tetrazinler, ilgili alkillenmiş ($R_2 = \text{Me}$) tetrazinlere kıyasla TCO ile daha düşük bir aktivasyon bariyeri oluşturur. Bunun sebebi alkil bağlayıcı taşıyan tetrazinlerin, fenil bağlayıcı taşıyan tetrazinlerden daha yavaş reaksiyona girmesidir. İEDDA ile **TCO** reaksiyonu tetrazinlerin LUMO+1 orbitalinin ile etkileşimine neden olur, çünkü bu orbital, reaksiyon sırasında dienofil ile etkileşen orbitaldir. Sülfon **TSO** ve sülfoksit **TSO2** içeren orbitallerde ise bu etkileşimin olmadığı bunun sebebi ise LUMO ve LUMO+1 orbital enerjilerinin çok yüksek olmasıdır.

1.5. İlgili Araştırmalar

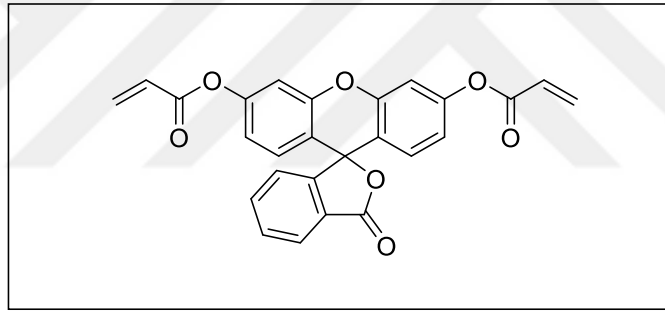
Devaraj vd. (2011) orta bir araştırmalarında, çeşitli biyolojik etiketleme ve görüntüleme çalışmaları için tetrazin kimyasını uygulamışlar ve bu uygulamayı başarılı bir şekilde sonuçlandırmışlardır.

Lang vd. (2014) bir çalışmalarında genetik kod genişletme stratejileri kullanılarak protein fonksiyonlarını ve dinamikleri kapsamlı bir biçimde tetrazine klik reaksiyonunu kullanarak incelemişlerdir.

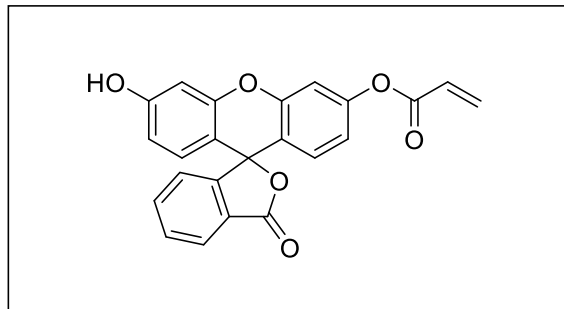
Fan vd. (2016), bir çalışmaların İEDDA reaksiyonunu eliminasyon amacıyla kullanmışlardır. Burada TCO ile tetrazin arasındaki ilk siklokatılma ardından istenilen molekülün eliminasyonuna yol açan bir dizi asimetrik tetrazinlerin tasarlanmasına ve ayrıca test edilmesine öncülük etmişlerdir.

Meghani vd. (2017), bir çalışmalarında; reaksiyonun farmokokinetiği optimize edildiğinde hem hücresel hem de bütün hayvan düzeylerinde TCO-tetrazin siklokatılmasının etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

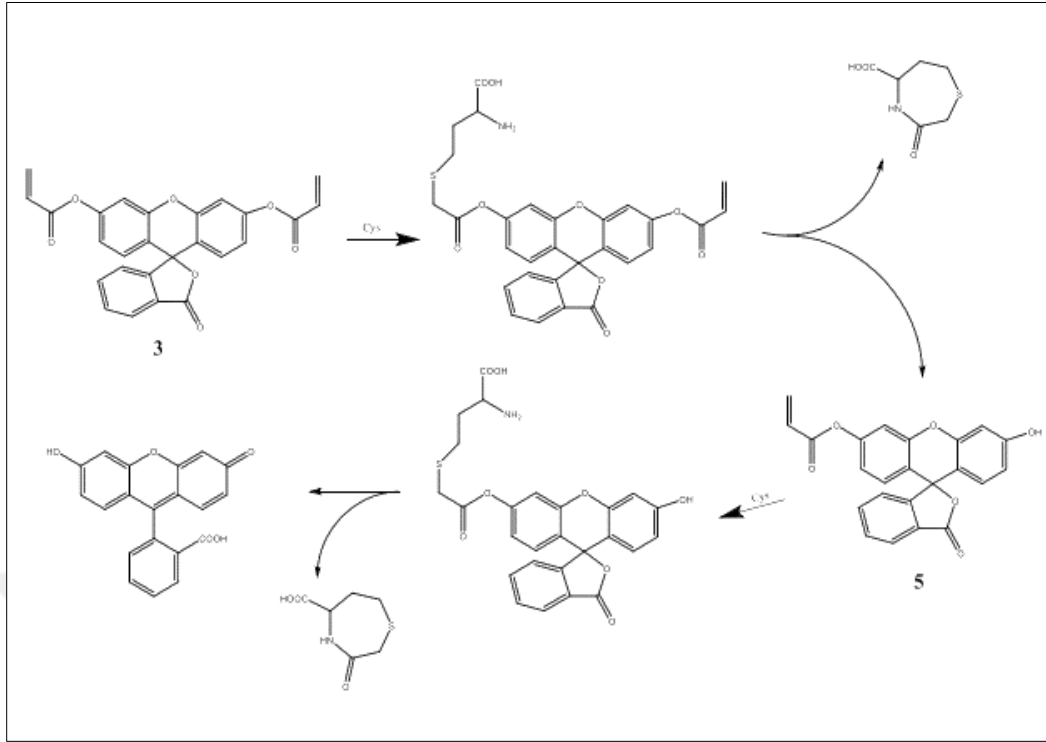
Wang vd. (2012), flöresin bazlı Şekil 13’de verilen bisakrilat bileşiği ve Şekil 13’de verilen monoakrilat bileşiği problemlerini tasarlamışlardır. Bisakrilat probu, monoakrilat probundan ayıran temel özellik; Hcy ve GSH üzerine yüksek Cys seçiciliği göstermiş olmasıdır. Tiyol, monoakrilat probunun akriloyl grubuna dahil olduktan sonra bir ester bağı bölünmesi gerçekleşmekte ve flöresein açığa çıkmaktadır. Bahsi geçen flörosein, UV-Vis spektrum ve floresans artışından sorumludur. Bisakrilat prob Cys için yüksek bir floresans artışı verirken, Hcy ve GSH için Cys kadar iyi floresans artışı göstermemiştir. Bununla birlikte tek akrilat grubu taşıyan monoakrilat, her üç tiyol için de aynı floresans artışını göstermiştir. Araştırma sonunda ulaşılan sonuçlar bisakrilat prob ve Cys reaksiyonu için stokiyometri 1:2 iken monoakrilat prob ve Cys reaksiyonu için stokiyometri 1:1 göstermiştir. Reaksiyon mekanizmasına Şekil 13’de yer verilmiştir. Bisakrilat probun monoakrilat proba göre Cys’ye karşı Hcy ve GSH üzerine yüksek seçiciliği, bisakrilat prob ile Cys arasındaki reaksiyondaki çift ekleme-bölünme işlemi ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 1.13. Bisakrilat prob (Wang vd., 2012)



