

**BAKIR (II) İYONUNUN ETİKETSİZ G-  
QUADRUPLEKS TABANLI FLORESAN METOT İLE  
TESPİTİ**

**Yasemin ACAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Tahir BAYRAÇ**

**Temmuz-2019**



**T.C.  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKIR (II) İYONUNUN ETİKETSİZ G-QUADRUPEKS TABANLI  
FLORESAN METOT İLE TESPİTİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
YASEMİN ACAR**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Tahir BAYRAÇ**

**KARAMAN-2019**

## TEZ ONAYI

Yasemin ACAR tarafından hazırlanan ‘**Bakır (II) İyonunun Etiketsiz G-Quadrupleks Tabanlı Floresan Metot İle Tespiti**’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Tahir BAYRAÇ

İmza:

Jüri Üyeleri:

Dr. Öğr. Üyesi Şerife Ayaz GÜNER

İmza:

Doç. Dr. Mevlüt BAYRAKCI

Tez Savunma Tarihi: 11/07/2019

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Doç. Dr. Kamil ARI**

**Enstitü Müdürü**

## TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Yasemin ACAR



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAKIR (II) İYONUNUN ETİKETSİZ G-QUADRUPLEKS TABANLI FLORESAN METOT İLE TESPİTİ

Yasemin Acar

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Tahir BAYRAÇ

Temmuz 2019, 111 Sayfa

Bu tez çalışmasında bakır (II) iyonunun hızlı, seçici ve hassas tespiti için, guanin nükleotidi yönünden zengin bir DNA dizisi ile Thioflavin T'nin G-quadrupleks yapı oluşturmasını temel alan etiketsiz bir algılama sistemi geliştirilmiştir. Bakır (II) iyonuna seçicilik gösteren G-quadrupleks yapı oluşturabilme potansiyeli bulunan DNA dizisi dört GGG tekrarına sahiptir. Kendiliğinden floresan özellik göstermeyen Thioflavin T, bu DNA dizisi ile etkileşime girerek G-quadrupleks yapının oluşumunu indüklemekte ve floresan moleküler rotor yapısı nedeniyle yüksek floresan emisyon yoğunluğuna neden olmaktadır. Bakır (II) iyonlarının varlığında, G-quadrupleks yapı oluşturmuş DNA dizisi yüksek seçicilik gösterdiği hedefine bağlanmak için Thioflavin T ile oluşturmuş olduğu kompleksten ayrılmakta ve konformasyonel değişikliğe uğrayarak G-quadrupleks yapıdan tek zincirli haline geri dönüş yapmaktadır. Bu ayrılma ve konformasyonel değişiklikler ile birlikte floresan emisyon yoğunluğunda önemli bir düşüş oluşmaktadır. Bakır (II) iyonlarının ortamdaki konsantrasyonuna göre floresan emisyon yoğunluğunda meydana gelen bu değişim sayesinde bakır (II) iyonlarının etiketsiz, düşük maliyetli, hızlı, hassas ve seçici bir biçimde tespiti sağlanabilmektedir. Dünya üzerindeki birçok organizma için hayati öneme sahip olan, yüksek konsantrasyonlarda maruz kaldığında oldukça toksik ve hatta ölümcül etkilere sebep olabilen bakır (II) iyonunun canlılar ile temasının birincil kaynağı su ekosistemleridir. Tasarlanan algılama sistemi, geniş bir lineer aralıkta doğrudan su numunelerinde bakır (II) iyonlarını ölçmek için 30,7 nM tespit limitine, 102,5 nM tayin limitine sahip bir duyarlılığa ve seçiciliğe sahiptir. Karaman şehir şebeke sularından alınan su numuneleri ile yapılan deneyler ile tasarlanan metodun yüksek geri kazanım oranına sahip olduğu görülmüştür. Tasarlanan metot bakır (II) iyonuna, farklı iyonların varlığında bile yüksek oranda seçicilik göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** G-quadrupleks, Thioflavin T, Bakır (II) iyonu, Floresan

## **ABSTRACT**

**Ms Thesis**

### **A LABEL-FREE G-QUADRUPLEX BASED FLUORESCENT ASSAY FOR THE DETECTION OF COPPER (II) ION**

**Yasemin ACAR**

**Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Bioengineering**

**Supervisor: Assistant Professor Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ**

**July 2019, 111 pages**

In this thesis, a label free detection system based on the formation of G-quadruplex structure of Thioflavin T and a DNA sequence rich in guanine nucleotides was developed for rapid, selective and sensitive detection of copper (II) ion. The DNA sequence with four GGG repeats has the potential to form a G-quadruplex structure and shows high selectivity to the copper (II) ion. Normally non-fluorescent Thioflavin T induces the formation of the G-quadruplex structure by intercalating into DNA sequence and causes high fluorescence emission intensity due to the fluorescent molecular rotor structure. In the presence of copper (II) ions, the DNA sequence is dissembled from the complex formed with Thioflavin T to bind to its target of high selectivity and causes the G-quadruplex structure to separate by conformational modification. Conformational changes together with this separation lead to a significant decrease in the intensity of the fluorescence emission. Thanks to this change in the fluorescence emission; untagged, low cost, fast, sensitive and selective detection of copper (II) ions can be achieved. Water ecosystems are the primary source of the contact of living beings with copper (II) ions, which are very toxic and even lethal when exposed at high concentrations. The designed detection system has a sensitivity and selectivity with a detection limit of 30.7 nM and quantification limit of 102.5 nM for copper (II) ions directly in water samples in a wide linear range. With the experiments conducted from Karaman city municipal water, the designed method showed a high recovery rate.

**Keywords:** G-quadruplex, Thioflavine T, Copper (II) ion, Fluorescence

## ÖNSÖZ

Danışmanım olmayı büyük bir nezaketle kabul eden ve yüksek lisansımın her döneminde benden engin bilgilerini esirgemeyerek ufkumu açan, ilminden ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Abdullah Tahir BAYRAÇ'a saygılarımla teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım kapsamında bilgi ve tecrübelerini büyük bir tevazuuyla paylaşan saygıdeğer hocam Mevlüt BAYRAKCI'ya, azmi ve başarısı ile örnek aldığım ve hayatın hiçbir alanında kıymetli yardımlarını benden esirgemeyen sevgili hocam Mesut Ersin SÖNMEZ'e, yüksek lisans yolculuğumda en iyi yol arkadaşlarım olan Elif YAYLA'ya ve Sedat KESKİN'e, tüm bölüm hocalarım ve arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim. Yüksek lisans tezim kapsamında deneylerimi yapma imkânı tanıyan Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne, yüksek lisansım boyunca görev aldığım proje kapsamında burs sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Kızları olmaktan her zaman gurur duyduğum, hayattaki en büyük şanslarım annem Fatma ACAR'a, babam Kemalettin ACAR'a ve canım aileme verdikleri tüm destekler için sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yasemin ACAR

2019/ KARAMAN



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLO DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1 Bakır .....	5
2.1.1 Ağır Metaller .....	7
2.1.2 Bakır (II) İyonu Yapısı ve Genel Özellikleri.....	9
2.1.3 Bakır (II) İyonunun İnsan Sağlığı Açısından Önemi .....	11
2.1.4 Bakır (II) İyonunun Ekolojik Açıdan Önemi .....	14
2.2 G-quadrupleks .....	16
2.2.1 Guanin Tetratları .....	17
2.2.2 G-quadrupleks Yapısı .....	19
2.2.3 G-quadrupleks DNA Tabanlı Algılama Sistemleri .....	22
2.3 Floresan Boyalar .....	26
2.3.1 Floresan Moleküler Rotorlar .....	28
2.3.2 Floresan Moleküler Rotorların Biyolojik ve Kimyasal Uygulamaları .....	32
2.3.3 Thioflavin T.....	33
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>38</b>
3.1 Materyal .....	38
3.2 Metot .....	38
3.2.1 Floresan Ölçümleri .....	38
3.2.2 Tampon Çözelti, ThT ve G-quadrupleks DNA Stoklarının Hazırlanması .....	38

3.2.3 Uygulanabilirlik Çalışması .....	39
3.2.4 ThT Optimizasyonu .....	39
3.2.5 Bakır (II) iyonu ile Floresan Sönümlene Deneyi .....	39
3.2.6 Bakır (II) İyonu Seçicilik Deneyi .....	40
3.2.7 Bakır (II) İyonu ile Yarışmalı Seçicilik Deneyi .....	40
3.2.8 Üç Boyutlu Floresan Ölçümü .....	40
3.2.9 Geri Kazanım Deneyi .....	41
3.2.10 UV Spektral Tarama Deneyi .....	41
3.2.11 Floresan Sönümlene Görüntüleme Deneyi.....	41
3.2.12 Jel Görüntüleme Deneyi .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
4.1 Uygulanabilirlik Çalışması.....	43
4.2 ThT Optimizasyonu .....	44
4.3 Bakır(II) İyonu ile Floresan Sönümlene Deneyi.....	45
4.4 Floresan Sönümlene Üzerinde Çeşitli İyon Konsantrasyonlarının Etkileri ....	48
4.5 Bakır (II) Seçicilik Deneyi .....	55
4.6 Tespit Limiti ve Tayin Limitinin Hesaplanması .....	57
4.7 Bakır (II) İyonu ile Yarışmalı Seçicilik Deneyi.....	57
4.8 Üç Boyutlu Floresan Ölçümü.....	59
4.9 Geri Kazanım Deneyi.....	60
4.10 UV Spektral Tarama .....	61
4.11 Floresan Sönümlenenin Görüntülenmesi .....	62
4.12 Jel Görüntüleme Deneyi.....	63
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>65</b>
5.1 Tartışma.....	65
5.2 Sonuç .....	74
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>96</b>

## TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Karaman Şebeke Suyu Örneklerinin Referans Değerler ile Benzerlik Oranları .....	61
Tablo 4.2. Bakır (II) İyonunun Tespiti İçin Farklı Analitik Yöntemlerin Karşılaştırılması .....	69



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Bakır Metali İle Oluşturulan Özgürlük Anıtı .....	10
Şekil 2.2: Guanin Molekülü .....	18
Şekil 2.3: Guanin Tetratı .....	18
Şekil 2.4: G-quadrupleks Yapısı Modeli .....	19
Şekil 2.5: Farklı topolojilerdeki G-quadrupleks yapıları .....	20
Şekil 2.6: Floresan Moleküler Rotorların Şematik Örnekleri.....	29
Şekil 2.7: DMABN ile yapılan floresan emisyonu çalışmaları .....	30
Şekil 2.8: Thioflavin T molekülü modeli.....	34
Şekil 2.9: ThT TICT modeli .....	36
Şekil 4. 1: Tasarlanan Algılama Metodunun Uygulanabilirlik Ölçümü.....	43
Şekil 4. 2: Artırılan ThT Konsantrasyonları İle Floresan Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişim .....	44
Şekil 4. 3: Floresan Yoğunluğunun 0-100 µM Arasındaki Bakır (II) İyonlarıyla Değişimi.....	45
Şekil 4. 4: Farklı Bakır (II) İyonu Konsantrasyonlarında Floresan Yoğunluğunda Oluşan Değişim.....	46
Şekil 4. 5: Lityum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi .....	48
Şekil 4. 6: Manganez (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	49
Şekil 4. 7: Sezyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	49
Şekil 4. 8: Sodyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	50
Şekil 4. 9: Magnezyum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	50
Şekil 4. 10: Potasyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi .....	51
Şekil 4. 11: Amonyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	51
Şekil 4. 12: Çinko (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	52
Şekil 4. 13: Nikel (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	52
Şekil 4. 14: Demir (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi .....	53
Şekil 4. 15: Baryum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi.....	53
Şekil 4. 16: Kalsiyum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi .....	54
Şekil 4. 17: Bakır (II) ve Diğer Tüm İyonların Floresan Sönümlenme Üzerinde Etkisi. 54	54

Şekil 4. 18: Farklı Konsantrasyonlarda Bakır (II) ve Diğer Tüm İyonların 1-10-50-100 $\mu$ M Konsantrasyonlarında Seçiciliği .....	56
Şekil 4. 19: Bakır(II) iyonu İle Diğer Tüm İyonların Yarışmalı Seçiciliği .....	58
Şekil 4. 20: ThT-G-quadrupleks DNA-Bakır (II) İyonu Üç Boyutlu Floresan Spektrumları .....	59
Şekil 4. 21: ThT-G-quadrupleks DNA-Bakır (II) İyonu Kombinasyonlarının 200-800 nm Dalga Boylarında UV Spektral Taraması .....	62
Şekil 4. 22: Artan Bakır (II) Konsantrasyonları ile Floresan Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişimin Görüntülenmesi .....	63
Şekil 4. 23: G-quadrupleks DNA ile ThT ve Bakır (II) İyonlarının Kombinasyonlarının Jel Yürütme Deneyi Görüntüsü (10 dk).....	64

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

**g**

**mL**

**$\mu$ L**

**$\mu$ M**

**pM**

**nm**

**V**

**ThT**

**Cu (II)**

### Açıklamalar

Gram

Mililitre

Mikrolitre

Mikromolar

Pikomolar

Nanometre

Volt

Thioflavin T

Bakır (II)

### Kısaltmalar

**EPA**

**RDA**

**HPV**

**ATP**

**UV**

**GFP**

**EEM**

**3D**

### Açıklamalar

U.S. Environmental Protection Agency (ABD Çevre Koruma Ajansı)

Recommended Dietary Allowance (Önerilen Diyet Alımı)

Human Papilloma Virus (İnsan Papilloma Virüsü)

Adenosine Trifosfat (Adenozin Trifosfat)

Ultraviolet (Morötesi)

Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan Proteini)

Excitation Emission Matrix (Uyarma Emisyon Matriksi)

3 Dimensional (3 Boyutlu)

<b>DMABN</b>	p-N, N-dimetilamino-benzonitrilin
<b>DCVJ</b>	9-dicyanovinyl julolidine
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
<b>LOD</b>	Limit of Detection (Tespit Limiti)
<b>LOQ</b>	Limit of Quantification (Tayin Limiti)
<b>RFU</b>	Relative Fluorescence Unit (Rölatif Floresan Birimi)
<b>TICT</b>	Twisted Intramolecular Charge Transfer (Bükülmüş Molekül İçi Yük Transferi)
<b>ICP-MS</b>	Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Endüktif Olarak Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi)
<b>ICP-AES</b>	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (Endüktif Olarak Eşleşmiş Atomik Emisyon Spektrometresi)
<b>AAS</b>	Atomic Absorbtion Spectroscopy (Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi)
<b>CdSe</b>	Kadmiyum Selenid

## 1. GİRİŞ

Teknolojik gelişmelerin hayatımızı kolaylaştırmasının yanında sağlık ve çevreye verilen dolaylı ya da dolaysız zararları her geçen gün artmaktadır. Şehirleşmenin artışı, şehirlerde yaşayan insan popülasyonunun artışı ve teknolojiyle birlikte ilerleyen sanayileşme çevre sorunlarının artmasına sebep olan önemli faktörlerdendir. Ekolojik dengenin bozulması ve dolayısıyla oluşturduğu sağlık problemleri günümüzde küresel dünyanın ortak sorunu haline gelmiştir.

Su tüm organizmalar için hayati öneme sahip bileşenlerden biridir. Dünya üzerindeki canlıların istifade ettiği suların kirlenmesi çeşitli doğal faaliyetlerle olabileceği gibi evsel atık, pestisit kullanımları, sanayi üretim merkezlerinde üretilen çeşitli zararlı atıklarla da olabilmektedir. Suların kirlenmesi ciddi sağlık ve ekoloji sorunlarına yol açabilir. Bundan dolayı sudaki çeşitli materyallerin düzeylerinin tespiti çok önemlidir. Çünkü sucul ortamlar çevre kirliliğinin en yoğun olarak görüldüğü alanlardandır. Birçok canlıya ev sahipliği yapmalarının yanı sıra insan ve hayvan tüketiminde de kullanıldıklarından tüm organizmaları direkt olarak etkilemektedir (Anonim, 2004).

Çeşitli maden üretimi yapılan fabrikaların çevreye salınmasına sebep olduğu bazı zararlı maddeler su, toprak ve hava mikroflorasının değişmesine ve bu maddelerin birikmesine yol açmaktadır. Ağır metaller bu zararlı maddelerin başında gelen maddelerdendir ve özellikle fabrika yakınlarındaki çevrelerde canlılar için toksik olabilecek seviyelere çıkabilmektedir. Çevreye salınan ağır metaller su, asit yağmurları, toprak ya da hava yoluyla canlılara etki etmektedir. İnsan ve hayvanların sağlıklarını tehlikeye atan risklerden dolayı çeşitli vücut sıvılarının ya da ekolojik çevredeki numunelerin içerisinde ağır metallerin tespiti ve miktarlarının analizi çok önemlidir. Bu tespit ve analizler ışığında durum hakkında bilgi sahibi olunarak çeşitli iyileştirme yolları aramak ya da kullanılacak bir madde hakkında bilgi sahibi olmak kolaylaşmaktadır (Souli ve ark., 2017; Trumbo ve ark., 2001).