Şekil 1.14. Monoakrilat prob (Wang vd., 2012)



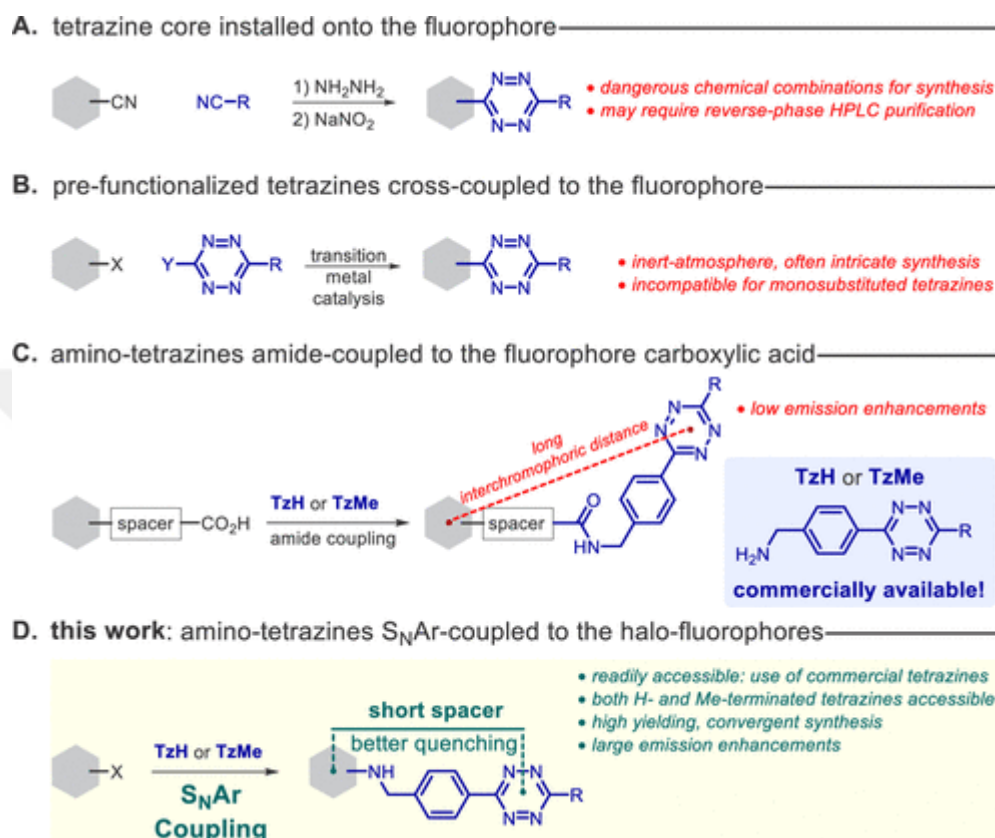
Şekil 1.15. Bisakrilat ve monoakrilat problemlerinin tiyol ile reaksiyonu (Wang vd., 2012)

1.6. Bu Tez Çalışmasının Amacı

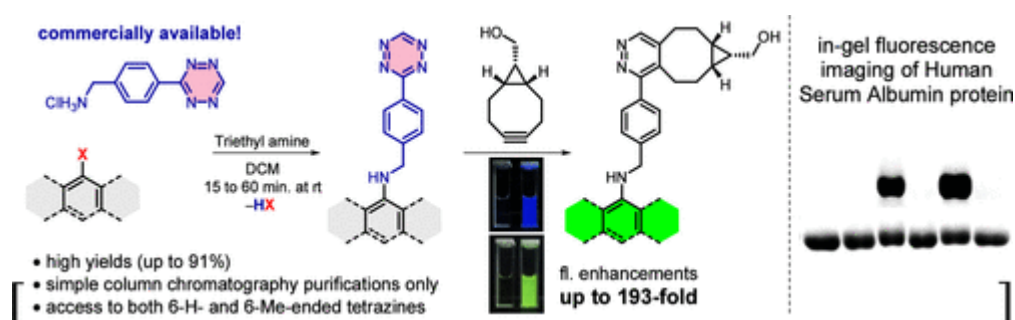
Tetrazin bazlı florojenik boyaların literatürdeki sentez yöntemleri genellikle karmaşık, tehlikeli ve zaman alıcıdır. Bunun yanı sıra, saflaştırma aşamasında yaşanan zorluklar, polimer, biyokimya, biyoloji ve malzeme bilimi gibi organik kimya altyapısı veya kimyasal olanakları sınırlı laboratuvarların bu bileşiklere erişimini büyük ölçüde kısıtlamaktadır. Şekil 16’da görülen amino-TzH ve amino-TzMe gibi tetrazin yapıları ticari olarak temin edilebilmekte ve bu motiflerden genellikle amit bağları yoluyla floro-for-tetrazin boyaları üretilmektedir. Ancak bu boyalar, genellikle en çok 20 kata kadar emisyon artışı sağlarken, kırmızı ışık yayan boyalarla birleşimlerinde emisyon artışı genellikle en fazla 2 kat ile sınırlı kalmaktadır (Oliveira vd., 2017).

Alternatif olarak, tetrazin çekirdeğinin geç safha oluşturulmasını içeren yöntemlerde ürün verimi oldukça düşük olmakta ve saflaştırma aşamaları, gelişmiş cihazlar veya karmaşık yöntemler gerektirmektedir. Ayrıca, floro-forlara geçiş metali katalizi kullanılarak tetrazin bağlanması durumunda genellikle olumlu sonuçlar elde edilse de bu süreçler uzun ve

karmaşık olabilmektedir. Ayrıca, uygun bağlanma partnerlerinin sınırlı olması nedeniyle tetrazin halkası florofora uzaktan bağlanmakta ve bu durum enerji sönmüleme etkinliğini düşürmektedir (Şekil 16).