Bakır; ABD Çevre Koruma Kurumu (EPA) tarafından hem bir besin ve hem de bir toksin olarak tanımlanan bir ağır metaldir (Anonim, 1997). Bakır solunum enzimi kompleksi sitokrom c oksidazının anahtar bir bileşenidir. İnsanlarda ve hayvanlarda eser miktarda bulunması hayati açıdan önemlidir. Fakat bu ağır metalin fazla olma durumu



çeşitli hayati öneme sahip yollarda yer alan protein yapılarını etkilediğinden zararlıdır. Özellikle bakır eşyaların çok kullanımı, evlerdeki bataryaların bakır olması ya da su, toprak ve havanın çeşitli atık maddeler tarafından kirlenmesiyle maruz kalınan bakır oranı artmakta ve organizmalarda birikebilmektedir. Canlı yaşamı için hayati tehlikeleri bulunan bu ağır metalin hızlı ve güvenilir tespiti özellikle insan sağlığı açısından büyük bir önem arz etmektedir.

Hassas, güvenilir ve hızlı ölçümler yapabilen sensör sistemleri tespit ve analiz yöntemlerinde özellikle son yıllarda araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Su, toprak, gübre gibi çevresel dokulardan ya da kan, plazma, idrar gibi vücut sıvılarından alınan örneklerdeki ağır metaller gibi çeşitli analitlerin ölçümü yüksek hassasiyetle yapılabilmekte ve sonuçlar yüksek doğrulukla alınabilmektedir (Kong ve ark., 2013; Sun ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2013).

G-quadrupleksler genom içerisinde guanin nükleotidi yönünden zengin bazı DNA ya da RNA dizilerinin guanin tetratları oluşturmasının ardından konformasyonel değişim göstererek üç boyutlu yapıya kavuşan ikincil genetik materyal yapılarındandır (Phan ve Patel, 2003). G-quadrupleks yapıların *in vitro* ortamda oluşmasının indüklenerek algılama sistemlerinde kullanılabilmesinin keşfi bu ikincil yapılar ile yürütülen çalışmaların bambaşka bir boyut almasını sağlamıştır. G-quadrupleks oluşturmaya elverişli bir G-quadrupleks dizi yardımıyla çeşitli analitlerin var-yok analizi ve miktar tespitinin yapılabildiği birçok algılama sistemi mevcuttur. Genellikle spektroskopik yöntemlerin kullanıldığı bu algılama sistemlerinde G-quadrupleks oluşumunu indüklemek amacıyla kendiliğinden floresan özelliği bulunmayan ancak G-quadrupleks dizi gibi çeşitli yapılarla bir araya geldiğinde bu özelliği kazanabilen floresan boyalar kullanılmakta ya da nükleotit dizisi floresan bir boya ile etiketlenmektedir. Analit maddeye özgün olan bu diziler; daha fazla afinite gösterdikleri analit maddenin ortamda bulunması halinde G-quadrupleks yapıyı bozarak analite bağlanma eğilimi göstereceklerdir. Bu bağlanmaların ve bozulmaların floresan emisyon spektrumunda oluşturduğu farklar ile anlamlı sonuçlar elde edilerek bir numunede aranan analitin tespiti ve/veya hangi miktarlarda bulunduğu saptanabilmektedir (Bhasikuttan ve Mohanty, 2015; Mohanty ve ark., 2012).

Floresan boyların yardımıyla tasarlanan sensör sistemleri hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek maliyet, ekipman, uzman varlığı gerektiren ve uzun süren diğer analiz testleri ile kıyaslandığında büyük bir kolaylık sağlayan sistemlerdir. Bakır metalinin tespiti için de hızlı, etiketlemeye gerek duyulmayan hassas bir algılama sistemi geliştirilmek istenmiş ve hızlı, düşük maliyetli, hassas ve güvenilir G-quadrupleks tabanlı bir sensör sistemi tasarlanmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bakır, kaya, toprak, su, sediment ve havada doğal olarak bulunan bir ağır metaldir. Bakır tüm bitki ve hayvanlarda doğal olarak bulunmaktadır. Tüm canlı organizmalar için iz element olarak alınması önemli bir elementtir. Yüksek seviyelerde ise toksik etkiler oluşturabilmektedir.

Metalik bakır kolayca kalıplanabilmekte veya şekillendirilebilmektedir. Bakırın birçok bileşiği var olmakla birlikte pirinç, bronz gibi alaşımlar adı verilen birçok metal karışımında da bakır bulunmaktadır. Pek çok bakır bileşiği mavi-yeşil renkleriyle tanınabilir. Bakır esas olarak tel, sac, boru ve diğer metal ürünlerin imalatında metal veya alaşım olarak kullanılmaktadır. Bakır bileşikleri, tarımda küf gibi bitki hastalıklarının tedavisinde veya su arıtımında, ahşap, deri ve kumaşlarda koruyucu olarak kullanılır (Anonim, 2004).

Bakır doğada organik malzemelere ve kil, kum gibi toprağın üst katmanlarındaki diğer bileşenlere kuvvetlice bağlanabilmektedir (Hiroki, Kadzunori, ve Tosiharu, 1985). Yediğimiz ve içtiğimiz pek çok yiyecek ve içecek çeşitli konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Souli ve ark., 2017).

İnsan vücudunda bakır, homeostaz ile korunmaktadır (Bertinato ve L'Abbé, 2004). Bakır alımı, insan tolerans aralığını aşarsa toksik etkilere neden olmaktadır. Bu toksik etkiler üzerine yapılan çalışmalarda, bakırın yüksek oranda alımının lipid profilinde değişikliklere, oksidatif strese ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi bir dizi toksikolojik aktiviteye yol açabileceği belirtilmektedir (Galhardi ve ark., 2004; Zietz ve ark., 2003).

G-quadrupleks yapılar, dört guanin bazının Hoogsteen hidrojen bağı ile biraraya gelerek oluşturdukları guanin tetratlarından oluşan yapılardır (Smith ve Feigon, 1992). G-quadrupleks yapıları genomda telomer bölgelerinde ve onkogen promotorlarında oluşabildiği gibi uygun koşullar altında *in vitro* ortamda da oluşabilmektedir. Bu özellikleri araştırmacıların G-quadrupleks yapılarını algılama, tespit ve sinyal oluşturma çalışmalarında kullanmasına olanak sağlamıştır.

Moleküller, bir foton ile uyarıldıklarında, uyarılmış bir duruma ulaşmaktadırlar. Ardından bu uyarılmış durumdan temel durumlarına dönüş yapma eğilimi gösterirler.

Farklı şekillerde sağlanabilen bu temel duruma dönme sonrası floresan özellik oluşmaktadır. (Elmer, 2000). Floresan moleküler rotorlar, florofor olarak adlandırılan  $\pi$ -konjuge bağı içeren floresan molekülleridir. Floresan yoğunluğu, çevresel viskoziteden etkilenen rotatörlerin molekül içi dönme derecesine göre değişmektedir.

Moleküler rotorlar, ortamın polaritesine ve viskozitesine karşı hassas duyarlılığa sahiptir ve bu özellikleri onların viskozite sensörü problemleri olarak kullanımı uygulamalarını artırmıştır (Hosny ve ark., 2013). Floresan moleküler rotorlar organeller ve mikroakışkan kanallar dâhil olmak üzere çeşitli ortamlarda viskozite sensörleri olarak görev yapabilmektedirler (Lee ve ark., 2018).

Floresan moleküler rotolar ve G-quadrupleks tabanlı algılama sistemleri çalışmalarının temelinde, tespit edilecek maddeye özgün, guanin nükleotidince zengin ve G-quadrupleks yapısını oluşturmaya elverişli bir DNA dizisi seçilmesi ve ardından floresan özelliği bulunan çeşitli boyalar yardımıyla G-quadrupleks oluşumunun tetiklenerek floresan yoğunluğunun artması ve floresan bir sinyal alınması yatmaktadır.

## **2.1 Bakır**

Bakır, çeşitli kayalarda ve minerallerde bol miktarda bulunan eser elementlerden biridir (Bowen, 1985). Bakır aynı zamanda hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda çok çeşitli metabolik işlemlerde görev alan temel mikro besinlerden de bir tanesidir. Sitokrom c oksidaz, nitrat redüktaz gibi redoks katalizörleri veya hemosiyanin gibi dioksijen taşıyıcıları olarak görev yapan çok sayıda bakır ile ilişkilendirilmiş enzim bilinmektedir (Flemming ve Trevors, 1989). Bakır ile ilişkili proteinler özellikle aerobik organizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır ve temel olarak iki işlevleri vardır, elektron transferi ve oksijen taşınması-aktivasyonu. Bakır proteinleri; solunum, demir taşınması, oksidatif stresten korunma, kan pıhtılaşması ve pigmentasyon gibi hayati süreçlerde rol oynamaktadır (Puig ve Thiele, 2002).

Bakır, hemoglobinin oluşumu, ilaç metabolizması, karbonhidrat metabolizması, katekolamin biyosentezi ile ilgili bir dizi metaloenzime dâhil edilir. Sitokrom c oksidaz, süperoksit dismutaz, ferrosidazlar ve monoamin oksidaz gibi bakıra bağlı enzimler, reaktif oksijen türlerini azaltma işlevi görmektedir. Bakır, glukoz 6-fosfataz ve glutatyon redüktaz gibi çeşitli enzimlerin sülfhidril gruplarına bağlanabilir, böylece

hücrelerin serbest radikal hasarlarından korunmasına engel olur. Bakır, gastrointestinal sistemden demir emilimini teşvik eder, demirin dokulardan plazmaya taşınmasında rol oynar, sinir sisteminde miyelinin korunmasına yardımcı olur, hemoglobinin sentezi ve diğer önemli fonksiyonlar için gereklidir (Anonim, 2004; Flemming ve Trevors, 1989).

Bakır tüm canlılar için gerekli bir element olmasına rağmen, yüksek seviyelerde toksik hale gelmektedir; bu nedenle doğal ortamlarda bulunan bakır seviyeleri önemlidir. Biyolojik sistemler tarafından kolayca kullanılabilir olması için, bakırın suda çözünür bir biçimde mevcut olması gereklidir. Bazı toksik elementler nadir çözünebilir veya çözünemez olduğu için biyolojik sistemler tarafından kullanılamamaktadır. Çevrede biyolojik olarak erişilebilen bakır seviyeleri insan faaliyetlerinin bir sonucu olarak artmaktadır. Bakırın ekolojik ortamlara salındığı antropojenik faaliyetler; metal kaplama, çelik üretimi, rafineriler gibi endüstriyel işlemler (Förstner ve Wittmann, 1979), gübre (Barkay ve ark., 1985), antibakteriyel ve antifungal tarım ilacı olarak kullanımı (Güven ve ark., 2004), evsel atıklar ve atık su tortuları olabilmektedir.

Metallerin ve diğer kirleticilerin doğal ortamlardaki organizmalar üzerindeki etkilerini belirlemek çevre dengesi açısından oldukça önemlidir (Flemming ve Trevors, 1989). Metal kirliliğinin yoğun olduğu ortamlar arasında denizler, tatlı yüzey suları, çökeltiler ve topraklar bulunur (Stauber ve Florence, 1987). Bu ortamlarda kirlenmeye sebep olan etkenler ciddi çevreyle ilgili sonuçlara neden olabilmektedir.

Analitik yöntemler, numunelerin toplam bakır içeriğini belirlemeye yardımcı olmaktadır. Numunelerdeki özgün bakır bileşiklerinin ve komplekslerinin belirlenmesi zordur. Çevresel numuneler için kullanılan en yaygın yöntemler atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), endüktif olarak eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi (ICP-AES) ve endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometrisidir (ICP-MS). Bakır analizi için kullanılan diğer analitik yöntemler arasında x ışını floresansı, anodik sıyırma voltametri, nötron aktivasyon analizi, foton kaynaklı x ışını emisyonu ve kromatografik analizler bulunur (Ahmed ve Davies, 1993; Apte ve ark., 1990; Anonim, 2004). Son zamanlarda bu yöntemlere alternatif olarak hızlı, düşük maliyetli ve hassas sonuçlar veren sensör sistemleri bakır gibi çeşitli ağır metallerin tespitinde kullanılmak üzere araştırılmaktadır (Zeng ve ark., 2006).

### 2.1.1 Ağır Metaller

Ağır metaller genellikle yüksek yoğunluğa, atomik ağırlığa ve atomik sayıya sahip metaller olarak tanımlanmaktadır (Hawkes, 1997). Bu metaller dış yörüngelerinde benzer elektron dağılımına sahiptirler. Atom numaraları 63-200 arasında ve yoğunlukları  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyüktür (Duffus, 2002). Bu metallere demir, bakır, kalay, cıva, kobalt, çinko, galyum ve talyum örnek verilebilir (Valkovic, 1990). Kobalt, bakır, krom, demir, magnezyum, manganez, molibden, nikel, selenyum ve çinko gibi bazı metaller çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan temel besinlerdir. Bu mikro besin maddelerinin yetersiz olması çeşitli eksiklik hastalıkları veya sendromları ile sonuçlanabilmektedir (Tchounwou ve ark., 2012).

Ortalama 70 kg bir insanın vücudu yaklaşık % 0.01 ağır metal içermektedir, bu oran yaklaşık olarak iki kurutulmuş bezelyenin ağırlığına eşdeğer miktar olan 7 gramdır. Bir insan vücudunda yaklaşık olarak 4 g demir, 2,5 g çinko, 120 mg kurşun, 70 mg bakır, 30 mg kalay, 20 mg vanadyum ve kadmiyum, 15 mg nikel, 14 mg selenyum, 12 mg manganez ve 200 mg diğer ağır metaller bulunmaktadır (Emsley, 2011).

Ağır metallerden bazılarının eser miktarları canlı formlarının bazı biyolojik aktiviteleri için hayati öneme sahiptir. Örneğin bakır; katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz, sitokrom c oksidazlar, ferroksidazlar, monoamin oksidaz ve dopamin p-monooksijenaz dahil olmak üzere oksidatif strese bağlı çeşitli enzimler için temel bir kofaktör olarak görev yapar. Bu nedenle, hemoglobin oluşumu, karbonhidrat metabolizması, katekolamin biyosentezi, kollajen, elastin ve saç keratinin çapraz bağlanması ile ilgili bir dizi metaloenzime dahil edilen temel bir besindir (Harvey ve McArdle, 2008; Stern, 2010).

Biyolojik aktivitelerdeki rollerinin yanında ağır metaller çevreye ve canlılara zararlar verebilmektedir. Krom, arsenik, kadmiyum, cıva ve kurşunun elementel ya da farklı elementlerle birleşik formlarının her türlü çevreye ve dolayısıyla insanlara büyük zararlar verme potansiyeline sahiptir (Nahar, 2017). Hekzavalent krom, cıva buharı ve birçok cıva bileşiği karsinojenik özellikleri bulunan ağır metallerdendir (Kozin ve Hansen, 2013). Bu ağır metaller elementler kükürte yüksek bir afinite gösterirler ve insan vücudunda genellikle tiyol grupları (-SH) vasıtasıyla metabolik reaksiyonların

hızını kontrol etmeden sorumlu olan bazı enzimlere bağlanırlar (Rusyniak ve ark., 2010).

Arsenik, neredeyse tüm çevresel matrislerde düşük konsantrasyonlarda tespit edilen bir elementtir. Arsenik çeşitli mitokondriyal enzimlerin inhibisyonu ve oksidatif fosforilasyonda ayrışmamasına neden olduğu için hücre solunumun bozulmasına yol açmaktadır. Arsenik, protein ve enzimlerin sülfhidril gruplarıyla etkileşime girebilme ve çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda fosfor yerine geçme kabiliyetinden dolayı toksik özellik taşımaktadır (Belton ve ark., 1985; Hughes, 2002; Wang ve Rossman, 1996).

Krom, yer kabuğunda mevcut olan ve krom (II) ile krom (VI) arasında değişen oksidasyon durumları bulunan doğal bir elementtir (Jacobs ve Testa, 2005). Özellikle krom (VI)'ün hücre zarlarından geçebilme özelliği ve bunun ardından hücre içi indirgeme ile reaktif ara maddelere indirgenmesi toksisiteye sebep olmaktadır (Connett ve Wetterhahn, 1983).