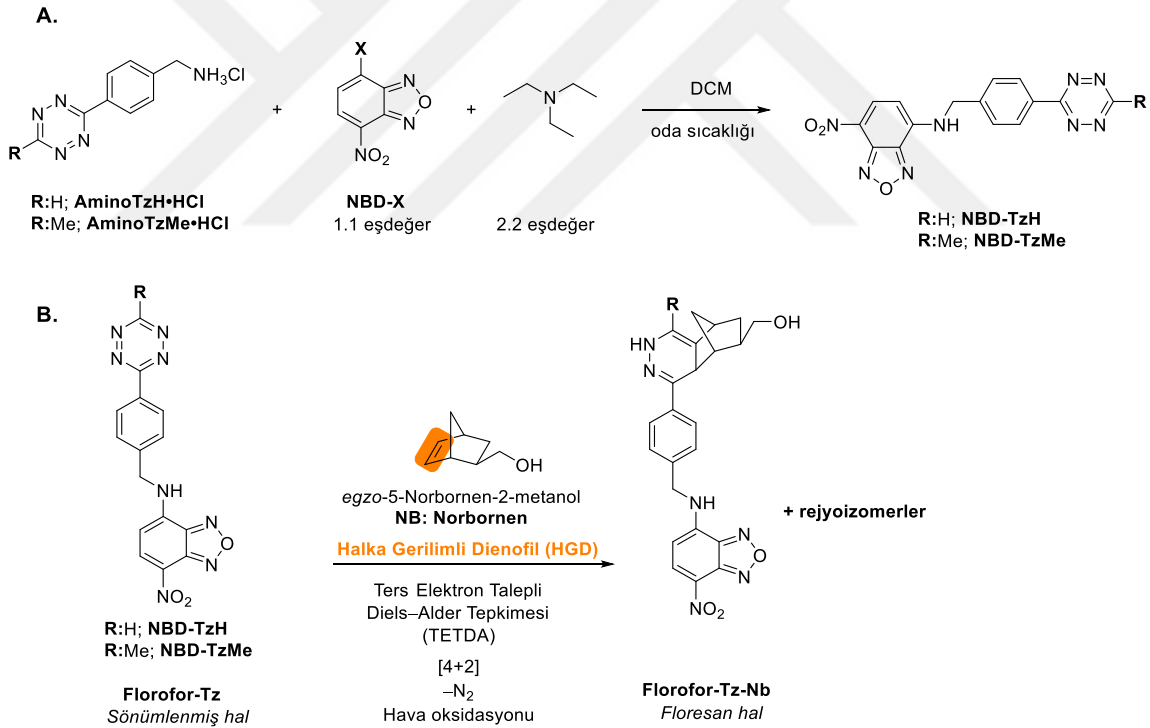
Şekil 1.16. Işık araştırma grubu (Işık ve Kısaçam, 2024) tarafından geliştirilen tetrazin-florofor sistemleri (literatür ile kıyaslı).



Şekil 1.17. Işık araştırma grubu (Işık ve Kısaçam, 2024) tarafından geliştirilen kolay erişimli tetrazin-florofor boyaları

Araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada (Işık ve Kısaçam, 2024; Şekil 17), ticari amino-tetrazinler ile halo-boyalar arasında gerçekleştirilen S_NAr (Süstitüsyon, Nükleofilik, Aromatik) reaksiyonlarıyla, güçlü şekilde sönmüş ($\Phi I < 0,01$) ve yüksek saflıkta BODIPY/NBD-tetrazin türevleri elde edilmiştir. Basit silika jel kromatografisi ile saflaştırılabilen bu boyalar, büyük Stokes kaymaları ve BCN ile ligasyon sonrası 193 kata kadar emisyon artışı gibi üstün optik özellikler göstermiştir. Ayrıca, BCN ile önceden modifiye edilmiş HSA proteini üzerinde parlak mavi-yeşil floresans emisyonu sergileyerek biyomolekül etiketleme için uygun bulunmuştur.

Bu bahisle, bu tez çalışması kapsamında daha önce Işık ve Kısaçam (2024) tarafından geliştirilen S_NAr yöntemi takip edilerek Nitrobenzofurazan floroforu ile kenetlenmiş tetrazin iskeletlerinin sentezlenmesi ve bunların *egzo*-5-Norbornen-2-metanol (kısaca **Nb**) bileşiği ile TETDA tepkimelerinin incelenmesi amaçlanmaktadır (Şekil 18).



Şekil 1.18. Hedeflenen NBD-Tz bileşiklerinin sentez stratejisi: A. NBD-F ve NBD-Cl ile ticari tetrazinlerin kenetlenme tepkimeleri ve B. NBD-Tz bileşikleri ile Nb gerilimli dienofili arasında gerçekleştirilmesi planlanan TETDA tepkimeleri

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal ve Enstrümental Analiz

Bu çalışmada kullanılacak tüm fine kimyasallar ve çözücüler ticari olarak temin edilmiş ve aksi belirtilmedikçe daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır. 1D NMR spektrumları, çözücü olarak CDCl_3 veya d_6 -DMSO kullanılarak bir 400 veya 600 MHz Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometre üzerinde kaydedilmiştir. HRMS verileri, bir Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS üzerinde elde edilmiştir. UV-Vis Absorpsiyon spektrumları, bir Shimadzu UV-3101PC UV-VIS-NIR spektrofotometre üzerinde veya muadili bir cihazda alınmıştır. Floresans emisyon ölçümleri bir Perkin-Elmer (Model LS 55) spektrofluorometre üzerinde kaydedilmiştir. Bileşiklerin FT-IR spektrumları, bir Perkin Elmer 100 model FTIR spektrometresinde (ATR) elde edilmiştir. Flaş kolon kromatografisi (FCC) saflaştırmaları için flaş sınıfı silika jel (SilicaFlash Irregular Silica Gels, F60, 40–63 μm , 60 Å) kullanılmıştır. Sentetik reaksiyonlar, önceden kaplanmış silika jel plakaları (Merck Silica Gel PF-254) kullanılarak, el tipi bir UV-Vis lambasıyla görselleştirilen ince tabaka kromatografisiyle (TLC) izlenmiştir. Tüm organik çözücüler, susuz Na_2SO_4 veya MgSO_4 üzerinde kurutulmuş ve FCC'ye tabi tutulmadan önce döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) kullanılarak konsantre edilmiştir. Tüm absorpsiyon ve emisyon spektrum kayıtları için 1,0 cm yol uzunluğuna sahip kuvars hücreler kullanılmıştır.

2.2. Organik Sentez Prosedürleri

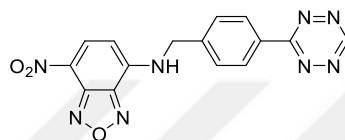
Aşağıda verilen sentez çalışmaları ilgili literatür (Işık ve Kısaçam, 2024) takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. NBD-Tz Bileşiklerinin Sentezi için Genel Yöntem

25g ambalajlı vialde bulunan tiraci $\text{AminoTzH}\cdot\text{HCl}$ veya $\text{AminoTzMe}\cdot\text{HCl}$ bileşiğinin üzerine teflon kaplı manyetik balık, 1,1 eşdeğer NBD-F bileşiği eklendikten sonra üzerine

2 mL DCM ilave edilir. Bu karışım 30 saniye boyunca hızlıca karıştırıldıktan sonra üzerine 2,2 eşdeğer trietil amin ilave edilir. Tepkime oda sıcaklığında 15 dk. karıştırıldıktan sonra direkt flaş silika jel kolonuna yüklenerek saflaştırılır. Not: Eğer hemen kolona yüklenmezse, ürünün cama yapışarak çökmelerin başladığı görülmüştür. Ve daha sonra bu ürünün tekrar çözülmesi çok fazla DCM çözücüsü gerektirerek kolon ayırım verimini olumsuz etkilemektedir.

2.2.1.1. NBD-TzH Bileşiğinin Yapısal Karakterizasyonu

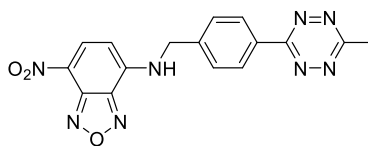


^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 10.46 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 8.35 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.76 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 165.67, 158.46, 145.23, 144.92, 144.46, 142.45, 138.07, 131.38, 128.54, 128.44, 122.06, 100.20, 46.42.

HRMS (ESI) $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_8\text{O}_3\text{Na}$ için hesaplanan, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 373.07735, bulunan 373.07678.

2.2.1.2. NBD-TzMe Bileşiğinin Yapısal Karakterizasyonu



^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 10.04 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.88 (s, 2H), 2.99 (s, 3H).

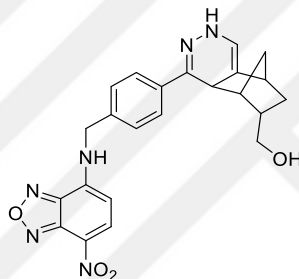
^{13}C NMR (101 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 167.45, 163.43, 145.26, 144.91, 144.49, 141.96, 138.08, 131.39, 128.51, 128.07, 122.00, 100.23, 46.43, 21.15.

HRMS (APCI) $C_{16}H_{11}N_8O_3$ için hesaplanan, $[M - H]^-$ 363.09541, bulunan 363.09476.

2.2.2. NBD-Tz(H/Me) Bileşikleri ile Nb Bileşiğinin TETDA Tepkimeleri için Genel Prosedür

1 eşdeğer NBD-Tz(H/Me) boyasının diklormetan çözeltisine (≈ 30 mM, DCM) 1,5 eşdeğer dienofil eklenerek karışmaya bırakılır. Tepkime TLC kontrolü ile takip edilerek deney dönüşüm tamamlandığında (2 saat) sonlandırılır. Çözücü vakum altında uçurulduktan sonra HRMS ile karakterize edilir.

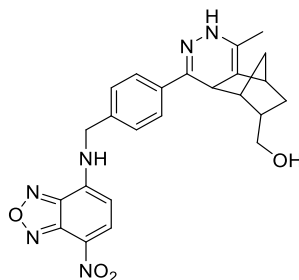
2.2.2.1. NBD-TzH-Nb Bileşiğinin Yapısal Karakterizasyonu



HRMS spektrumu incelendiğinde bileşiğin ağırlıklı olarak dihidropiridazin halinde bulunduğunu anlaşılmıştır.

HRMS (APCI) $C_{23}H_{21}N_6O_4$ için hesaplanan, $[M - H]^-$ 445.16242, bulunan 445.16273.

2.2.2.2. NBD-TzMe-Nb Bileşiğinin Yapısal Karakterizasyonu



HRMS spektrumu incelendiğinde bileşğin ağırlıklı olarak dihidropiridazin halinde bulunduğu anlaşılmıştır.

HRMS (APCI) $C_{24}H_{23}N_6O_4$ için hesaplanan, $[M - H]^-$ 459.17807, bulunan 459.17987.



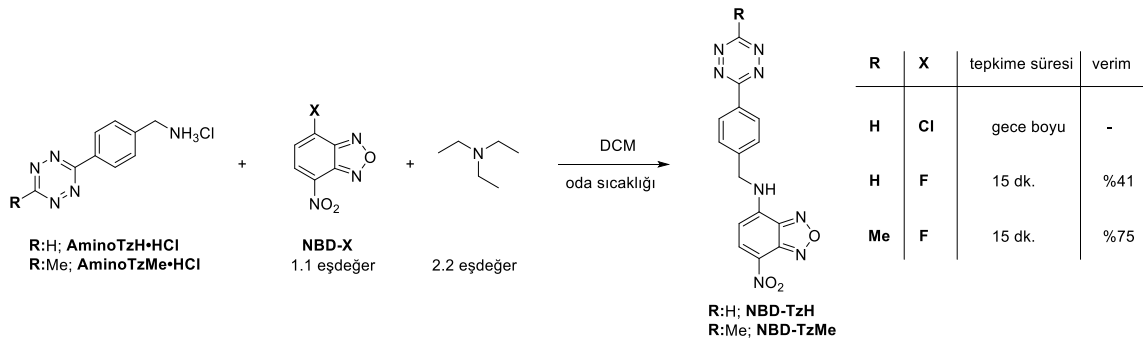
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

AminoTzH•HCl ve aminoTzMe•HCl bileşikleri ilgili literatürde semi-preparatif ters-faz HPLC yöntemi ile saflaştırılmıştır (Devaraj vd, 2008). Bu ekipmanlara sahip olmadığımız için bu bileşikler ticari olarak temin edilmiştir.

3.1. NBD–Tz Bileşiklerinin Sentezi

Bu tez çalışması kapsamında, S_NAr tepkimelerinde nükleofil olarak kullanılacak **aminoTzH•HCl** ve **aminoTzMe•HCl** bileşikleri ile tepkimenin elektrofili olarak kullanılan **NBD-Cl** ve **NBD-F** profloroforları ticari olarak temin edilmiştir. Daha önce Işık ve Kısaçam (2024) tarafından raporlanan tepkime koşulları test edilmiştir. Denemeler sonucunda, **aminoTzH•HCl** bileşiğinin, **NBD-Cl** ile bazık ortamda (diklormetan içinde, 2,2 eşdeğer trietilamin varlığında) gece boyunca karıştırılmasına rağmen tepkime vermediği tespit edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile takip edilen deneyde herhangi bir dönüşüm gözlemlenmemiştir. Bu durum öngörülerek, alternatif olarak daha reaktif bir elektrophil olan **NBD-F** bileşiği kullanılmıştır. **NBD-F** ile yapılan tepkimede, yüksek verimlerle (15 dakika içinde) **NBD-tetrazin** bileşiklerinin başarıyla sentezlendiği görülmüştür.

Şekil 19’da verilen sentez şemasına göre, **NBD-TzH** bileşiği %41 verimle elde edilirken, metil türevi olan **NBD-TzMe** bileşiği %75 verimle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. AminoTzH•HCl ve AminoTzMe•HCl bileşiklerinin NBD-Cl ve/veya NBD-F bileşikleriyle bazik ortamda SNAr tipi kenetlenme reaksiyonları

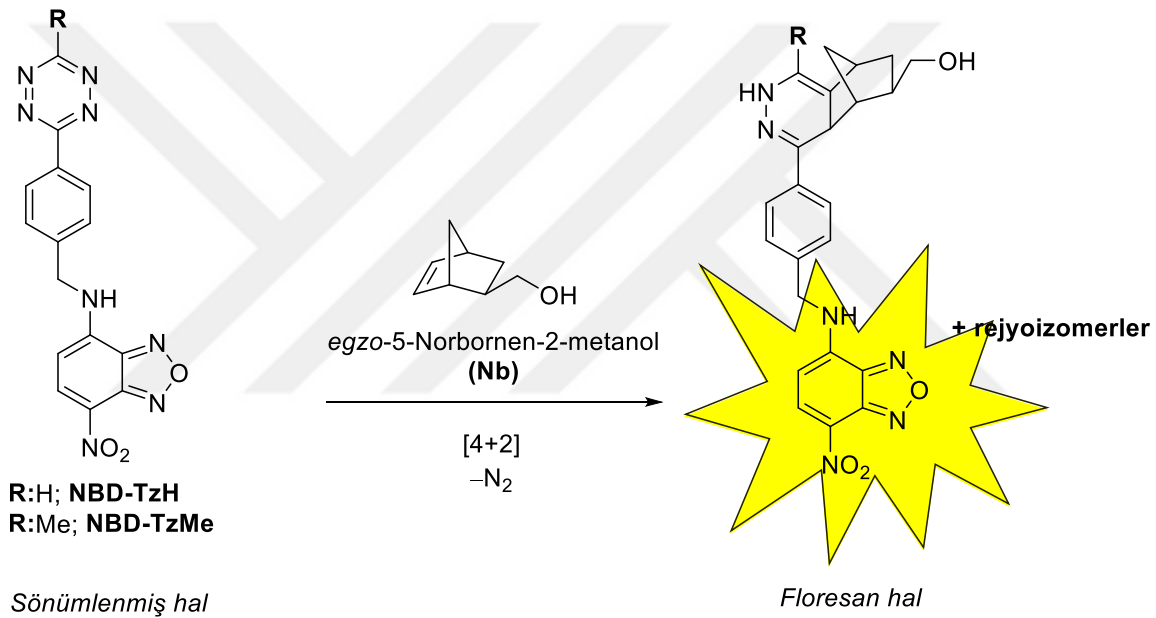
Literatürle uyumlu bir şekilde, metil süstitüe aminotetrazinler ile **NBD-TzMe** boyalarının daha yüksek verimle sentezlenebileceği görülmüştür. H-sonlu **NBD-TzH** bileşiklerinin daha düşük verimle elde edilmesi, H-sonlu amino tetrazinlerin bazik ortamda kararsızlık göstermesiyle ilişkilendirilmiştir (Işık ve Kısaçam, 2024). Elde edilen **NBD-Tz** konjugatları, proton ve karbon NMR spektroskopisi ile HRMS analizleri yardımıyla eksiksiz bir şekilde karakterize edilmiştir.