Kurşun, yer kabuğunda az miktarda bulunan doğal bir metaldir. Kurşun çevrede doğal olarak meydana gelmesine rağmen, çeşitli antropojenik faaliyetler yüksek konsantrasyonlarda kurşunun serbest bırakılmasına neden olmaktadır (Gabby, 2006). Kurşunun toksikolojik özellikleri; kalsiyumun etkilerini önleme, kalsiyumu taklit etme ve proteinlerle etkileşime girme yeteneğinden ileri gelmektedir. Memeli iskeleti içerisinde kurşun, kalsiyum yerine mineralin içine dâhil edilir. Kurşun biyolojik moleküllere bağlanır ve bu moleküllerin fonksiyonlarını çeşitli mekanizmalarla engeller. Kurşun, sülfhidril ve amid enzim gruplarına bağlanır, konfigürasyonlarını değiştirir ve aktivitelerini azaltır (Flora ve ark., 2007).

Son yıllarda, ağır metaller tarafından çevresel kirlenmeye bağlı olarak artan çevreyle ilgili kirlenmeler halk sağlığı açısından endişe oluşturmaktadır. Ayrıca, çeşitli endüstriyel, tarımsal, evsel ve teknolojik uygulamalarda kullanımlarının katlanarak artması sonucu insan maruziyeti çarpıcı bir şekilde artmıştır (Bradl, 2005). Ayrışma ve volkanik patlamalar gibi doğal olaylar ile birlikte rafinerilerde metal işleme, santrallerde kömür yakma, petrol yakma, nükleer santraller ve kağıt işleme tesisleri gibi endüstriyel kaynakların da ağır metal kirliliğine önemli ölçüde katkıda bulunduğu bildirilmiştir (He ve ark., 2005; Nriagu, 1989; Shallari ve ark., 1998).

### 2.1.2 Bakır (II) İyonu Yapısı ve Genel Özellikleri

Bakır; simgesi Cu (Latince *cuprum*) ve atom numarası 29 olan, doğada serbest veya birleşik olarak bulunan bir elementtir (Meija ve ark., 2016). Bakır çok yüksek ısı ve elektrik iletkenliğine sahip yumuşak ve işlenebilir bir metaldir. Yeni açığa çıkmış saf bakırın yüzeyi pembemsi turuncu renktedir (Haynes, 2014). Bakır, doğada doğrudan kullanılabilir metaller yani doğal metaller formunda oluşabilen az sayıdaki metallere biridir. Bu özelliği sebebiyle bazı bölgelerde insan kullanımına kalkolitik çağdan itibaren başlanmıştır (McHenry, 1992). Bakır metalinin ilk kullanım kayıtlarına Kıbrıs'ta rastlanmaktadır ve Roma döneminde bakır genellikle bu bölgede çıkarılarak kullanılmıştır (Balthazar, 1990). İsmi de Kıbrıs'tan alan bakır latince *cuprum*, eski İngilizcede *coper* olarak kullanılmıştır ve günümüzde *copper* olarak da bilinmektedir.

Bakır, suyla doğrudan reaksiyona girmez, ancak atmosferik oksijenle yavaşça reaksiyona girerek kahverengi-siyah bakır oksit tabakası oluşturur ve paslanmayı önler. Eski birçok yapının çatısı (Van Grieken ve Janssens, 2014) ve Özgürlük Anıtı (Şekil 2.1) gibi eski bakır yapılarda yeşil bir bakır katmanı görülür (Moyer ve Everett, 2014). Bakır, çeşitli bakır sülfürler oluşturmak üzere reaksiyona girdiği bazı sülfür bileşiklerine maruz kaldığında kararır. Diğer metallere olduğu gibi, bakır başka bir metalle temas ettirilirse, galvanik korozyon meydana gelir (Rickett ve Payer, 1995).





Şekil 2.1: Bakır Metali İle Oluşturulan Özgürlük Anıtı (Schwen, 2008)

Bakır, gümüş ve altın gibi periyodik tablonun 11. grubunda bulunmaktadır. Bakırın dört farklı oksidasyon şekli mevcuttur: Cu (O), Cu (I), Cu (II) ve Cu (III) (Lenntech, 2009). Bakır; dolu bir d-elektron kabuğunun üstünde bir s-orbital elektrona sahiptir. d-elektron kabuğu dolu olmayan metallerin aksine, bakırdaki metalik bağlar kovalent bir karakterden yoksundur ve nispeten zayıftır. Bu da bakır kristallerinin düşük sertliğini ve yüksek sünekliliğini açıklamaktadır (George ve Edmund, 1992). Doğada bakırın 29 izotopu vardır, bu izotoplarda  $^{63}\text{Cu}$  ve  $^{65}\text{Cu}$  izotopları kararlıdır, diğer bütün izotopları ise radyoaktiftir (Audi ve ark., 2003).

Bakır biyostatiktir, yani bakteri ve diğer birçok yaşam şekli üzerinde üreyemez. Özellikle denizel çevrelerdeki aşırı koşullarda bile biyolojik kirlenmeyi önleyerek korozyona dayanıklılık gösterir (Powell ve Stillman, 2009). Bakır alaşımlı yüzeyler *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), influenza A virüsü, adenovirüs ve mantarlar gibi çok çeşitli mikroorganizmaların üremesini ve canlılık faaliyetlerini, virüslerin aktifleşmesini engelleyen özelliklere sahiptir (Souli ve ark., 2017). EPA, bakır alaşımlı yüzeyleri "halk sağlığı yararına sahip antimikrobiyal malzemeler" olarak tescillemiştir (Biurrun ve ark., 1999). Antimikrobiyal bakır alaşımlı

ürünler şu anda dünyanın birçok ülkesinde sağlık tesislerinde, metro taşıma hatlarında (Efstathiou, 2011) ve antimikrobiyal koruyucu kumaşlar oluşturmak için fiberlerle karıştırılarak kullanılmaktadır (Yan ve Cheng, 2005).

Bakır aerobik solunum yapan tüm canlılar için hayati öneme sahiptir. Bakır, mitokondride oksidatif fosforilasyondaki son protein olan sitokrom c oksidazın anahtar bir bileşenidir. Sitokrom c oksidaz, oksijeni bakır ve demir arasına bağlayan proteindir. Yumuşakçalarda ve kabuklularda bakır, kandaki pigment olan hemosiyaninin bir bileşenidir. Hemosiyanin mavi olduğu için, bu organizmaların demir bazlı hemoglobinin kırmızı kanından ziyade mavi kanları vardır. Balıklarda ve diğer omurgalılarda ise demir-kompleksli hemoglobin şeklinde bulunmaktadır. İnsanlarda bakır, çoğunlukla karaciğerde, kaslarda ve kemiklerde bulunur (Johnson ve Larry, 2008). Yetişkin bir insanda, vücut ağırlığının kilogramı başına 1,0 ila 1,4 mg bakır bulunmaktadır (Karim, 2018).

Bakırın zorunlu temel elementlerden birisi olma özelliği oksidasyon durumlarını değiştirme, bakır (I) ve bakır (II) iyonları arasında geçiş yapma ve elektron verici veya alıcı olarak hareket etme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Ralph ve McArdle, 2001). Bakır, çok sayıda kritik enzim reaksiyonunda bir katalitik kofaktör olarak, bir allosterik enzim bileşeni olarak ve oksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynayan güçlü bir antioksidan olarak gerekli bir iz elementtir. Bununla birlikte bakırın aşırı yüklenmesi; hidroksil radikalleri üretebilen veya oksidatif hasar üretebilen bağlı olmayan iyonik bakır oluşumuna neden olabilmektedir (Bertinato ve L'Abbé, 2004; Letelier ve ark., 2005).

### **2.1.3 Bakır (II) İyonunun İnsan Sağlığı Açısından Önemi**

Bakır insan yaşamının sürdürülebilmesi için zorunlu elementlerden biridir. Bakır insan vücudun tüm dokularında; kanda, idrarda, dışkıda, saçta ve tırnaklarda bulunmaktadır. Bakır eksikliği, çocukların gelişim süreçlerindeki kemik sakatlıkları ile ilişkilendirilmiştir ve yetişkinlerde de osteoporoz ile ilintili bir faktördür (Allen ve LaMont, 1982). Bakır eksikliğinin çok fazla olması durumunda insanlarda kalp krizi riskinin artışı ve kolesterol metabolizmasında değişiklikler görülebilmektedir. Bakırla birlikte alınan bazı maddeler de gastrointestinal sistemden kan dolaşımına giren bakır miktarını etkileyebilir. Bu nedenle bakır metabolizması diğer mikro minerallerle de sıkı

sıkıya ilişkilidir ve bakır eksikliğinin; demir mobilizasyonunu bozduğu ve ikincil demir eksikliğine neden olduğu bilinmektedir (Rayssiguier ve ark., 1993).

Bakır içeren yiyecekler ya da içecekler, yenildikten veya içildikten sonra kan dolaşımına hızlı bir şekilde girerek vücut boyunca dağılmaktadır. İnsanlarda bakır bağırsakta emilip, daha sonra albumine bağlı olarak karaciğere taşınmaktadır (Adelstein ve Vallee, 1961). Bakırın karaciğerde emilimi sağlandıktan sonra kandaki bakırı taşıyan protein olan serüloplazmin ile diğer dokulara dağıtılmaktadır. Serüloplazmin ayrıca süte salgılanan bakır da taşımaktadır ve özellikle bu bakırın diğerlerine göre emilimi fazla olan bakır olduğu da bilinmektedir (Linder ve ark., 1998). Bakır, daha sonra vücuttan idrar ve dışkı yoluyla atılır. Bakırın vücudunu terk etmesi birkaç gün sürebilmektedir (Davis ve Johnson, 2002; Anonim, 2000). İnsan vücudu yüksek miktarda bakırın kan dolaşımına girmesini engellemede iyi bir mekanizmaya sahiptir. Genel olarak, vücuttaki bakır miktarı sabit kalır yani vücuda giren miktar, bırakılan miktara genellikle eşittir. Bakır homeostazı, bakır toksisitesinin önlenmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, aşırı bakır seviyelerine maruz kalmak bir dizi olumsuz sağlık etkisine neden olabilmektedir (Gulson ve ark., 2001).

Çoğu besin doğal olarak bakır içermektedir. Gıdalardan tahmini günlük bakır alımı yetişkinler için günde ortalama 1,0-1,3 mg arasındadır (Pennington, ve ark., 1986). Düzenli olarak karaciğer, böbrek gibi organ etleri, fındık, tohum, baklagiller ve tahılların tanecik kısımlarını tüketen kişiler için bakırın diyet alımının bu ortalamanın üzerinde olması beklenmektedir. Bu alımların, dünya sağlık örgütünün belirlediği önerilen maksimum 10-12 mg/gün limitini aşmaması gerekmektedir (Anonim, 1996).

EFSA 2013 yılında, insanlarda diyetle günlük bakır alımı için önerilen değerleri rapor etmiştir. Bu rapora göre önerilen bakır diyeti miktarları, 18 yaş ve üstü kadın ve erkekler için sırasıyla günde 1,3 ve 1,6 mg olarak belirlenmiştir. Hamilelik ve emzirme döneminde bu miktar günde 1,5 mg'dır. Çocuklar için önerilen bakır diyet miktarları, 1-17 yaş arası için günlük 1,3 mg olmakla birlikte her yaş artışında bu miktarın 0,7 mg daha artmasının insanlarda tolere edilebilir değerler olduğu belirlenmiştir (Anonim, 2013).

Esansiyel metaller vücut tarafından esansiyel olmayan metallere veya diğer kimyasal maddelerden farklı şekillerde kullanılmaktadır. Bu nedenle, doz yanıtını modellemeye

yönelik olan kavramsal yaklaşımlar, beslenme gereksinimlerini karşılayan ve toksisiteyi önleyen kabul edilebilir bir oral alım aralığı sağlayan homeostatik bir çerçeveye gerektirmektedir (Anonim, 2002).

Bakır tozuna uzun süre maruz kalmak burunda, ağızda ve gözlerde tahrişe ya da baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı ve ishale neden olabilmektedir. Normal seviyelerden yüksek oranda bakır içeren su içilmesi durumunda bulantı, kusma, mide krampları veya ishal görülebilir. Kasıtlı olarak yüksek miktarda bakır alımı karaciğer ve böbrek hasarına ve hatta ölüme neden olabilir. Yeterli insan veya hayvan kanseri çalışması olmadığından EPA, bakırı insan kanserojen olarak sınıflandırmamaktadır (Anonim, 2004).

Kronik bakır toksisitesi öncelikle karaciğeri etkilemektedir, çünkü bakırın kana girdikten sonra ilk birikme bölgesi karaciğerdir. Bakır toksisitesi tipik olarak hemoliz atakları olan karaciğer sirozu ile kendini gösterir. Belirtiler koma, hepatik nekroz ve ölüme kadar ilerleyebilir (Winge ve Mehra, 1990). Kronik bakır toksisitesi, bakır içeren tüp yoluyla diyaliz alan diyaliz hastalarında (Klein ve ark., 1972), bakır içeren pestisit kullanan işçilerde (Winge ve Mehra, 1990) ve intravenöz total parenteral beslenmede uzun süre muhafaza edilen bebeklerde görülmüştür (Beshgetoor ve Hambidge, 1998).

EPA, 2008 yılında içme suyunda tolere edilebilir bakır miktarını, litre başına 1 mg olarak belirlemiştir (Anonim, 2008). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2004 yılında yayınlanan kılavuza göre ise içme suyunda bakır konsantrasyonu 2 mg L<sup>-1</sup>'yi geçmemelidir (Anonim, 2004). İSKİ 2019 şubat raporunda Türkiye'deki içme sularında kabul edilebilir bakır oranını 2 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlemiştir (Anonim, 2019). İçme suyundaki bakır konsantrasyonları, pH ve su kaynağının sertliğindeki değişikliklerin bir sonucu olarak değişiklikler göstermektedir (Pettersson ve ark., 2003).

Yüksek miktarlarda bakır ile kirlenmiş su veya yiyeceklerin tüketilmesi, akut gastrointestinal semptomların gelişmesiyle ilişkilidir (Knobeloch ve ark., 1998). Bakır zehirlenmesi, erken evrelerde zayıflık, uyuşukluk ve anoreksi ile ileri evrelerde ise gastrointestinal sistemin epitelyal astarının aşınması, karaciğerde hepatoselüler nekroz ve akut böbrekte tübüler nekrozla sonuçlanabilmektedir (Barceloux, 1999). Bakır bağlayıcı proteinlerin anormallikleri Menkes bozukluğu ve Wilson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Strausak ve ark., 2001).

Bir tür erken çocukluk dönemi karaciğer sirozu olan Hintli olmayan çocukluk sirozu, karaciğerde aşırı miktarda bakır birikimi sonucunda karaciğer sirozuna yol açan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda bu hastalığın en büyük sebeplerinden birinin bakır veya pirinç kaplarda depolanan ya da kaynamış süttten emilen yüksek miktarda bakır alımı olduğu rapor edilmiştir (Tanner ve ark., 1979; Tanner, 1998).

Bakır, nöral fonksiyonlar için gerekli olan proteinlerin önemli bir bileşenidir. Bununla birlikte bakır Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Sayre ve ark., 2000; Strausak ve ark., 2001). Alzheimer hastalığı, artan bakır, demir, çinko konsantrasyonları ve beyinde artan amiloid  $\beta$  protein yapılarının birikimi ile oluşan nöral dejenerasyon ile karakterize edilmektedir (Multhaup, 1997).

Bakır esansiyel bir besin maddesi ve oksidatif hasarı başlatabilen bir redoks aktif geçiş metalidir. Yüksek bakır konsantrasyonları lipitlerde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasarın artmasına sebep olarak nörodejeneratif hastalıklara sebep olabilmektedir. Bazı besinler bakır ile etkileşime girerek toksisitesini değiştirebilmektedir. Mevcut bilgiler E vitamininin bakır kaynaklı oksidatif hasara karşı büyük ölçüde azaltılmasını sağladığını göstermektedir (Gaetke ve Chow, 2003).

Bakır, polimerlerde, plastiklerde, metalik kaplamalarda ve mürekkeplerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (G. Liu ve ark., 2004). Nano-bakır partikülleri, kolumbik özelliklerinden dolayı şarj-deşarj özelliğini önemli ölçüde arttırabildiklerinden lityum iyon piller için yüksek oran performanslı bir anot malzemesi olarak kullanılmaktadır (K. Guo ve ark., 2002). Bakır alaşımlı yapılar, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* ve *S. aureus* gibi bazı hedef mikroorganizmaların büyümesini inhibe edebilen antimikrobiyal biyoaktif kaplamalarda da kullanılmaktadır (Cioffi ve ark., 2005). Bu özelliklerinden dolayı bakır, birçok farklı yollar üzerinden çevreyle ve canlılarla etkileşime girebilmektedir (Chen ve ark., 2006).

#### **2.1.4 Bakır (II) İyonunun Ekolojik Açıdan Önemi**

Metallerin ve diğer kirleticilerin doğal ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini, birincil ayrıştırıcılar olarak çevreyle ilgili önemlerinden dolayı belirlemek oldukça önemlidir (Flemming ve Trevors, 1988). Toprak ve sediment

çözeltileri ile tatlı su ve deniz suyu sistemleri kimyasal olarak karmaşıklardır. Bu sistemlerde metaller, inorganik ve organik ligandlar karışım halinde bulunmaktadır. Bu sistemler yüksek yüzey alanına sahip olduklarından içlerinde bulunan yapılar dinamik değişime açıktır (Florence ve ark., 1980).