Tepkime süresinin uzatılması, verimlerde herhangi bir iyileşme sağlamamıştır. Aksine, tepkimenin 15 dakikadan uzun süre karıştırılması durumunda, oluşan ürünün vialin cam yüzeyine yapıştığı veya asıltı şeklinde çöktüğü gözlenmiştir. Çöken ürünü yeniden çözebilmek için aşırı miktarda çözücü (DCM) kullanımı gerekmiş ve bu durum, kromatografik saflaştırmayı önemli ölçüde zorlaştırmıştır.

3.2. NBD-Tz Bileşiklerinin Nb Dienofili ile TETDA Tepkimeleri

Literatürü ile uyumlu olarak, bu deneylerin TLC'de analiz edildiğinde siklokatalma bileşiklerinin birbirine çok yakın R_f değerlerine sahip en az iki rejyoizomer ihtiva ettikleri görüldü (Nb ile gerçekleşen tepkimede Nb tepkeninin *exo*-konumlu hidroksimetilen fonksiyonel grubu nedeniyle 4 farklı izomer beklenir. Bunlara bu bileşiklerin hava oksidasyonu ile yükseltgenmiş formları da dahil edildiğinde bu bileşiklerin kromatografik olarak saflaştırılması anlamlı değildir.). Bu izomerlerin ayrılmasının pratik olmadığı literatürce de (Devaraj vd., 2010) kabul gördüğünden malzemelerin yapısal karakterizasyonları yalnızca HRMS analizi ile gerçekleştirilmektedir. İzomerlerin

floresans cevaplarının benzer olduğu görüldü (TLC). Bu doğrultuda, elde ettiğimiz iki adet **Nb** siklokatılma ürününü HRMS analizi ile karakterize ettik. Diklormetan içerisinde **Nb** ile gerçekleştirilen siklokatılma tepkimelerinde, H-sonlu **NBD-TzH** ile reaksiyon 30 dakika içinde tamamlanırken, Me-sonlu **NBD-TzMe** ile gerçekleştirilen tepkimeler 2 saatlik karıştırma süresi gerektirmiştir. NBD-Tz bileşiklerinin turuncu renkli diklormetan çözeltilerinin her ikisi de floresans emisyonu göstermiyordu. Bu çözeltilere **Nb** eklenmesiyle, H-sonlu **NBD-TzH** içeren deneyde birkaç saniye içinde sarı-turuncu renkli floresans ışıması gözlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 3.2. NBD-Tz bileşiklerinin Nb dienofili ile TETDA siklokatılma tepkimeleri

Buna karşın, Me-sonlu tetrazin boyasının floresans ışıma göstermesi için daha fazla zamana ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu durumun, metil grubunun oluşturduğu sterik engelden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bileşiklerin HRMS spektrumları incelendiğinde, norbornen halkası içeren katılma ürünlerinin majör olarak dihidropiridazin formunda bulundukları belirlenmiştir (Şekil 27 ve 28, bkz. Ek).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmaları kapsamında, ticari olarak temin edilen aminotetrazinler (**AminoTzH•HCl** ve **AminoTzMe•HCl**) ile **NBD-F** amin-reaktif profloroforu, trietilamin varlığında S_NAr tepkimesine tabii tutulmuş ve iki adet **NBD-Tz** bileşiği başarıyla sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin moleküler yapıları, NMR spektroskopisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) ile detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır.

Sentezlenen **NBD-Tz** bileşiklerinin DCM çözeltilerinde literatürle uyumlu olarak floresans ışımaya göstermediği tespit edilmiştir. Ancak, çözeltilere halka gerilimli bir dienofil olan ve kolayca temin edilebilen **egzo-norbornen-2-metanol (Nb)** ilave edildiğinde, sarı-turuncu renkli floresans ışımaya özelliği kazandıkları gözlenmiştir. HRMS analizi, bu TETDA tepkimesi sonucu oluşan siklokatılma ürününün **dihidropiridazin** yapısında olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada kullanılan S_NAr tepkenlerinin ve **Nb** dienofilinin ticari olarak kolay ve uygun maliyetle erişilebilir olması, S_NAr tepkimesi ile **NBD-Tz** bileşiklerinin sentezini önemli ölçüde basitleştirmektedir. Ayrıca, **TETDA** tepkimesinin hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi, geçmişte yalnızca karmaşık sentez süreçleri nedeniyle sınırlı bir araştırmacı grubuna erişilebilir olan bu tür biyoortogonal tepkimelerin daha geniş bir araştırmacı kitlesi tarafından kullanılmasına olanak tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

Bachmann, W. E. and Deno, N. C. (1949). The Diels--Alder Reaction of 1-Vinylnaphthalene with α , β - and α , β , γ , δ -Unsaturated Acids and Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 71(9), 3062-3072.

Carboni, R. A. and Lindsey Jr, R. V. (1959). Reactions of tetrazines with unsaturated compounds. A new synthesis of pyridazines. *Journal of the American Chemical Society*, 81(16), 4342-4346.

De Araújo, A. D., Palomo, J. M., Cramer, J., Köhn, M., Schröder, H., Wacker, R..., . and Waldmann, H. (2006). Diels–Alder ligation and surface immobilization of proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(2), 296-301.

Devaraj, N. K. And Weissleder, R. (2011). Biomedical applications of tetrazine cycloadditions. *Accounts of chemical research*, 44(9), 816-827.

Dewar, M. J., Olivella, S. and Stewart, J. J. (1986). Mechanism of the Diels-Alder reaction: Reactions of butadiene with ethylene and cyanoethylenes. *Journal of the American Chemical Society*, 108(19), 5771-5779.

El-Sagheer, A. H. and Brown, T. (2010). Click chemistry with DNA. *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1388-1405.

Fan, X., Ge, Y., Lin, F., Yang, Y., Zhang, G., Ngai, W. S. C. ... and Chen, P. R. (2016). Optimized tetrazine derivatives for rapid bioorthogonal decaging in living cells. *Angewandte Chemie*, 128(45), 14252-14256.