Bakır toprağa salındığında, organik malzemeye ve kil, kum gibi toprağın üst katmanlarındaki diğer bileşenlere kuvvetlice bağlanabilmekte ve çok uzağa hareket edememektedir (Hiroki ve ark., 1985). Bakır ve bakır bileşikleri suya salındığında çözünen bakır yüzey sularında bakır bileşikleri şeklinde, suda asılı parçacıklara bağlı bakır şeklinde veya serbest bakır olarak taşınabilmektedir. Suyu giren bakır nehir, göl ve haliç çökellerinde toplanmaktadır. Bakır, bitkilerde, hayvanlarda ve midye, istiridye gibi filtre besleyicilerinde çeşitli konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bakır ayrıca, içme suyu da dâhil olmak üzere, yediğimiz ve içtiğimiz pek çok yiyecek ve içecekte çeşitli konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Souli ve ark., 2017).

Havadaki bakır konsantrasyonu, bir metreküp hava içinde 1-200 ng (m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Bakır cevherini metale işleyen endüstrilerin yakınında, havadaki bakır konsantrasyonları 5.000 ng (m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> 'e ulaşabilmektedir (Breslin, 1999).

Musluk sularındaki ortalama bakır konsantrasyonu 20-75 ppb arasındadır (Pizarro ve ark., 1999). Bununla birlikte, birçok evde 1000 ppb'nin üzerinde bakır konsantrasyonları bulunabilmektedir. Bu; bir litre su için 1 miligramdan fazla bir miktar demektir. Bunun nedeni, suyun gece boyunca borularda oturması durumunda bakırın bakır borulardan ve pirinç musluklardan çözünmesidir. Suyun 15-30 saniye akmasına izin verildikten sonra, sudaki bakır konsantrasyonu kabul edilebilir içme suyu standardının altına düşmektedir (Anonim, 2004). İçme suyu, bakırın canlılar tarafından normal oranlarının üzerinde alınmasının birincil kaynağını oluşturmaktadır. Göllerde ve nehirlerde bakır konsantrasyonu ortalama 0,5-1000 ppb arasında değişmektedir. Yeraltı sularındaki ortalama bakır konsantrasyonu göl ve nehirlerdekine yakındır (Town ve Filella, 2000).

Suda yaşayan canlıların, bakıra duyarlılıkları büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bakır, balıklarda solungaç, böbrek, mekanik reseptörlerde ve diğer dokularda histolojik değişikliklere neden olduğundan balıkları olumsuz olarak etkilemektedir (Sorensen, 1991). Yapılan bir çalışmada, bir göle 2000 µg L<sup>-1</sup> bakır eklenmesi üzerine, o gölde yaşayan zooplankton popülasyonlarının önemli ölçüde

azaldığı görülmüştür (McIntosh ve Kevern, 1974). Tatlı su göllerinden birine 0.005-0.01 mg L<sup>-1</sup> oranında eklenen bakır sülfatın ise mavi algleri ortadan kaldığı, yeşil alglerin artışına sebep olarak alg biyokütlelerinde önemli bir düşüşe sebep olduğu ve algal topluluk yapısında bir dengesizliğe neden olduğu rapor edilmiştir (Effler ve ark., 1980). İçme suyundaki bakır konsantrasyonunun artırılması sonucunda, 2-6 gün içinde koliformlarda % 90'a yakın hasara ve daha uzun süreli maruz kalmalar sonrasında hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür (Domek ve ark., 1984).

Toprak genellikle 2-250 ppm arasında bakır içermektedir, ancak bakır ve pirinç üretim tesislerinin yakınında bu oran 17000 ppm'e kadar çıkabilmektedir. Toprakta yüksek konsantrasyonlarda bakır bulunabilmektedir, çünkü bu endüstrilerden gelen toz havadan yayılabilmekte veya madencilikten ve diğer bakır endüstrilerinden gelen atıklar toprağa atılabilmektedir. Topraktaki bir başka yaygın bakır kaynağı, atık su arıtma tesislerinden çıkan çamurun yayılmasından kaynaklanmaktadır. Bu bakır genellikle toprak yüzeyine kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır (Tyler ve McBride, 1982).

Toprak ve sedimentlerdeki yüksek bakır konsantrasyonları da toprakta bulunan mikroorganizma popülasyonlarını etkilemektedir. Bir bataklık sedimenti mikrokozmuına 1000 bakır eklenmesi, bu bölgedeki ATP biyokütlesinin büyük ölçüde azalmasına neden olmuştur (Capone ve ark., 1983). Çeltikli bir toprağa 1600 µg.g<sup>-1</sup> bakır ilavesinin ise o bölgedeki mantar çeşitliliğini % 40 oranında azalttığı rapor edilmiştir (Hiroki ve ark., 1985).

Bakır, tütün dumanının da bulunan bir bileşenidir (Talhout ve ark., 2011). Tütün gibi bazı bitkiler etraflarında bulunan topraktan bakır gibi ağır metalleri yapraklarına kolayca emerek biriktirmektedirler (Pourkhabbaz, 2012).

## **2.2 G-quadrupleks**

Çift sarmal DNA yapısının 1953 yılında aydınlatılmasının ardından DNA yapısının gizeminin çözülebilmesi üzerinde çalışmalar başlamış ve günümüze kadar devam etmiştir. DNA, çift sarmal yapının yanı sıra çeşitli molekül içi ya da moleküller arası sekonder yapılara da katlanabilmektedir. Guanin bakımından zengin nükleik asit birimleri, çeşitli iyonların varlığında ve uygun koşullar altında G-quadrupleks olarak adlandırılan dört iplikli yapıları oluşturabilmektedirler (Kerwin, 2000).

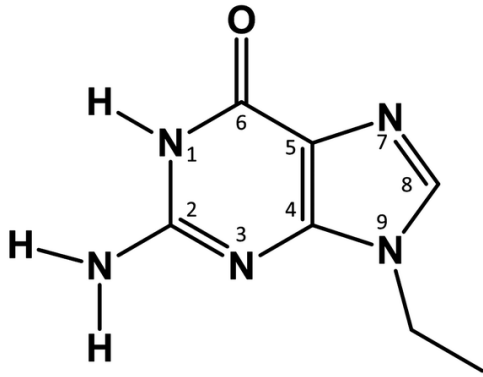
G-quadrupleks yapılar, dört guanin bazının Hoogsteen hidrojen bağı ile bir araya gelerek oluşturdukları guanin tetratlarından oluşan polimorfik yapılardır (Smith ve Feigon, 1992). G-quadrupleks yapıları canlılarda telomer bölgelerinde, onkogen promotorlarında ve 3'-5' okunmayan gen bölgelerinde oluşabildiği gibi uygun koşullar altında *in vitro* da oluşabilmektedir. G-quadrupleks yapıları DNA iplikçiklerinin oryantasyonuna bağlı olarak paralel, antiparalel gibi çeşitli topolojiler benimseyebilmektedir (Bochman ve ark., 2012). G-quadrupleks yapılarının topolojisi ve kararlılığı, toplam G-quadrupleks motifinin uzunluk ve dizi bileşimi, guaninler arasındaki ilmeklerin büyüklüğü, iplikçiklerin stokiyometrisi, katyonların varlığı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Guedin ve ark., 2010; Hardin ve ark., 2000).

Floresan boyalar, organizmalardaki makromoleküllerin lokalizasyonunu incelemek için kullanılan güçlü bir araçtır (Vummidi ve ark., 2013). G-quadrupleksler tek zincirli yada dubleks DNA yapılarından 2-10 kat daha yüksek kuantum floresan verimi sergilemektedirler (Miannay ve ark., 2010). G-quadrupleks yapılara bağlandığında floresan davranışında güçlü bir değişiklik gösteren çeşitli boyalar bulunmaktadır (Yan ve ark., 2012). Fakat bu boyalardan hepsi seçicilik göstererek sadece G-quadrupleks yapılara bağlanmamakta, aynı zamanda tek ya da çift zincirli DNA yapılarına da bağlanabilmektedirler. Bu nedenle, G-quadrupleks yapıları seçici bir şekilde indükleyen ve stabilize edebilen boya ve ligandların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Mohanty ve ark., 2012).

### 2.2.1 Guanin Tetratları

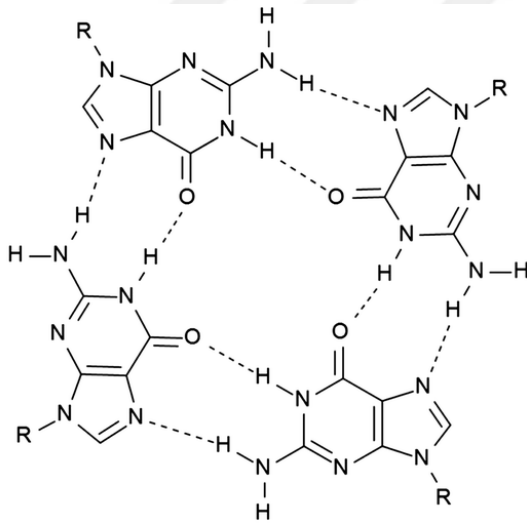
Guanin, DNA ve RNA nükleik asitlerinde bulunan beş ana nükleobazdan birisidir (Şekil 2.2).  $C_5H_5N_5O$  formülüne sahip olan guanin, konjüge çift bağlara sahip pirimidin-imidazol halka sisteminden oluşan bir purin türevidir. Guanin sitozine üç hidrojen bağıyla bağlanmaktadır. Nükleobazlar arasında en büyüğü olan guanin, sadece Watson-Crick tamamlayıcı nükleotidi sitozin ile değil aynı zamanda timin, adenin ve kendisiyle de birleşmek için çok yüksek bir eğilim göstermektedir (Vorlíčková ve ark., 2012).





Şekil 2.2: Guanin Molekülü (Azargun ve Fridgen, 2015)

Nükleik asitler oldukça polimorfik moleküllerdir. Tek iplikli, çift iplikli ve üç iplikli yapıların yanı sıra, tetra iplikli yapılar da oluşturabilmektedirler. Guanin moleküllerinin, G-quadrupleks yapıları oluşturmak için tetratlar halinde bir araya gelmesi de nükleik asitlerin bu eşsiz yeteneğinin bir sonucudur (Mergny ve ark., 1995). Guanin tetratları dört guanin nükleotidinin Hoogsteen hidrojen bağıyla bir araya gelerek oluşturduğu dörtlü yapılardır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Guanin Tetratı (Azargun ve Fridgen, 2015)

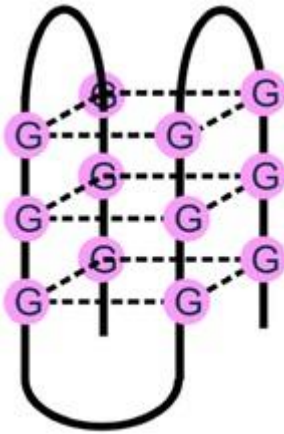
Guanin tetratları, kümeler oluşturarak guanin quadrupleks (G-quadrupleks) yapıları içinde istiflenmektedir. Guanin tetratları tarafından oluşturulan merkezi boşluk, çeşitli katyonlara ev sahipliği yapmaktadır. Tek değerlikli katyonlar, bu merkezi boşluğa girerek G-quadrupleks yapısının stabilizasyonda rol almaktadırlar (Neidle ve Balasubramanian, 2006). Tek değerlikli katyonların tetratların orta kısmında alacağı kesin konumu dört guanin molekülü için de eşit uzaklıktaysa stabilitesi yüksek, eşit uzaklıkta değilse ve bazı guanin moleküllerine daha yakın bazılarına ise daha uzak ise

stabilitesi düşük G-quadrupleks yapıları oluşturmaktır (Guedin ve ark., 2010; Hardin ve ark., 2000).

Potasyum ( $K^+$ ) ve Sodyum ( $Na^+$ ) araştırmacılarca en fazla rapor edilmiş guanin tetratı stabilizasyonunu yükselten katyonlardandır (Nagesh & Chatterji, 1995). G-quadrupleks yapıları için metal katyon tercihi genellikle,  $K^+ > Ca^{2+} > Na^+ > Mg^{2+} > Li^+ > Rb^+ > Cs^+$  eğilimini izlemektedir (Hardin ve ark., 1992). Genellikle *in vitro* ortamda G-quadrupleks yapılar üzerinde çalışan araştırmacıların ilk yaptığı deneysel çalışmalardan biri katyonların G-quadrupleks yapı üzerindeki etkisini incelemek ve uygun katyon türü ve oranını belirlemektir (Smargiasso ve ark., 2009).

### 2.2.2 G-quadrupleks Yapısı

G-quadrupleksler guanince zengin diziler tarafından oluşturulan 4 iplikçikli sekonder nükleik asit yapılarıdır (Frees ve ark., 2014). Guanin yönünden zengin oligonükleotitlerin kendilerini koordine edebildiği bilgisi, çift sarmal DNA yapısının aydınlanmasından daha önce bilinen bir olguydu. Yapının moleküler çalışmalar ile G-quadrupleks yapıların, dört guanin bazının Hoogsteen hidrojen bağı ile biraraya gelerek oluşturdukları guanin tetratlarından oluşan polimorfik yapılar oldukları anlaşılmıştır (şekil 2.4) (Guo ve ark., 2016).

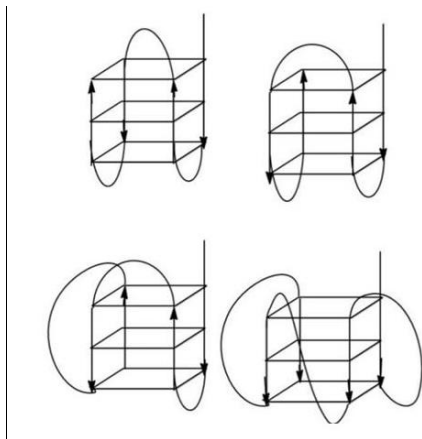


şekil 2.4: G-quadrupleks Yapısı Modeli (Guo ve ark., 2016)

Nükleik asitlerin hücre içindeki görevleri pasif bir rolden çok daha fazlasıdır. Nükleik asit dizilerinin protein kodlayıcı bilgi içeriklerine ek olarak, farklı özelliklerde ikincil yapılar oluşturabilmeleri nükleik asitlerin hücre fonksiyonuna kattığı önemli bileşenlerden biridir. Bir hücrede bulunan DNA yapılarının çoğu, klasik çift sarmal

şeklinde olmasına rağmen tek sarmallı ve sıradanın dışında bazı nükleik asit yapılarının da varlığı, bu yapıları araştırılması ve nükleik asitlerin işlevselliğiyle aralarındaki ilişkinin anlaşılmasına başlamasına sağlamıştır (Zhang ve ark., 2013). G-quadrupleks yapıları, fizyolojik koşullar altında yüksek yapısal stabilite ve G-quadrupleks yapısı ile uyumlu dizilerin yaygın dağılımı nedeniyle dikkat çeken alternatif bir nükleik asit yapısı ailesidir (Gomez ve ark., 2004; Müller ve ark., 2010).

Guanin açısından zengin tüm diziler kararlı G-quadrupleksler oluşturamaz. Guanin nükleotitlerinin fonksiyonel olarak çalışması, belirli bir nükleik asit sekansının G-quadrupleks oluşturabilmesi için önemli bir gerekliliktir. Bu nedenle, bu dizilerin bu yapıyı oluşturup oluşturmadığını deneysel olarak doğrulamak gerekmektedir (Mergny ve Lacroix, 2009). Erime sıcaklığı belirleme, termal veya izotermal fark spektrumları ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi G-quadrupleks yapısını belirleyen çeşitli teknikler mevcuttur, ancak hepsi nispeten zaman alıcıdır ve özel ekipmanlar gerektirir. Yüzlerce dizinin analiz edilmesi ve G-quadrupleks yapılarının tespiti için hızlı ve basit tarama yöntemleri gerekmektedir (Mergny ve ark., 2005). Bu çalışmalar kapsamında [GnNmGnNoGnNpGn] şeklindeki ilk nesil algoritmalar G-quadrupleks tespiti için çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirmiş araçlardandır (Murat ve Balasubramanian, 2014; Parkinson ve ark., 2002). Guanin zenginlik ve guanin eğriliğini dikkate alan, G4Hunter olarak adlandırılan bir algoritma ise Bedrat ve grubu tarafından tasarlanmıştır (Bedrat, Lacroix, ve Mergny, 2016).



Şekil 2.5: Farklı topolojilerdeki G-quadrupleks yapıları (Ma ve ark., 2013)

G-quadrupleksler yapısal olarak polimorfiktir ve katlanma topolojileri DNA dizilerine, ilmek geometrisine ve iyonların, ligandların veya bağlayıcı proteinlerin varlığı gibi ortamın fiziksel koşullarına bağlıdır (Jin ve ark., 2013). G-quadrupleks yapıları çeşitli

olası iplikçik kombinasyonlarının, ilmek büyüklüğünün ve dizi çeşitliliğinin bir sonucu olarak çok çeşitli topolojiler gösterebilmektedir (Şekil 2.5) (Parkinson ve ark., 2002).

G-quadrupleks oluşturma potansiyeli olan guanin nükleotidince zengin diziler genomik DNA'da oldukça yaygın olarak bulunmaktadır ve bunlar telomerik DNA ya da gen promotör gibi biyolojik açıdan önemli birçok bölgede tanımlanmıştır (Palumbo ve ark., 2008; Rachwal ve ark., 2007). Virüsler ve bakteriler de dâhil olmak üzere çeşitli türlerin DNA ve RNA'ları ne kadar çok incelenirse, o kadar etkileyici fonksiyona, yapıya, potansiyel ilaç hedefleme özelliklerine sahip, G-quadrupleks oluşturma potansiyeli olan sekanslar ortaya çıkmaktadır (Murat ve Balasubramanian, 2014). Son yıllarda, yüksek çözünürlüklü dizileme bazlı yöntemler kullanılarak, insan genomunda 710000'in üzerinde potansiyel G-quadrupleks oluşturu bölge bulunduğu gösterilmiştir (Chambers ve ark., 2015).

G-quadrupleks yapıları ile ilgili çalışmalar günümüzde önemli bir biçimde artmaktadır. Bu çalışmaların çoğu; telomer biyolojisi (Cian ve ark., 2008), transkripsiyon düzenlenmesi (Siddiqui ve ark., 2002), translasyon ve RNA olgunlaşması (Millevoi ve ark., 2012) ve replikasyon ve genomik stabilite (Lopes ve ark., 2011) üzerinde G-quadrupleks yapılarının etkilerinin *in vivo* kanıtını sağlamaktadır. Genom içerisinde, tek iplikçikli ve guanin bakımından zengin telomerik 3' uç dışında, G-quadrupleks oluşturma potansiyeline sahip genetik dizilerin çoğu çift iplikli genomda gömülü bulunmaktadır. G-quadrupleks oluşumu yüksek olasılıkla transkripsiyon, replikasyon ve rekombinasyon işlemleri sırasında meydana gelmektedir (Burge ve ark., 2006).

Telomerler, kromozomların ucunda bulunan ve kromozom stabilitesi için gerekli olan DNA-protein yapılarıdır. Telomerik DNA yapılarının çoğu çift sarmal olmasına rağmen, telomerin 3' ucu tek sarmallı guanin nükleotidince bakımından zengin bir DNA kısmından oluşur. Guanin yönünden zengin telomerik DNA yapılarının G-quadrupleks yapılarını oluşturma yeteneği bulunmaktadır (Rhodes ve Giraldo, 1995). Telomerik DNA'nın uzunluğu hücre bölünmesi devam ettikçe yavaş yavaş kısalmaktadır, bu durum da hücre yaşlanmayı tetiklemektedir. G-quadrupleks yapılarının indüksiyon veya stabilizasyonu, normal somatik hücrelerde dormant halde olup tümör hücrelerinin %80–85'inde aşırı ekspres edilen telomerlerin kısaltılmasını ve hücre ölümünü engelleyen telomeraz enzimi aktivitesini düşürmektedir Yüksek

telomeraz aktivitesi, kanserlerin %85'inde de yer aldığından, G-quadruplekslere bağlanan ve stabilize moleküllerin araştırılması ve ilaç geliştirme için önemli bir araştırma alanıdır (Huppert ve Balasubramanian, 2005). G-quadrupleks yapılarının bu özellikleri onları ilaç tasarımları için uygun hedefler haline getirmektedir.

Telomerik DNA birimleri gibi genomda biyolojik olarak G-quadrupleks yapıları oluşturma potansiyeli bulunan başka birimler de rapor edilmiştir (Torigoe ve ark., 1995; Weitzmann ve ark., 1996). Yüksek riskli insan papilloma virüslerinde (HPV) meydana gelen guanin yönünden zengin sekanslar G-quadrupleks yapıları oluşturabildiğinden, potansiyel ilaç hedefleri olarak kullanılabilirler (Giancola ve Montesarchio, 2017).

### 2.2.3 G-quadrupleks DNA Tabanlı Algılama Sistemleri

G-quadrupleks yapılarının organizmalarda oluşabildiği gibi uygun şartlar altında *in vitro* ortamda da oluşturulabilmesi, araştırmacıların bu yapıları algılama, tespit ve sinyal oluşturma çalışmalarında kullanmasına olanak sağlamıştır. Bu çalışmaların temelinde tespit edilecek maddeye özgün, guanin nükleotidince zengin ve G-quadrupleks yapısını oluşturmaya elverişli bir DNA dizisi seçilmesi ve ardından floresan özelliği bulunan çeşitli boyalar yardımıyla G-quadrupleks oluşumunun tetiklenerek floresan yoğunluğunun artması ve floresan bir sinyal alınması yatmaktadır. Tespiti yapılmak istenen analit maddenin ortama eklenmesiyle, bu analit molekül yüksek özgünlük gösterdiği G-quadrupleks DNA dizisine bağlanarak floresan boyanın G-quadrupleks yapısından ayrılmasını ve floresan yoğunluğunun sönümlenmesini (quenching) sağlamaktadır. Floresan yoğunluğunda meydana gelen bu değişim sayesinde elde edilen çeşitli grafikler yardımıyla, absorbans değerlerine bakılarak bir numunede o analitin ne kadar olduğu yüksek doğruluk değeri ile bulunabilmektedir (Yan ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2013).

Liu ve ark. yaptığı bir çalışmada ATP tespiti için G-quadrupleks oluşumu esasına dayanan optik bir algılama sistemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ATP molekülüne özgün DNA dizisi, G-quadrupleks yapısını oluşturabilen guanin nükleotidi yönünden zengin bir dizidir. Bu dizi ThT boyasıyla bir araya geldiğinde G-quadrupleks yapı oluşturulması indüklenmekte ve normalde floresan özelliği olmayan ThT boyası floresan yoğunluğunda yüksek bir artışa sebep olmaktadır. ATP ortama eklendikçe ATP

molekülüne özgün olan DNA dizisi ThT'den daha yüksek afinite gösterdiği ATP ile kompleks oluşturmakta ve ThT'yi G-quadrupleks yapılarından ayırmaktadır. Bu ayrılma floresan sönümlenmeye yani floresan yoğunluğunun azalmasına sebep olmaktadır. Florimetre cihazı ile ortama eklenen çeşitli konsantrasyonlarda ATP ile birlikte floresan yoğunluğunda meydana gelen değişimler tespit edilmiştir. Grubun floresan yoğunlukları esas alınarak oluşturduğu doğrusal grafiklerle elde ettiği denklemler sayesinde ATP konsantrasyonu bilinmeyen bir numune içerisindeki ATP miktarı bu yöntemle etiketlemeye gerek duyulmadan belirlenebilmektedir (Liu ve ark., 2017).

Bir başka çalışma Sun ve ark. yaptığı Thiazole orange boyası kullanarak geniş spektrumlu bir antibiyotik olan tetrasiklin tespiti için tasarlanan G-quadrupleks tabanlı algılama sistemidir. Bu çalışmada tetrasikline bağlanabilen ve G-quadrupleks yapıda olan DNA dizisi kullanılmıştır. Thiazole orange boyası ThT gibi sulu çözeltilerde normalde floresan özellik göstermeyen fakat G-quadrupleks yapıları ile bir araya geldiğinde interkalasyon yaparak G-quadrupleks yapının oluşmasını indüklemekte ve floresan yoğunluğunda yüksek bir artış meydana gelmesini sağlamaktadır. Hedef tetrasiklin varlığında, G-quadrupleks DNA dizilerinin hedefleri olan tetrasikline özgün olarak bağlanması, DNA dizilerinin G-quadrupleks yapılardan saç tokası yapılarına konformasyonel olarak değişimini indüklemektedir. Bunun gibi hedefe bağlı konformasyonel değişiklikler, floresan emisyonunun sönümlenmesine yol açmakta ve G-quadrupleks tabanlı etiketsiz floresan algılama sistemlerinin temel mekanizmasını oluşturmaktadır (Sun ve ark., 2018). Bu yöntemler DNA dizisinin etiketlenmesine ya da komplike cihazlara ihtiyaç duymadığından avantajlıdır. Ayrıca numuneden doğrudan ölçüme olanak sağlamaktadır. Grup yaptığı bu çalışma sayesinde sütte yer alan tetrasiklin antibiyotiğini tespit edebilmiştir.

Okratoksin A (OTA) molekülünün tespiti için Kefeng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hızlı, hassas ve etiketlemeye ihtiyaç duyulmayan G-quadrupleks tabanlı floresan bir sensör sistemi tasarlanmıştır. Okratoksin A yem ve gıda maddelerini kirleten en yaygın mikotoksinlerden biridir. Et ürünleri, bira, kurutulmuş meyveler, baharatlar gibi birçok yerde bulunan okratoksin insanda nörodejeneratif, karsinojenik etkilere sahip olduğundan tespiti büyük önem taşımaktadır. OTA'ya özgün G-quadrupleks dizisi, guanin nükleotidi açısından zengindir. OTA'ya özgün G-quadrupleks DNA dizisi, ThT boyası ile G-quadrupleks yapısı oluşturarak yüksek

floresan sinyali oluşmasını sağlamaktadır. OTA ortama eklendiğinde G-quadrupleks dizi özgün molekülüne bağlanarak ThT ile oluşturdukları kompleksten ayrılmaktadır. Bu ayrılma floresan sinyalinde önemli bir düşüşe neden olmaktadır. Bu metod sayesinde okratoksin tespiti 10 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanabilmektedir. Ayrıca bu çalışmada gerçek numune sonuçlarının ölçülebilmesi için kırmızı şarapla deneyler yapılmıştır ve OTA'nın tespiti sağlanabilmektedir (Wu ve ark., 2018).

Etanolamin tespiti için Heilkenbrinker ve ark. yaptığı bir çalışmada G-quadrupleks oluşumuna dayanan bir aptasensör geliştirilmiştir. Alzheimer hastalığı, şizofreni gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen etanolamin çok küçük bir organik moleküldür. Bir mikroarray yüzeyine etanolamin bağlayıcı aptamerler immobilize edilmiştir. Etanolamin ile etanolamin bağlayıcı aptamerlere afinite gösteren floresan etiketli oligonükleotitler yüzeye belirli oranlarda eklenmiştir. Floresan etiketli oligonükleotitler etanolamin bağlayıcı aptamerlere bağlandığında G-quadrupleks oluşumu indüklenmekte ve floresan yoğunluğunda artış meydana gelmektedir. Etanolamin konsantrasyonunun artırılması, etanolamin bağlayıcı aptamerler ile floresan etiketli oligonükleotitlerin hibritleşmesinin azalmasına ve dolayısıyla floresan yoğunluğunun azalmasına neden olmuştur. Bu metod sayesinde etanolamin, 10 pM kadar düşük bir deteksiyon limiti ile tespit edilebilmektedir (Heilkenbrinker ve ark., 2014).

Çeşitli araştırmacılar tarafından önerilen ve daha sonra Gilbert tarafından ifade edilen bir hipoteze göre, erken yaşam formlarında genetik bilginin iletiminin RNA'ya dayandığı belirtilmektedir (Gilbert, 1986). RNA molekülünün RNA replikazı enzimine dayalı olmayan metod ile replike edilebilmesi ise araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Enzimatik olmayan RNA kopyalaması aslına uygunluğun düşük olması, yavaş olması ve birden fazla çoğaltma turu elde etmenin zorluğu gibi çeşitli zorluklara sahiptir. Mevcut analiz yöntemleri çoğunlukla denatüre edicidir ve kopyalama işleminde üretilen RNA iplikçığının katlanma kabiliyeti düşmektedir. Yeni sentezlenen RNA zincirinin yapısal bütünlüğü için RNA ipliklerinin katlanma kabiliyeti çok önemlidir bu nedenle daha hassas yeni metodların geliştirilmesi gerekmektedir. Giurgiu ve ark. yaptığı bir çalışma; adenin nükleotidinin floresan analogu olan 2-aminopurini içermektedir. 2-aminopurin, özel bir çözücüye maruz kaldığında floresan hale gelmekte ancak çift sarmallı bir dubleks içine dahil edildiğinde söndürülmektedir (Johnson ve ark., 2012). Bir dubleks kalıp-primer ile başlayarak, K<sup>+</sup> varlığında primerin 3' ucuna iki guanozin

eklenerek paralel bir G-quadrupleks yapısı oluşturulur ve primer kalıptan çıkarılır. Kimyasal RNA replikasyonunun uzun süredir devam eden problemine sistem yaklaşımını kolaylıklar sağlayan bu sistem ile kopyalamanın derecesi gerçek zamanlı olarak ölçülebilecektir. Tasarlanan metot G-quadrupleks oluşumuna dayanmaktadır ve bu nedenle guanin bakımından zengin RNA iplikçikleri oluşturmakla sınırlıdır (Giurgiu ve ark., 2018).

Gümüş (I) iyonları insanlarda sitotoksikite geliştirmektedir ve organ yetmezliği de dâhil bir dizi tıbbi komplikasyonla ilişkilendirilmektedir. Vücuttaki gümüş iyon seviyesi tayini oldukça önemlidir. Man ve ark. sulu çözeltide gümüş (I) iyonu saptamasını gerçekleştirmek için, kloro-platin (II) kompleksi kullanılarak ışığa bazlı bir G-quadrupleks algılama sistemi geliştirilmiştir. Gümüş (I) iyonları G-quadrupleks yapısını kararsızlaştırabildiğinden, G-quadrupleks yapıları dubleks hale geçerek yapısal değişikliğe uğrayabilirler. Oluşan dubleks yapı, kloro-platin (II) kompleksi interkalasyonunu sağlayarak yüksek emisyon yoğunluğuna neden olmaktadır. Bununla birlikte, gümüş (I) iyonu yokluğunda, kloro-platin (II) kompleksinin G-quadrupleks yapı ile zayıf etkileşimi nedeniyle düşük emisyon yoğunluğu görülmektedir. Gümüş dışındaki çeşitli metal iyonlarının eklenmesi üzerine emisyon yoğunluğu hafifçe artmakta ve sistemin gümüş (I) iyonları için seçiciliğine işaret etmektedir (Man ve ark., 2010).

İnsan nötrofil elastazı (HNE), kolajen, proteoglikan, fibronektin ve laminin içeren çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinleri parçalayan bir tip serin proteazdır. HNE vücutta aşırı üretildiğinde normal dokulara zarar verebilmektedir ve bu durum çeşitli otoimmün hastalıkların gelişmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, HNE ile ilişkili hastalıkların teşhisi için doğru bir tespit platformu çok önemlidir. Leung ve ark. tasarladığı bu etiketsiz metotta, sinyal transdüksiyon elemanı olarak G-quadrupleks yapılara özgün floresan özelliği bulunan iridyum (III) kompleksi kullanılmıştır. Bu sistemde, ya sulu bir çözelti içinde ya da HNE aptamerini içeren çift sarmal DNA dizisinin varlığında, iridyum (III) kompleksi floresan özellik göstermemektedir. HNE ilavesiyle birlikte çift sarmal DNA dizilerinin ayrışması indüklenmiştir. HNE aptameri daha sonra serbest bırakılarak G-quadrupleks yapısına katlanmaktadır. UV ışığı altında da kolayca görülebilen arttırılmış bir floresan ışıltama tepkisi, iridyum (III) kompleksinin HNE aptameri ile olan güçlü etkileşimini kanıtlamıştır. HNE konsantrasyonu ile iridyum (III)



kompleksinin floresan yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Tasarlanan metot oligonükleotitlerin kovalent etiketlemesini ortadan kaldırmaktadır, dolayısıyla düşük maliyetli, basit ve kolay kullanıma sahiptir (Leung ve ark., 2013).

### 2.3 Floresan Boyalar

Luminesans olgusu antik çağlardan beri bilinmektedir. Antik zamanlarda elmasların güneşe maruz kaldıklarında karanlıkta birkaç dakika parladıkları fark edilmiştir. Diğer bir luminesans örneği ise farklı mitolojilerde ortaya çıkan parlak solucanlardır (Valeur, 2004). Bunlar tarihi açıdan floresan fenomeninin bilinen ilk örneklerindedir. Floresan ismi 1852 yılında İngiliz fizikçi George Gabriel Stokes tarafından; kalsiyum florür kristallerinin ultraviyole (UV) ışığı altında aydınlatıldığında mavi ışık yaydığına gözlemlenmesinin ardından verilmiştir (Valeur ve Berberan-Santos, 2012). Floresan özellik gösteren canlılar da bulunmaktadır. Özellikle ABD'nin batı kıyısında yaşayan ve floresan özelliklere sahip bir protein olan yeşil floresan proteini (GFP) sentezleyen denizanası çeşidi olan *Aequorea victoria* canlıları buldukları bölgeye mor rengi vermektedirler. Osamu Shimomura, çok sayıda uygulaması sebebiyle moleküler biyolojide devrim yaratan bu proteinin varlığını vurgulayan ilk kişi olmuştur (Locquet ve ark., 2006).