Gandhi, P. S., Gaikwad, P. L., Jagdale, D. M. and Kadam, V. J. (2012). Growing advances and applications of click reactions. *American Journal of PharmTech Research*, 2, 83-103.

Gedikli, H. (2023). Floresans-Aktif Polimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Kimyasal Sensör Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi.

Grammel, M. and Hang, H. C. (2013). Chemical reporters for biological discovery. *Nature Chemical Biology*, 9(8), 475-484.

Gregoritza, M. and Brandl, F. P. (2015). The Diels–Alder reaction: a powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 438-453.

Houk, K. N., Lin, Y. T. and Brown, F. K. (1986). Evidence for the concerted mechanism of the Diels-Alder reaction of butadiene with ethylene. *Journal of the American Chemical Society*, 108(3), 554-556.

Işık, M. and Kısaçam M. A. (2023). Readily Accessible and Brightly Fluorogenic BODIPY/NBD-Tetrazines via S_NAr Reactions. *The Journal of Organic Chemistry*, 89(1), 6513-6519

Kang, K., Park, J. and Kim, E. (2017). Tetrazine ligation for chemical proteomics. *Proteome Science*, 15, 15.
<https://proteomesci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12953-017-0121-5>

Kang, K., Park, J. and Kim, E. (2016). Tetrazine ligation for chemical proteomics. *Proteome Science*, 15, 1-13.

Knall, A. C. and Slugovc, C. (2013). Inverse electron demand Diels-Alder (IEDDA)-initiated conjugation: a (high) potential click chemistry scheme. *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5131-5142.

Koehler, K. C., Durackova, A., Kloxin, C. J. and Bowman, C. N. (2012). Kinetic and thermodynamic measurements for the facile property prediction of diels-alder- conjugated material behavior. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 58(11), 3545-3552.

Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004-2021.

Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Center for fluorescence spectroscopy university of maryland school of medicine baltimore, MD 21201 USA. ISBN-13: 978-0387-31278-1

Lang, K. and Chin, J. W. (2014). Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. *Chemical Reviews*, 114(9), 4764-4806.

Meghani, N. M., Amin, H. H. and Lee, B. J. (2017). Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discovery Today*, 22(11), 1604-1619.

Meijer, A., Otto, S. and Engberts, J. B. (1998). Effects of the hydrophobicity of the reactants on Diels-Alder reactions in water. *The Journal of Organic Chemistry*, 63(24), 8989-8994.

Meyvacı, E. (2016). Poli(ϵ -kaprolakton-b-etilen glikol-b- ϵ -kaprolakton) blok kopolimerlerinin "click" kimyası yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Nicolaou, K. C., Snyder, S. A., Montagnon, T. and Vassilikogiannakis, G. (2002). The Diels–Alder reaction in total synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(10), 1668-1698.

Nikić, I., Plass, T., Schraidt, O., Szymański, J., Briggs, J. A., Schultz, C. and Lemke, E. A. (2014). Minimal tags for rapid dual- color live- cell labeling and super- resolution microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(8), 2245-2249.

Patterson, D. M., Nazarova, L. A. and Prescher, J. A. (2014). Finding the right (bioorthogonal) chemistry. *American Chemical Society Chemical Biology*, 9(3), 592-605.

Peterson, A. M. and Palmese, G. R. (2009). Reversible Diels–Alder cycloaddition for the design of multifunctional network polymers. *Click Chemistry For Biotechnology and Materials Science*, 195.

Png, Z. M., Zeng, H., Ye, Q.J. and Xu, J. (2017). Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions: Principles and Applications. *Chemistry, an Asian Journal*, 12(17), 2142-2159.

Qin, L. H., Hu, W. and Long, Y. Q. (2018). Bioorthogonal chemistry: Optimization and application updates during 2013–2017. *Tetrahedron Letters*, 59(23), 2214-2228.

Ramapanicker, R. and Chauhan, P. (2016). Click chemistry: Mechanistic and synthetic perspectives. *Click Reactions in Organic Synthesis*, 1-24.

Royzen, M., Yap, G. P. and Fox, J. M. (2008). A photochemical synthesis of functionalized trans-cyclooctenes driven by metal complexation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(12), 3760-3761.

Shieh, P. and Bertozzi, C. B. (2014). Design strategies for bioorthogonal smart probes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(46), 9307–9320.

Sletten, E. M. and Bertozzi, C. R. (2009). Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(38), 6974-6998.

Tasdelen, M. A., Kiskan, B. and Yagci, Y. (2016). Externally stimulated click reactions for macromolecular syntheses. *Progress in Polymer Science*, 52, 19-78.

Tunç, E. (2013). In vivo floresan görüntüleme ve in vivo uygulamalarda kullanılan florofor bileşikler. *Pamukkale Medical Journal*, 13(1), 235-247.

Wang, H., Zhou, G., Gai, H. and Chen, X. (2012). A fluorescein-based probe with high selectivity to cysteine over homocysteine and glutathione, *Chemical Communications*, 48, 8341-8343.

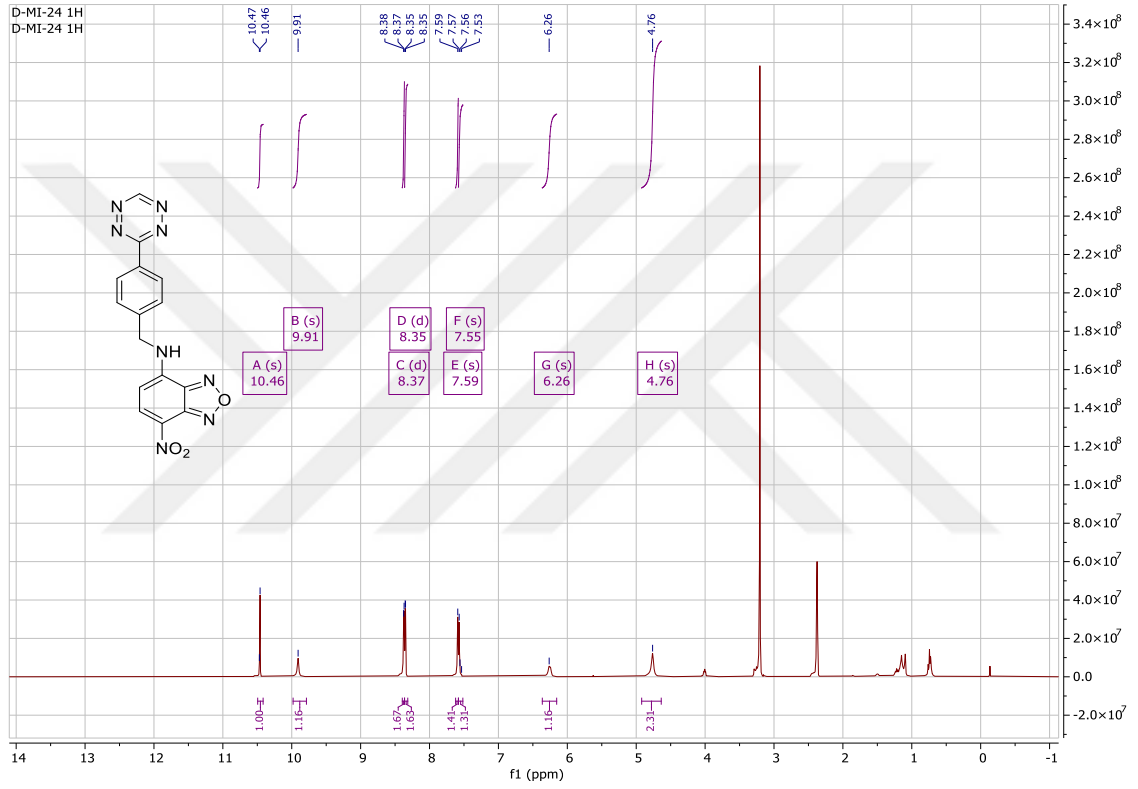
Woodward, R. B. and Katz, T. J. (1959). The mechanism of the Diels-Alder reaction. *Tetrahedron*, 5(1), 70-89.

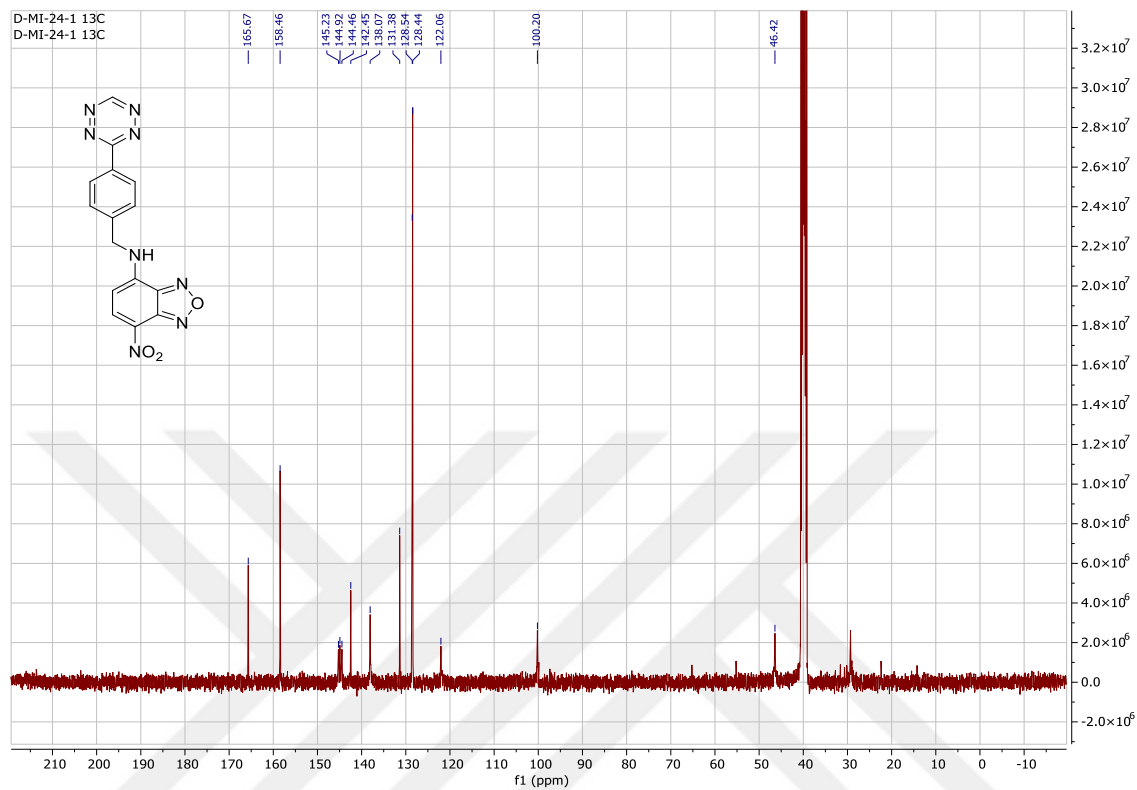
Yang, J., Karver, M. R., Li, W., Sahu, S. and Devaraj, N. K. (2012). Metal- catalyzed one-pot synthesis of tetrazines directly from aliphatic nitriles and hydrazine. *Angewandte Chemie*, 124(21), 5312-5315.

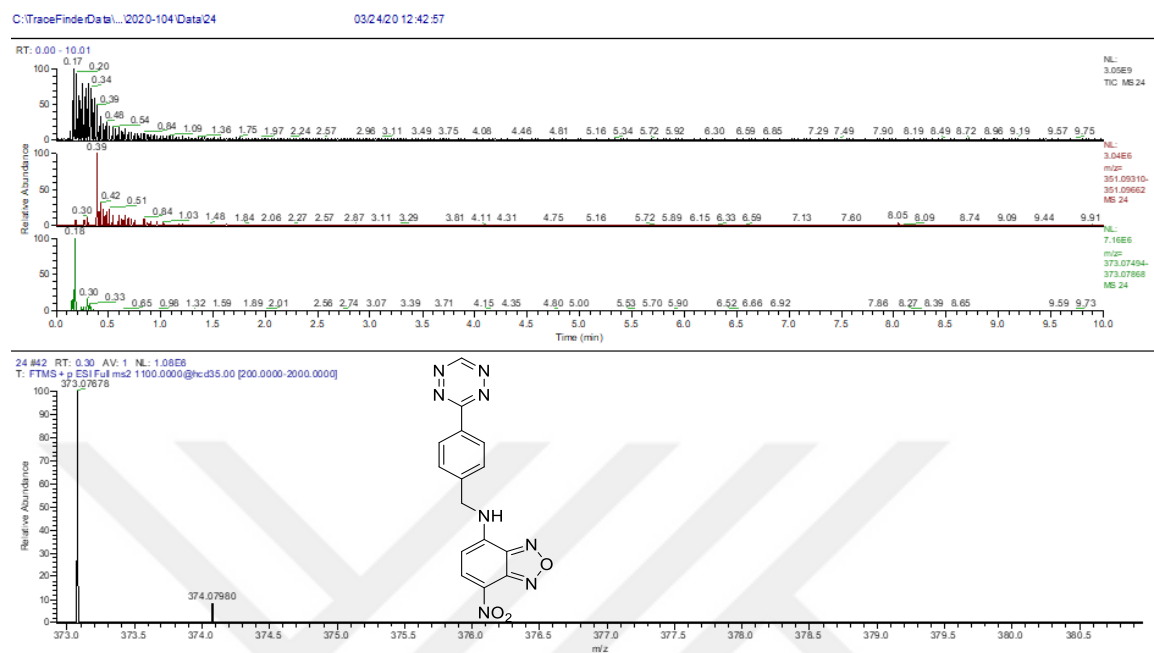
Zheng, M., Zheng, L., Zhang, P., Li, J. and Zhang, Y. (2015). Development of bioorthogonal reactions and their applications in bioconjugation. *Molecules*, 20(2), 3190-3205.