Günümüzde görülen en yaygın floresan uygulamalarından biri, özellikle çok yönlülüğü ve hızı nedeniyle floresan spektroskopisidir. Florometre veya spektrofluorometre olarak da adlandırılabilen floresan spektroskopisi bir numunenin floresan özelliğe sahip olma durumunu analiz eden bir tür elektromanyetik spektroskopi türüdür. Bazı bileşiklerin moleküllerindeki elektronları uyaran ve ışık yaymalarına neden olan, genellikle ultraviyole ışık gibi bir ışık kaynağı kullanımı gerektirir (Jameson, 2014). Bu tekniği kullanarak, ışına sırasında üretilen ışık yayılımını, bir dizi dalga boyu boyunca kaydetmek mümkündür. Bu kayıtlara floresan spektrumları denir. Farklı uyarma dalga boyları için farklı emisyon spektrumlarını ölçmek mümkündür. Bu nedenle, elde edilen uyarma-emisyon matrisleri iki boyuta sahiptir, uyarma dalga boyları ve emisyon dalga boyları. Floresan matrisleri, bir karışımın floresan haritasının çıkarılmasını sağlamakta ve böylece onların karakterizasyonlarının da sağlanmasına yardımcı olmaktadır (Soltzberg ve ark., 2012).

Floresan spektrumları birkaç uyarma dalga boyu için yapıldığında, floresan spektrumlarının yan yana toplanması, saptanan floresan yoğunluklarının üç boyutlu bir gösterimini oluşturmaktadır. Bunlar üç boyutlu floresan spektrumu veya uyarma emisyon matrisi (EEM) olarak adlandırılmaktadır (Johnson ve ark., 1977; Ndou ve Warner, 1991). Üç boyutlu (3D) floresan spektrumları karmaşık numuneleri analiz etmek için güçlü spektroskopi tekniklerinden birisidir. Bu teknik sayesinde emisyon yoğunluğu, uyarma ve emisyon dalga boylarının tüm olası kombinasyonları için ölçülmekte, böylece tek bir üç boyutlu çizimde birçok farklı uyarma ve emisyon spektrumuna karşılık gelen bilgileri özetlemektedir. Üç boyutlu floresan spektroskopisi, nehirler (Baker, 2002), haliçler (Scully ve ark., 2004) ve birçok su ekosistemi gibi multifloforik ortamlardan toplanan numunelerin analizinde kullanılan faydalı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Baker ve Spencer, 2004; Carstea ve ark., 2016). Çeşitli numunelerin toplam floresan özellik gösteren molekül kompozisyonları bilinmediğinden, geniş bir uyarım ve emisyon dalga boyları aralığında bir üç boyutlu floresan spektrumu numunenin bir spektral parmak izinin elde edilmesini mümkün kılmaktadır.

Tek ve çift sarmallı DNA gibi birçok yapısal DNA formunu içeren kompleks karışımların varlığında G-quadrupleks DNA yapılarının özgün olarak tespiti, mevcut bir teknikle mümkün değildir. Porfirin gibi bazı boyaların, G-quadrupleks yapıların varlığında floresan özellik gösterdiği ancak çift sarmal ve tek zincirli DNA yapılarında floresan özellik oluşturmadıkları saptanmıştır. Bu boyalar G-quadrupleks yapıların özgün tespitini sağlamada yardımcı ajanlar olabileceği düşünülmektedir (Arthanari ve ark., 1998).

Floresan boyalar çok çeşitli biyomedikal amaçlar için kullanılmaktadır. Çeşitli ilaçların ve antijenlerin immünokimyasal tespiti floresan boyaların kullanıldığı moleküler araştırmaların küçük bir örneğidirler. Floresan spektroskopisinde gözlemler karanlık bir arka plana karşı yapıldığından, çok çeşitli moleküler araştırmaların ölçümleri için oldukça hassas bir şekilde alınabilmektedir (Lakowicz, 2013).

Floresan yoğunluğu, ışık kaynağının parlaklığı veya dedektörün hassasiyeti gibi cihazdan cihaza değişen faktörlere büyük ölçüde bağlıdır. Bu parametreler yapılan

çalışmalarda sıkı bir şekilde denetlenmeli ve bu sebeplerden dolayı algılama sisteminin hassasiyetinin değişmesine izin verilmemelidir (Demchenko, 2005).

Farklı uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip birçok farklı floresan boyanın varlığı, aynı numunedeki birkaç hedefin çapraz girişim olmadan bir kerede değerlendirilebildiği çok katlı analizlerin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Floresan boyaların bu cazip özelliği nedeniyle, son yıllarda floresan sinyal verme kabiliyetine dayanan algılama sistemlerinin tasarlanmasında sıklıkla kullanım bulmuşlardır (Sun ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2013).

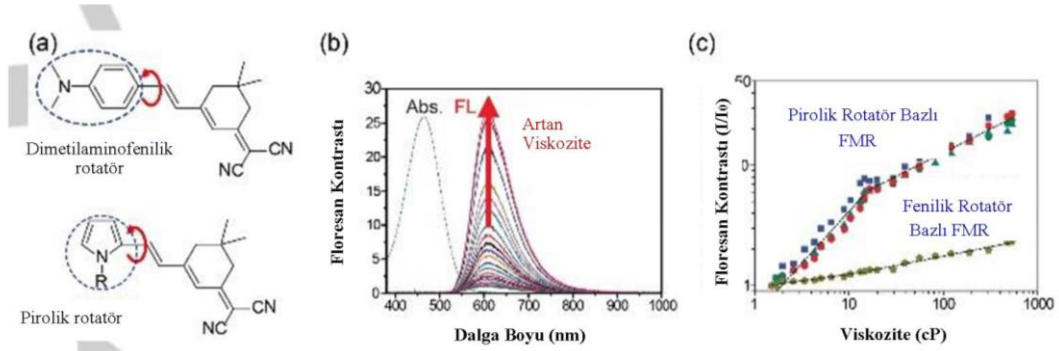
### 2.3.1 Floresan Moleküler Rotorlar

Floresan moleküler rotorlar, florofor olarak adlandırılan  $\pi$ -konjuge bağı içeren floresan molekülleridir. Floresan yoğunluğu, çevresel viskoziteden etkilenen rotatörlerin molekl içi dönme derecesine göre değişmektedir.  $\pi$ -konjuge floresan moleküler rotor köprüsü genellikle elektron verici ve alıcı gruplardan oluşmaktadır.

Floresan moleküler rotorların emisyon özellikleri çoğunlukla çözücüye ve ortama bağlıdır ve bu nedenle de çözücü viskozitesi floresan kuantum veriminin birincil belirleyicisidir (Haidekker ve ark., 2005). Düşük viskoziteli ortamlarda, rotatörlerin hızlı dönüşü, uyarma enerjisinin ışımasız olarak gerçekleşmesini indükler, böylece floresan quantum verimini azaltarak floresan yoğunluğunun baskılanmasıyla sonuçlanmaktadır. Ortam viskozitesi arttığında, rotatörlerin dönüşü kademeli olarak inhibe edilmekte bu da kademeli olarak floresan quantum verimini arttırarak floresan yoğunluğunun artmasını sağlamaktadır. Bu viskoziteye duyarlı davranış, floresan moleküler rotorların akışkanlar mekaniği, polimer kimyası, hücre fizyolojisi ve gıda bilimleri gibi alanlarda viskozite ve sıcaklık problemleri olarak kullanılabilmesini sağlamaktadır (Haidekker ve Theodorakis, 2010).

Floresan moleküler rotorlar, bükülmüş molekl içi yük aktarımı (TICT) yapabilme kabiliyetleri ile karakterize edilen bir floresan molekl grubudur. Doğal olarak bükülmüş halde bulunan bu floresan molekl grubunun yeleri, bükülmüş durumlarından kurtulup çözüldüklerinde floresan özellik göstermektedirler (Klymchenko ve Mely, 2013).

Tipik olarak, bir moleküler rotor üç alt birimden, bir elektron verici ünitesinden, bir elektron kabul ünitesinden ve düzlemsel konformasyonda elektron transferinin gerçekleşmesini sağlayan elektron bakımından zengin  $\pi$ -konjuge bağlantı ünitesinden oluşmaktadır. Bükülmüş hallerinde, içsel floresan sönmüş vaziyette bulunmaktadır, ancak yüksek viskoziteli çözeltilerde olduğu gibi dönüşleri engellendiğinde molekül bükülmüş halden çözülerek ve floresan hale gelmektedir (Beens ve Weller, 1975; Grabowski ve ark., 2003; Klymchenko ve Mely, 2013).



Şekil 2.6: Floresan Moleküler Rotorların Şematik Örnekleri a.) Dimetilaminofenilik ve Pirolik Rotatörlerin Kimyasal Yapısı b.) Çeşitli Yoğunluklarda Floresan Yoğunluğunun Değişimi c.) Farklı Rotatörlerin Değişen Viskozite Koşullarına Göre Floresan Kontrastında Meydana Getirdiği Değişiklikler (Lee ve ark., 2018)

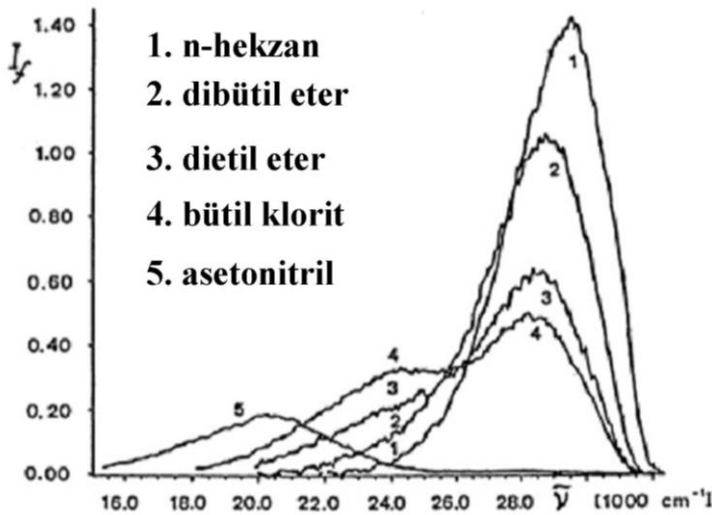
Şekil 2.6.a'da gösterilen floresan moleküler rotorlar elektron vericileri ve alıcıları olan bir  $\pi$ -konjuge köprüsünden oluşmaktadır (siyano grupları). Elektron vericileri olan pirol ve dimetilaminofenil grupları rotatör olarak görev yapmaktadırlar. Viskozite değişimi ile floresan yoğunluğundaki değişikliklerde anahtar rol oynayan  $\pi$ -konjuge köprüsündeki tek C-C bağı boyunca dönerler. Şekil 2.6.b, floresan viskozitesinin bir fonksiyonu olarak floresan yoğunluğu değişikliğini göstermektedir. Ortam viskozitesi arttığında, rotorun dönmesi yavaşladığından floresan yoğunluğu da artmaktadır. Floresan kontrastı ( $I/I_0$ ) burada düşük viskozitedeki floresan yoğunluğuna göre yüksek viskozitedeki floresan yoğunluğunun oranını olarak tanımlanmaktadır. Şekil 2.6.c'de gösterildiği gibi, floresan kontrastı ( $I/I_0$ ) genellikle Förster-Hoffmann teorisini esas almaktadır.

$$\ln (I / I_0) = C + x \ln (\eta)$$

Bu denkleme göre C deneysel bir sabittir, x floresan moleküler rotorun viskozite duyarlılığıdır ve  $\eta$  ortamın viskozitesidir (Haidekker ve Theodorakis, 2016; Kuimova,

2012). Floresan kontrastı, floresan moleküler rotordaki rotatörlerin dönme yeteneğine güçlü bir şekilde bağlıdır. Pirolik rotatörler, a'da gösterildiği gibi dimetilaminofenil bazlı rotatörlerden daha kolay dönebilmektedirler. Şekil 2.6.c'de gösterildiği gibi, pirolük rotator bazlı floresan moleküler rotolar, dimetilaminofenil rotator bazlı floresan moleküler rotordan daha yüksek floresan kontrastı göstermektedir. Bu nedenle rotator seçimi, viskoziteye duyarlı floresan performansını yöneten önemli bir faktördür (Lee ve ark., 2016).

Moleküllerde genel olarak oksidasyon veya redüksiyonla bir elektron kaybedildiğinde veya kazanıldığında yapısal değişikliklerin eşlik ettiği bir dipol momentini oluşmaktadır. Elektriksel olarak uyarılmış haldeki moleküller de ayrıca dipol momentleri oluşturmaktadır ve bir elektron kaybeden ya da kazanan moleküller gibi davranabilmektedirler. Benzer şekilde, tek bir bağ ile bağlanan verici-alıcı moleküller, yapısal esneklikleri nedeniyle, uyarıldıklarında yapısal değişiklikler yaşamaktadırlar (Lee ve ark., 2018). Polar çözücüler ile moleküler rotolar, optik ve/veya elektriksel uyarım tarafından üretilen dipol momentleriyle aktif olarak etkileşime girmektedirler. Öte yandan, kayda değer viskoziteye sahip olan fakat polar olmayan çözücüler, moleküler rotolarla pasif bir şekilde etkileşime girmekte ve rotoların dönüşlerini sınırlamaktadırlar (Köhle ve ark., 1992).



Şekil 2.7: DMABN ile yapılan floresan emisyonu çalışmaları (Köhler ve ark., 1992)

Farklı polaritelere sahip çeşitli solventlerde DMABN'nin floresan emisyon spektrumları. p-N, N-dimetilamino-benzonitrilin (DMABN, Şekil 2.7)'nin hem tek hem de ikili

floresan emisyonu verdiği durumları incelemiştirler. Floresan emisyonunun çözücü polaritesine ve sıcaklığına kuvvetle bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Lippert ve ark., 1961). DMABN'nin polar olmayan solventlerde tek floresan emisyonu, polar solventlerde ise çift floresan emisyonu sergilediğini yaptıkları çalışma ile bildirmişlerdir.

DMABN'nin polarite bağımlı floresan davranışını açıklamak için hidrojen bağlanma (Cazeau ve ark., 1983), proton transferi (Kosower ve Dodiuk, 1976), TICT (Rotkiewicz, Grellmann ve Grabowski, 1973), vericinin ve alıcının yeniden hibridizasyonu (Leinhos ve ark., 1991) ve moleküler planarizasyon (Schuddeboom ve ark., 1992) gibi çeşitli hipotezler önerilmiştir. Bu hipotezler arasında TICT, DMABN'den gelen ikili floresan dinamiklerini tanımlayan en iyi model olarak kabul edilmiştir. TICT uyarılmış durumlarının oluşum oranının, çözücünün polaritesi ile belirlendiğine dikkat edilmelidir. Bu nedenle, DMABN'nin çiftli floresan emisyonu yalnızca belirli çözücülerde meydana gelmektedir. Şekil 2.3 farklı polaritelerdeki çeşitli çözücülerde DMABN'nin floresan emisyon spektrumlarını göstermektedir.

Yoğun araştırmaların ve DMABN'nin floresan emisyon dinamiklerinin iyice anlaşılmasının ardından, TICT aracılığıyla yapısal bükümün eşlik ettiği birçok diğer alıcı-verici moleköl bildirilmiştir (Grabowski, Rotkiewicz ve Siemiarczuk, 1979; Siemiarczuk ve ark., 1977). Polar çözücülerin, hidrojen bağları oluşturarak alıcı-verici moleküllerin TICT uyarılmış hallerini stabilize ettiği bu çalışmaların ardından fikir birliğine varılan görüş olmuştur (Schuddeboom ve ark., 1992).

Benzer Şekilde, çözücünün viskozitesi, alıcı-verici moleküllerde TICT uyarılmış durumun oluşum oranını da etkilemektedir. Ortamın viskozitesi arttıa, tek bağlarının sınırlı olmasına rağmen moleküllerin dönüşü (büküm) engellenmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, alıcı-verici bazlı moleküler rotorlar, çözücü ortamın polaritesinden ve viskozitesinden etkilenen çevre ile etkileşime girerek yapısal değişiklikleri indüklemek için itici güçler üretmektedir. Viskozite algılaması için, çoğu alıcı-verici moleküllerin aksine, moleküler rotorların floresan emisyonu seçici olarak ortam viskozitesine cevap vermeli ve ortam polaritesinden etkilenmemelidir (Haidekker ve ark., 2005; Loutfy ve Law, 1980). Başka bir deyişle, moleküler rotordan floresan salınımının yoğunluğu ve enerjisi yalnızca çözücünün viskozitesinden etkilenmelidir. Bu nedenle, tek bir floresan

emisyonuna sahip moleküler rotorlar, en yaygın kullanılan viskozite sensörleridir, çünkü bu tekli floresan emisyonu, çözücü polaritesinden etkilenmemektedir (Allen ve ark., 2005).