EKLER

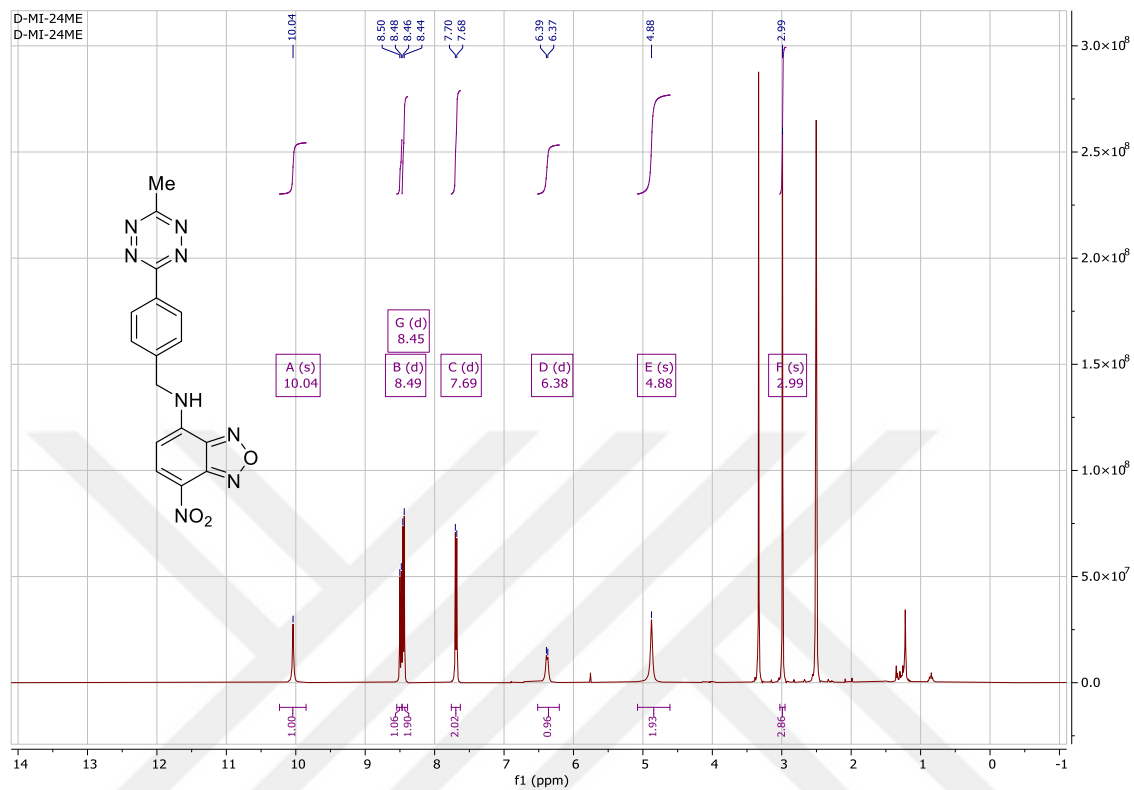
Ek 1: NMR ve HRMS Kopyaları

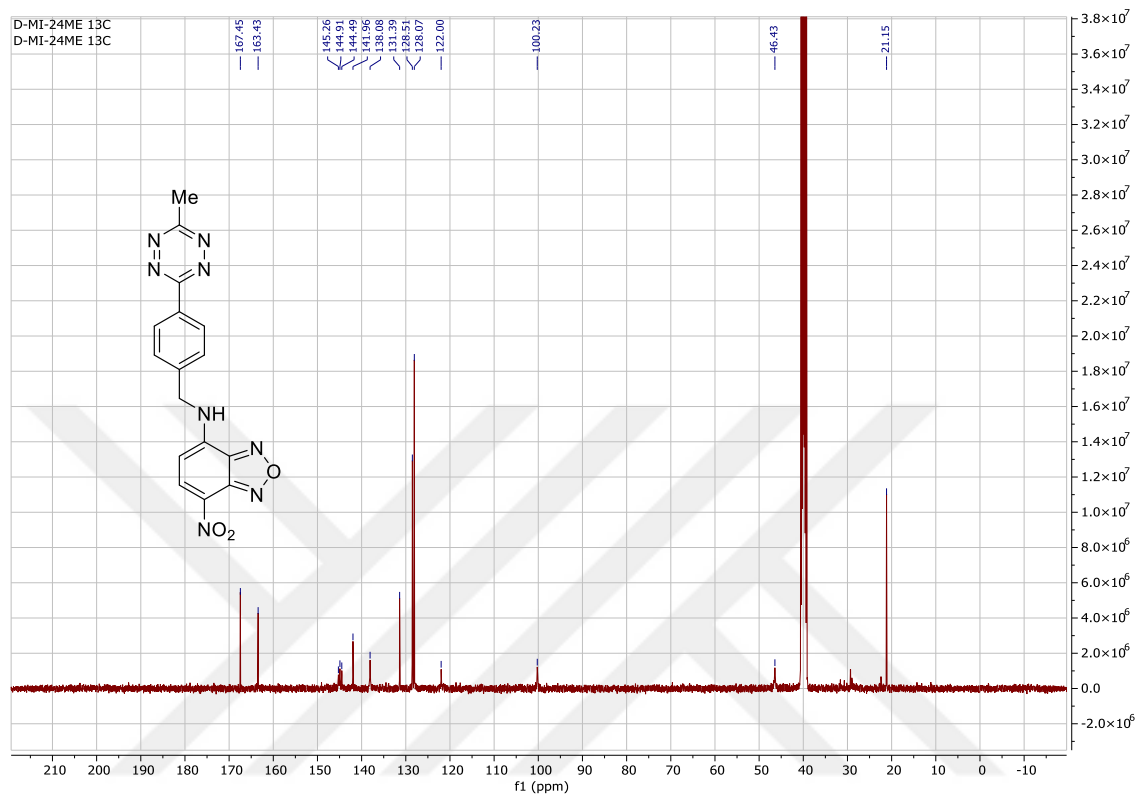


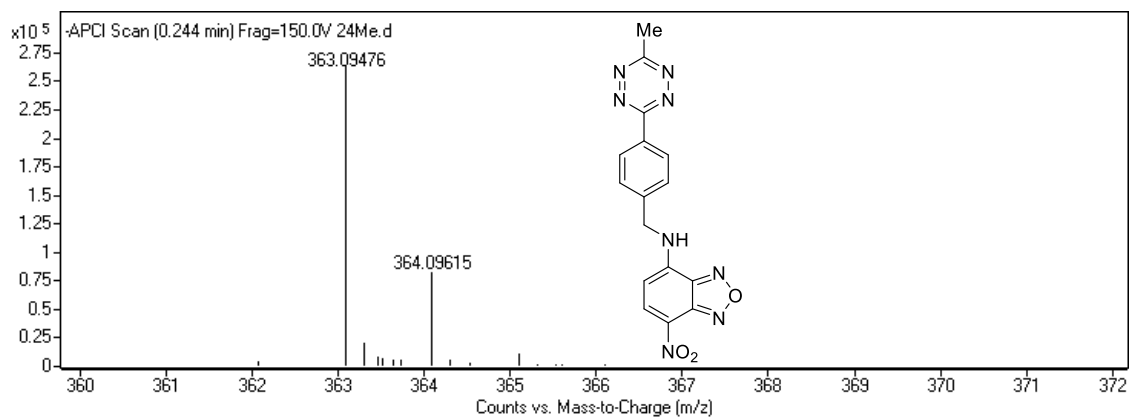
Ek 2: NBD-TzH bileşığının ^{13}C NMR spektrumu

Ek 3: NBD-TzH bileşiğinin HRMS spektrumu

Ek 4: NBD-TzMe bileşiginin ^1H NMR spektrumu



Ek 5: NBD-TzMe bileşğinin ^{13}C NMR spektrumu

Ek 6: NBD-TzMe bileşığının HRMS spektrumu

Ek 7: NBD-TzH-NB bileşiğinin HRMS spektrumu