Moleküler rotorların, ortamın polaritesine ve viskozitesine karşı olan hassas duyarlılığı, onların viskozite sensörü problemleri olarak kullanımı uygulamalarını artırmıştır (Hosny ve ark., 2013). Floresan moleküler rotorlar organeller ve mikroakışkan kanallar dâhil olmak üzere çeşitli ortamlarda viskozite sensörleri olarak görev yapabilmektedirler (Lee ve ark., 2018).

### **2.3.2 Floresan Moleküler Rotorların Biyolojik ve Kimyasal Uygulamaları**

Viskozite, hücrelerin temel fizyolojik fonksiyonlarını güçlü bir şekilde etkileyebilen hücresel sıvıların ortak bir özelliğidir. Örneğin, hücre zarı viskozitesi, hücre zarı proteinlerinin aktivitesini ve moleküllerin hücre zarı boyunca difüzyon dinamiklerini yönetilmektedir. Sitoplazmanın viskozitesinin birçok metabolik reaksiyonu etkilediği ve çeşitli hastalık durumlarını yansıtan anormal fizyolojik işlemlerle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Fizyolojik süreçler ve hastalık ilerlemesi hücresel viskozitenin hem zamansal hem de mekânsal değişimini içerdiğinden, mikro viskozitenin doğru şekilde ölçülebilmesi oldukça önemlidir (Demchenko ve ark., 2009; Kowada ve ark., 2015).

Protein içeren kan plazması, dokular arası sıvılar gibi biyolojik sıvılarda viskozite değişiklikleri, çoğunlukla değişen protein seviyeleri ile ilişkili olan çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Haidekker ve Theodorakis, 2007). Bu hastalıklara verilebilecek örnekler arasında enfeksiyonlar ve enfarktüs (Harkness, 1971), hipertansiyon (Letcher ve ark., 1981), diyabet (McMillan, 1982) ve ateroskleroz (Otto ve ark., 2001) bulunmaktadır. Ayrıca sigara tüketimi ile plazma viskozitesinin yükselerek kardiyovasküler hastalıkların artmasına sebep olabileceği de düşünülmektedir (Ernst ve ark., 1987).

Lenfatik sıvının viskozitesi, doğrudan kan plazma viskozitesine bağlıdır, çünkü lenfatik sistem dokuya yayılan sıvıyı ve proteini yakalamakta ve onu damar sistemine geri döndürmektedir. Örneğin lenfatik sıvı viskozitesi meme kanseri tedavisi ile birlikte artmaktadır ve viskozite değişiklikleri akut şok sırasında lenfatik sıvı dolaşımını değiştirmektedir (Bates ve ark., 1993).

Floresan moleküler rotorlar çeşitli ortamlarda viskozite problemleri olarak işlev görebilmektedir (Kotani ve ark., 2017; Lee ve ark., 2011). Viskoziteye duyarlı rotorlar, özgün hücrel organellerin ve biyomoleküllerin mikroviskozitesini ölçerek biyomedikal görüntüleme ve tanı dâhil çeşitli uygulamalarda kullanım için araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Su ve ark., 2017). Bu rotorlar ayrıca mikroakışkan cihazlarda kanal içi viskoziteyi tespit etmek, sıcaklığa duyarlı tepkileri ve cam geçiş sıcaklığı gibi özgün faz geçiş sıcaklıklarını ölçmek için de kullanışlıdır (Lichlyter ve Haidekker, 2009).

Organik aerosoller ilaç endüstrisinde önemli rol oynamaktadırlar. Aerosol parçacıklarının viskozitesi ve fazları; içindeki kimyasal türlerini, parçacık morfolojisini, faz davranışlarını, optik özelliklerini, yaşlanma süreçlerini ve kullanım ömrünü önemli ölçüde etkilemektedir. Bununla birlikte aerosol boyutundaki ve bileşimindeki geniş değişkenlik, aerosollerin doğal fizikokimyasal özelliklerine ilişkin modellerin ve veri yorumlamasının gelişmesini engellemektedir. Bennet ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile farmasötik aerosol damlacıklarının viskozitesi; nem, sıcaklık ve gaz akışının tam olarak kontrol edilebildiği bir çevre odasında floresan moleküler rotorlar kullanılarak ölçülmüştür (Bennet ve ark., 2011).

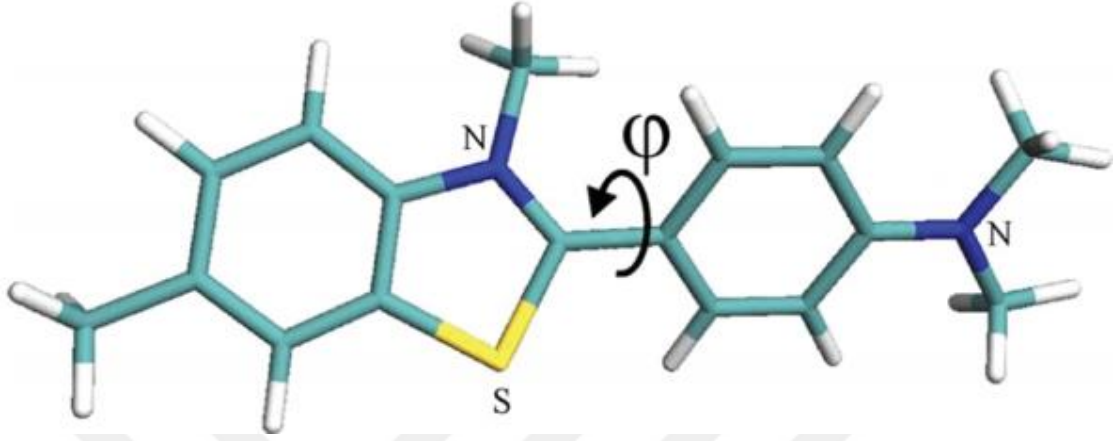
Floresan moleküler rotorlar, *in vivo* ve *in vitro* koşullar altında ve mikroakışkan kanallarda çeşitli organellerde mikro viskoziteyi ölçmek ve görüntülemek için mükemmel bir potansiyele sahiptir (Lee ve ark., 2018). Kümelenme ve polimerizasyon süreçlerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi (Loutfy ve Teegarden, 1983), protein kümelenmesinin ve proteinin konformasyonel değişikliklerinin izlenmesi (Hawe ve ark., 2010), mikro çevre özelliklerinin değişiminin eş zamanlı olarak bilinmesinin kilit bir rol oynadığı siklodekstrinlerin karakterizasyonu (Al-Hassan ve Khanfer, 1998), fosfolipit çift tabakaların ve hücre zarlarının incelenmesi (Haidekker ve ark., 2000) moleküler rotorlar ile yapılan araştırmalardan sadece bazılarıdır.

### 2.3.3 Thioflavin T

Thioflavinler genellikle histolojik boyamalarda ve protein agregasyonlarının biyofiziksel çalışmalarında kullanılan boyalardandır. Thioflavin T (ThT, Basic Yellow 1), hidroklorik asit varlığında metanol ile dehidrotiyotoluidin metilasyonu ile elde edilen bir benzotiyazol tuzudur (Şekil 2.8). Bu boya özellikle geçmişte yaygın olarak



hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak amiloid olarak adlandırılan protein agregatlarının varlığını görselleştirmek ve tespit etmek için kullanılmıştır (Biancalana ve Koide, 2010).



Şekil 2.8: Thioflavin T molekülü modeli (Sulatskaya ve ark., 2010)

ThT 1959 yılında Vassar ve Culling tarafından; doku kesitlerindeki amiloid yapılarla bağlandığında yüksek floresan özellik gösteren katyonik bir benzotiazol boya olarak tanıtılmıştır (Vassar ve Culling, 1959). Yanlış katlanmış proteinlerin agregatı olup amiloid fibril yapılarını oluşturması Alzheimer, Parkinson ve tip 2 diyabet gibi çok çeşitli insan hastalığının altında yatan ortak bir özelliktir (Eisele ve ark., 2015). ThT, amiloid agregatları gibi beta tabaka bakımından zengin yapılarla bağlandığında emisyon spektrumunda karakteristik bir kırmızı kayma ve yüksek oranda artan bir floresan yoğunluk göstermektedir (Groenning, 2010; LeVine, 1999). ThT'nin floresan spektrumunda oluşturduğu bu değişiklik, benzotiazol ve anilin halkalarını birleştiren merkezi C-C bağının rotasyonundan kaynaklanmaktadır (Srivastava ve ark., 2010).

Yirminci yüzyılın başlarında ve ortalarında, amiloidin histolojik tespiti için kumaş endüstrisinde kullanılan koyu kırmızı bir boya olan Kongo kırmızısı sıklıkla kullanılmıştır. Kongo kırmızısı boyama süreci zahmetli bir süreçtir, polarize ışık mikroskobu kullanımını gerektirir ve oluşturduğu piklerin yorumlanması oldukça zordur (Howie ve ark., 2008). Kongo kırmızısı gibi doğrudan boya olduğu düşünülen çoğu boyalar, fibrillere ve fibril olmayan materyallere farklı afinitelerde bağlandığından kullanımları boyama ve ardından yıkama yapılmasını gerektirmektedir, bu da düşük düzeyde tekrarlanabilirliğin yanı sıra önemli düzeyde arka plan boyamasına yol açmaktadır. Bunun tersine, ThT gibi boyalar, sadece belirli bir moleküler varlığa

bağlandıklarında yüksek oranda floresan hale gelirler ve bu nedenle hücrenel bileşenleri ve yapıları saptamak için yüksek hassasiyetli ve uygun boyalar olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Elghetany ve Saleem, 1988).

ThT amiloid fibrillere bağlanma özgünlüğünden dolayı floresan mikroskopi kullanılarak doku kesitlerinde amiloid tanısı (Hobbs ve Morgan, 1963; Keliényı, 1967), floresan spektroskopisi kullanılarak *in vitro* amiloid yapılarının tespiti, amiloid fibril oluşumunun doğrudan gözlemlenmesi ve beyin dokusundaki beta amiloid yapılarının *in vivo* olarak incelenmesi gibi alanlarda sıkça çalışılan bir boya olmuştur (Klunk ve ark., 2001; LeVine, 1999; Naiki, ve ark., 1989; Vassar ve Culling, 1959). Ancak ThT, amiloid yapıları için tam olarak özgün değildir. Belirli ortam şartlarına bağlı olarak ThT; prekürsör monomerlere, küçük oligomerlere, yüksek beta tabaka içeriğine sahip agregat halinde olmayan materyallere veya hatta alfa heliks açısından zengin proteinlere bağlanarak spektroskopik olarak bir değişikliğe sebep olabilir (Wolfe ve ark., 2010) veya olmayabilir (LeVine, 1999; Cloe ve ark., 2011).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar ile ThT'nin çift zincirli DNA yapısına bağlanarak yaklaşık 250 katlanma geçirdiği G-quadrupleks yapılarına bağlanarak ise 1700'den fazla katlanma geçirdiği ve bu sayede çok daha fazla floresan yoğunluğu oluşumuna sebep olduğu anlaşılmıştır (Mohanty ve ark., 2012). Ayrıca Mergny ve grubu ThT'nin floresan sinyalinde oluşturduğu oldukça yüksek değişiklik sayesinde G-quadrupleks oluşumunun tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Çünkü ThT'nin yüksek floresan özellik göstermesi ortamda G-quadrupleks oluşturacak yapıların varlığını da yüksek olasılıkla göstermektedir. Wang ve arkadaşları; ThT'ye özgü aptamer tasarlayan ilk gruptur (Wang ve ark., 2016).

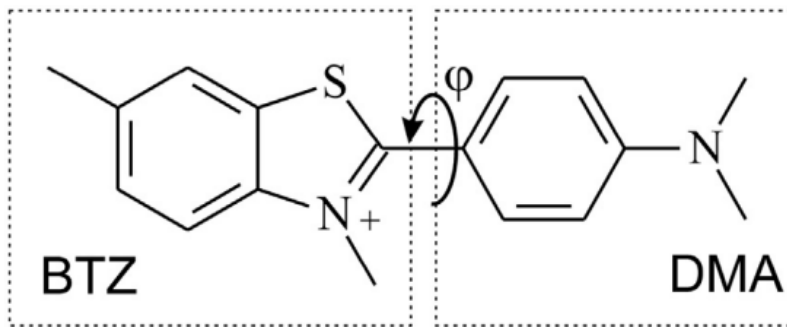
Şimdiye kadar ThT-G-quadrupleks kompleksi oluşumunun floresan yoğunluğunda meydana getirdiği değişiklik esasına dayanan metot ile protein (Liu ve ark., 2015) , RNA metabolizması (Sugimoto ve ark., 2015) , nükleik asit (Tong ve ark., 2013) , biyotiyol (Tan ve ark., 2014) ve cıva iyonu (Ge ve ark., 2014) gibi birçok farklı analite özgü floresan prob tasarlanarak bu analitlerin ölçümü gösterilmiştir.

ThT guanin nükleotidi bakımından zengin oligonükleotit sekanslarının G-quadrupleks yapı oluşturmasını indükleyerek floresan özellik kazanarak yüksek bir floresan ışımaya sebep olmaktadır (Zhao ve ark., 2014). G-quadrupleks yapılarına bağlanan boyaların çoğu

tek ve çift zincirli DNA yapılarına da bağlanarak G-quadrupleks yapıya özgün olarak kullanılmadığından G-quadrupleks yapıya özgün boya ya da ligandlara duyulan ihtiyaç artmıştır. ThT gibi G-quadrupleks yapıya özgün boyalar ile G-quadrupleks yapı oluşumu indüklenip stabilize edilerek *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda G-quadrupleks yapıların tespiti sağlanabilmiştir (Lubitz ve ark., 2010; Müller ve ark., 2010; Yang ve ark. 2009).

ThT'nin floresan spektrum aralıkları, 425 nm uyarma ve 490 nm emisyon dalga boyları arasındadır. Genel floresan malzemelerle uyumlu spektrum aralıklarına sahiptir ve kendiliğinden floresan olmayıp bazı yapılara bağlandığında floresan özellik kazanmaktadır. Özellikle de ucuz maliyetli olması bakımından hem amiloid fibriller hem de G-quadrupleks yapılar için tasarlanan floresan problarda çok sık başvurulan boyalardan birisidir. ThT tabanlı algılama yöntemleri; ucuz maliyet, suda çözünürlük, kullanım kolaylığı, hassas ve hızlı tespit ve nispeten daha az çalışılmış olması gibi etkenlerden ötürü sıklıkla kullanılmaktadır (Ma ve ark., 2016)

ThT, yüksek beta tabaka içeriğine sahip protein agregatlarına veya G-quadrupleks yapıları gibi özgün olduğu moleküller ile etkileşime girdikten sonra floresan kuantum veriminde yüksek bir artış oluşturmaktadır (LeVine, 1999). Yapılan çalışmalar ThT'nin fotofiziksel özelliklerinin floresan moleküler rotor modeline uyduğunu ve boyanın uyarılmış durumunun devre dışı bırakılmasının ya floresandan sorumlu radyasyon geçişi yoluyla ya da TICT bağlı olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Stsiapura ve ark., 2008; Valeur ve Berberan-Santos, 2012).



Şekil 2.9: ThT TICT modeli (Gogoleva ve ark., 2018)

ThT'deki TICT işlemi, dimetilaminin kısmına bağlı bulunan benzotriazol kısmının iç rotasyonunu içermektedir (Şekil 2.9). Bu rotasyonun hızı, ThT mikro-ortamının viskozitesine bağlıdır. Düşük viskoziteli ortamlarda, TICT işleminin oranı, çok

yüksektir ve foto-uyarılmış ThT'nin devre dışı bırakılması, temel olarak floresan yoğunluğunun azaltılmasıyla sonuçlanan ışınım yapmayan yoldan gerçekleşmektedir. Yüksek viskoziteli ortamlarda veya amiloidler ve G-quadrupleksler gibi bazı yapılara bağlandığında, TICT işleminin hızı önemli ölçüde azalmaktadır ve floresan yoğunluğunun dramatik bir şekilde artmasını sağlayan radyatif geçiş, uyarılmış durumun deaktivasyonu için ana yol haline gelmektedir (Amdursky ve Huppert, 2012; Gogoleva ve ark., 2018; Stsiapura ve ark., 2008).

DCVJ (Lindgren ve ark., 2005), Auramin O (Amdursky ve Huppert, 2012), Michler'in Hydrol Mavisi (Kitts ve ark., 2011), PicoGreen (Mora ve ark., 2016), BODIPY bazlı boyalar (Ono ve ark., 2012) gibi birçok boya moleküler rotor motifine uygun davranışlar sergilemektedirler.

ThT'nin ışınım yapıp sönebilen floresan düzenlemesi; siklodekstrin (Raj ve Ramaraj, 1999), polimer membranlar (Raj ve Ramaraj, 2001), SDS miseller (Kumar ve ark., 2008), *para*-sülfonatocaliks[4]arene (Saravanan, 2018) ve yakın zamanda gösterildiği gibi gözenekli silikon ile indüklenebilmektedir (Hutter ve ark., 2011).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyal**

Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler; Trizma Hidroklorit (RDD009), Thioflavin T (T3516), Manganez (II) Klorür Tetrahidrat (221279), Nikel (II) Klorür (N6136), Lityum Klorür (793620), Çinko (II) Klorür (793523), Amonyum Klorür (A4514), Kalsiyum (II) Klorür Dihidrat (31307), Sodyum Klorür (71376), Magnezyum (II) Klorür Hekzahidrat (13152), Potasyum Klorür (12636), Bakır (II) Klorür (222011), Sezyum Klorür (C4036) Sigma Aldrich firmasından, Demir (II) Klorür Tetrahidrat (2000431 803) ise Merck Millipore firmasından temin edildi. Deney malzemelerinin hazırlanmasında ve ölçümlerin alınmasında gerekli olan Vortex (Scilogex MX-S), Manyetik Karıştırıcı (Scilogex MS-H280-Pro), Jel Görüntüleme Cihazı (Biorad, ChemiDoc MP), Hassas Terazı (Highland, HCB1002), Buz Makinası (Hoshizaki, FM80EE), pH metre (İnolab Ph7110), Çeker Ocak (Hedlab), UV Spektrofotometre (Shimadzu 1800) ve Florimetre cihazı (F7100 Hitachi, Japan) cihazları kullanıldı.

Deneylerde kullanılan 5'- GGG TTA GGG TTA GGG TAG GG -3' nükleotit dizilimine sahip G-quadrupleks DNA Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, USA) şirketinden HPLC ile saflaştırılmış biçimde temin edildi.

#### **3.2 Metot**

##### **3.2.1 Floresan Ölçümleri**

Floresan yoğunluğunu ölçmek için F7100 (Hitachi, Japan) Florimetre cihazı kullanıldı. Uyarma (eksitasyon) 425 nm, toplama (emisyon) aralığı ise 450-600 nm'dir. Yarı genişlikleri 10 nm, gerilim miktarı ise 400 V olarak kullanıldı.

##### **3.2.2 Tampon Çözelti, ThT ve G-quadrupleks DNA Stoklarının Hazırlanması**

Deney boyunca kullanılan tampon çözelti 5 mM Trizma-HCl'dir. 5 mM, 2x olacak şekilde Trizma-HCl tartılıp distile su ile tamamen çözündükten sonra pH ölçümü yapıldı ve pH 7.0'ye ayarlandı. Tüm çalışmalarda da bu tampon çözelti kullanıldı. ThT ana stoğu 100 µM stok olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlandı. G-quadrupleks

DNA 100  $\mu\text{M}$  stok olacak şekilde 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik çaplara sahip filtre ile filtrelenmiş distile suda çözülerek hazırlandı.

### 3.2.3 Uygulanabilirlik Çalışması

Tasarlanan floresan algılama sisteminin uygulanabilirlik çalışması için 4 örnek hazırlandı. Her örneğe 2x tampon çözeltilerden 500  $\mu\text{L}$  eklendi. İlk tüpe 10  $\mu\text{M}$  ThT için 100  $\mu\text{M}$ 'lık ThT stoğundan 10  $\mu\text{L}$  ThT eklendi. İkinci tüpe yine aynı miktarda ThT ve 10  $\mu\text{M}$  bakır (II) iyonu için 100  $\mu\text{M}$ 'lık bakır (II) iyonu stoğundan 10  $\mu\text{L}$  eklendi. Üçüncü tüpe aynı miktarda ThT ve 200 nM G-quadrupleks DNA için 10  $\mu\text{M}$ 'lık ara stoktan 20  $\mu\text{L}$  eklendi. Son tüpe diğer tüplerde kullanılan miktarlarda ThT, G-quadrupleks DNA ve bakır (II) iyonu eklendi. Kalan hacimler distile su ile 1 mL'ye tamamlandı.

### 3.2.4 ThT Optimizasyonu

Tüm deneysel çalışmalar boyunca bütün ölçümlerde son hacim her bir örnek için 1'er mL olacak şekilde tasarlandı, hesaplamalar bu doğrultuda yapıldı ve 1,5 mL'lik tüpler kullanıldı.

Her tüpe 2x tampon çözeltilerden 500  $\mu\text{L}$  eklendi. 200 nM G-quadrupleks DNA her tüpe sabit olarak kullanıldı ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık ara stoktan her tüpe 20  $\mu\text{L}$  eklendi. 0 ve 15  $\mu\text{M}$  değerleri arasındaki ThT için 100  $\mu\text{M}$ 'lık ThT ara stoğundan tüplere sırasıyla 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15  $\mu\text{L}$  ThT eklendi. Son hacimler ise ThT eklendikten sonra distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Devam eden tüm deneylerde tampon çözelti, G-quadrupleks DNA ve ThT (seçilen optimum miktar) bu oranlarda kullanıldı ve deney şartları değiştirilmedi. Deneyler üç tekrarlı olarak hazırlandı ve florimetre cihazı aracılığıyla ölçümler alındı.

### 3.2.5 Bakır (II) iyonu ile Floresan Sönümlenme Deneyi

Tampon çözelti, G-quadrupleks DNA ve ThT gerekli miktarlarda her tüp için sabit olarak eklendi. 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 - 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu için 100  $\mu\text{M}$  stoğundan, 1,25 - 1,5 - 1,75 - 2 - 2,25 - 2,5 - 2,75 - 3 - 3,25 - 3,5 - 3,75 - 4 - 4,25 - 4,5 - 4,75 - 5 - 5,25 - 5,5 - 5,75 - 6 - 6,25 - 6,5 - 6,75 - 7 - 7,25 - 7,5 - 7,75 - 8 - 8,25 - 8,5 - 8,75 - 9 - 9,25 - 9,5 - 9,75 - 10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 35 - 40 - 45 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu için 1 mM bakır (II) iyonu stoğundan gereken

miktarlarda tüplere eklendi ve kalan hacimler 1 mL'ye distile su ile tamamlandı. Her bakır (II) konsantrasyonu için 3'er tüp hazırlandı ve florimetre cihazı ile ölçümleri alındı.

### **3.2.6 Bakır (II) İyonu Seçicilik Deneyi**

Tampon çözelti, G-quadrupleks DNA ve ThT gerekli miktarlarda her tüp için sabit olarak eklendi. Bakır (II) iyonunun analogu olan manganez (II) klorür, lityum klorür, amonyum klorür, çinko (II) klorür, sodyum klorür, potasyum klorür, sezyum klorür, magnezyum (II) klorür heksahidrat, kalsiyum (II) klorür dihidrat, demir (II) klorür tetrahidrat, baryum (II) klorür ve nikel (II) klorür iyonlarının her biri için 1 mM ve 100  $\mu$ M'lık stoklar hazırlandı. Bakır (II) iyonu ile floresan sönümlenme deneyinde olduğu gibi 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 - 1  $\mu$ M konsantrasyonlarında iyon için 100  $\mu$ M iyon stoğundan, 1,25 - 1,5 - 1,75 - 2 - 2,25 - 2,5 - 2,75 - 3 - 3,25 - 3,5 - 3,75 - 4 - 4,25 - 4,5 - 4,75 - 5 - 5,25 - 5,5 - 5,75 - 6 - 6,25 - 6,5 - 6,75 - 7 - 7,25 - 7,5 - 7,75 - 8 - 8,25 - 8,5 - 8,75 - 9 - 9,25 - 9,5 - 9,75 - 10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 35 - 40 - 45 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100  $\mu$ M konsantrasyonlarında iyon için 1 mM iyon stoğundan gereken miktarlarda tüplere eklendi ve kalan hacimler 1 mL'ye distile su ile tamamlandı. Her iyon için 0-100  $\mu$ M arasındaki konsantrasyonlar için 3'er tüp hazırlandı ve florimetre cihazı ile ölçümleri alındı.

### **3.2.7 Bakır (II) İyonu ile Yarışmalı Seçicilik Deneyi**

G-quadrupleks DNA, ThT ve tampon çözelti deneylerin hepsinde kullanılan standart miktarlarda tüplere eklendi. Bakır (II) iyonu her tüpte 4  $\mu$ M olacak şekilde eklendi. Ardından her bir bakır (II) iyonu analogu iyon 40  $\mu$ M olacak şekilde ayrı ayrı tüplere eklendi. İçerisinde hiç iyon bulunmayan bir set de ayrıca hazırlandı ve tüm iyon konsantrasyonları için 3 tekrarlı setler halinde hazırlandı. Florimetre cihazı ile ölçümler alındı.

### **3.2.8 Üç Boyutlu Floresan Ölçümü**

ThT, G-quadrupleks DNA, bakır (II), ThT-G-quadrupleks DNA, ThT-bakır (II), G-quadrupleks DNA-bakır(II) ve ThT-G-quadrupleks DNA-bakır(II)'ın deneylerde kullanılan oranları ile 7 tüp hazırlandı. Her bir tüp için florimetre cihazında 700-250 nm

uyarma ve 760-240 nm emisyon dalga boyları arasında, 10 nm yarı genişlikleri, 400 V gerilim miktarı ve 12.000 nm/dk tarama hızı ile üç boyutlu ölçüm alındı.

### **3.2.9 Geri Kazanım Deneyi**

Karaman şebeke sularından alınan 2 numune ile 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda bakır (II) iyonu hazırlandı. Deneyde standart olarak kullanılan ThT, G-quadrupleks DNA, tampon çözelti her tüpe gereken miktarda eklendi. 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 -1  $\mu\text{M}$  arası konsantrasyonlar için her su örneğinden sırasıyla 2 – 4 – 6 – 8 10  $\mu\text{L}$  bakır (II) iyonu tüplere eklendi. Kalan hacim 1 mL'ye distile su ile tamamlandı. Florimetre cihazında ölçümleri alındı.

### **3.2.10 UV Spektral Tarama Deneyi**

G-quadrupleks DNA dizisi ve ThT kompleksinde bakır (II) iyonu konsantrasyonu arttıkça meydana gelen değişikliklerin UV Spektral ölçümleri alındı. Bu çalışmada deneylerde kullanılan G-quadrupleks DNA, bakır (II) iyonu ve ThT ile her biri için ayrı ayrı tüpler hazırlandı. Ardından ThT-G-quadrupleks kompleksi içeren tüpler hazırlandı ve 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu bu kompleksin bulunduğu tüplere ayrı ayrı eklendi. Baseline olarak deneylerde kullanılan 5 mM Tris-HCl (pH 7.0) tampon çözeltisi kullanılarak UV spektrofotometresi ile ölçümler alındı.

### **3.2.11 Floresan Sönümlenme Görüntüleme Deneyi**

Bakır (II) iyonlarının ortamda çeşitli konsantrasyonlarda bulunması ile floresan yoğunluğunda oluşan değişikliğin renkli olarak görüntülerinin elde edilmesi için 6 farklı bakır (II) iyonu konsantrasyonu için jel elektroforez görüntüleme cihazında görüntüler alındı. Bu çalışma için G-quadrupleks DNA dizisi ve ThT deneylerde kullanılan miktarlarda 6 tüpe eklendi ve 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu tüplere eklendi. İçerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan bir tüp de kontrol olarak hazırlandı ve Gel Image Analysis cihazında ThT için en yakın dalga boyu aralıklarına sahip olan 480 nm uyarma ve 510 nm emisyon aralıklarına sahip metot ile görüntü analizi yapıldı.

### **3.2.12 Jel Görüntüleme Deneyi**

Jel görüntüleme deneyi için 50 mL % 5 konsantrasyonunda agaroz jel hazırlandı. Jelin hazırlanması için 2,5 gram agaroz tartılıp ve 50 mL TBE (%5) tampon çözeltisi

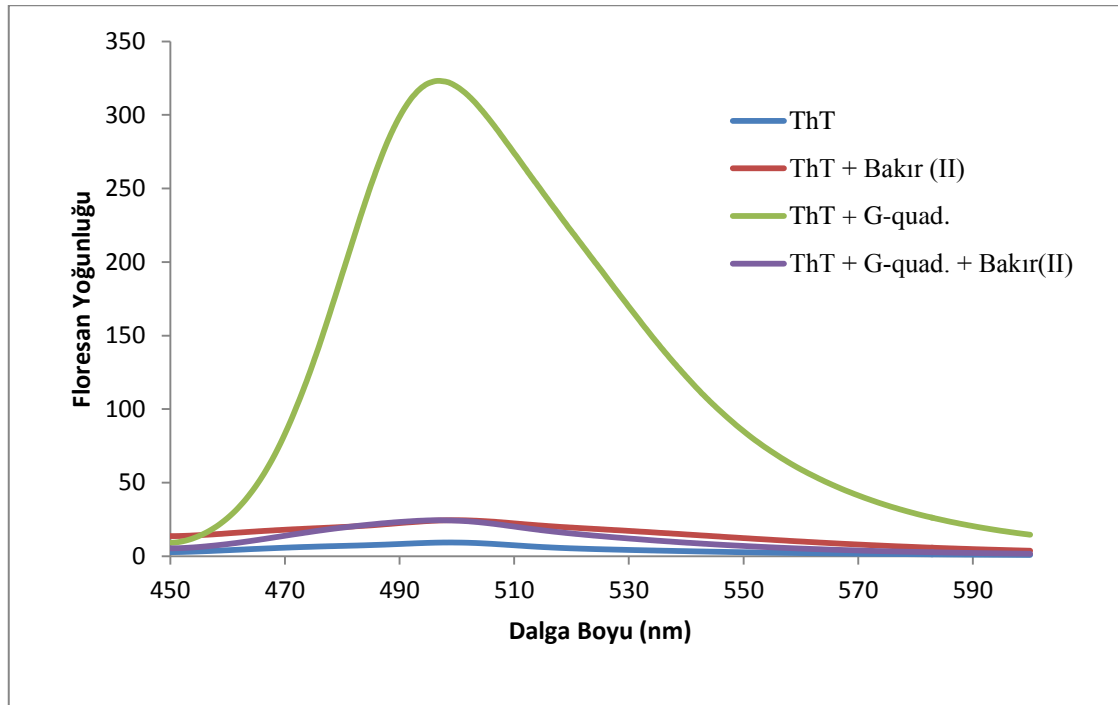


içerisine eklenerek mikrodalga fırında eritildi. Eritilip kaynama derecesine gelen jel mikrodalga fırından çıkarıldıktan bir dakika sonra çeker ocağa alındı ve içerisine 5 µL ethidium bromide eklendi. Karıştırılarak yavaşça jel tankına kondu. Jel donduktan sonra jel yürütme tankına alındı ve tanka % 0,5 TBE tampon çözelti eklendi. Jeldeki kuyucuklardan ilkinde DNA cetveli yüklendi. Her kuyucuğa eklenecek örnek için 1 µL yürütme boyası bir parafin üzerine spotlandı ve tüm örnekler bununla pipetleme yapılarak yüklendi. Deneylerde kullanılan oran olan 200 nM G-quadrupleks dizi kullanıldı. ThT 7 µM ve floresan sönümlenmenin sağlandığı bir bakır (II) konsantrasyonu olan 10 µM bakır (II) iyonu kuyucuklarda kullanılan miktarlar oldu. İkinci kuyucuğa deneyde kullanılan G-quadrupleks DNA miktarı yüklendi. Üçüncü kuyucuğa aynı DNA miktarı ile deneyde kullanılan ThT miktarı eklenerek yüklendi. Dördüncü kuyucuğa G-quadrupleks DNA ile 10 µM bakır(II) (1mM'lık stoktan 10 µL) yüklendi. Beşinci kuyucuğa ise ThT-G-quadrupleks DNA-bakır(II) kombinasyonu yüklendi. Altıncı ve son kuyucuğa ise loading dye 1 µL eklendi ve 10 dakikada bir görüntü alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Uygulanabilirlik Çalışması

Tasarlanan metodun teoride olduğu gibi pratikte de uygulanabilirliğinin görülebilmesi için öncül bir çalışma yapıldı. Bu çalışmada literatürden elde edilen bilgiler ışığında ThT, G-quadrupleks DNA dizisi ve bakır (II) iyonları için kullanılabilirlik ortalaması konsantrasyonlar tercih edildi.

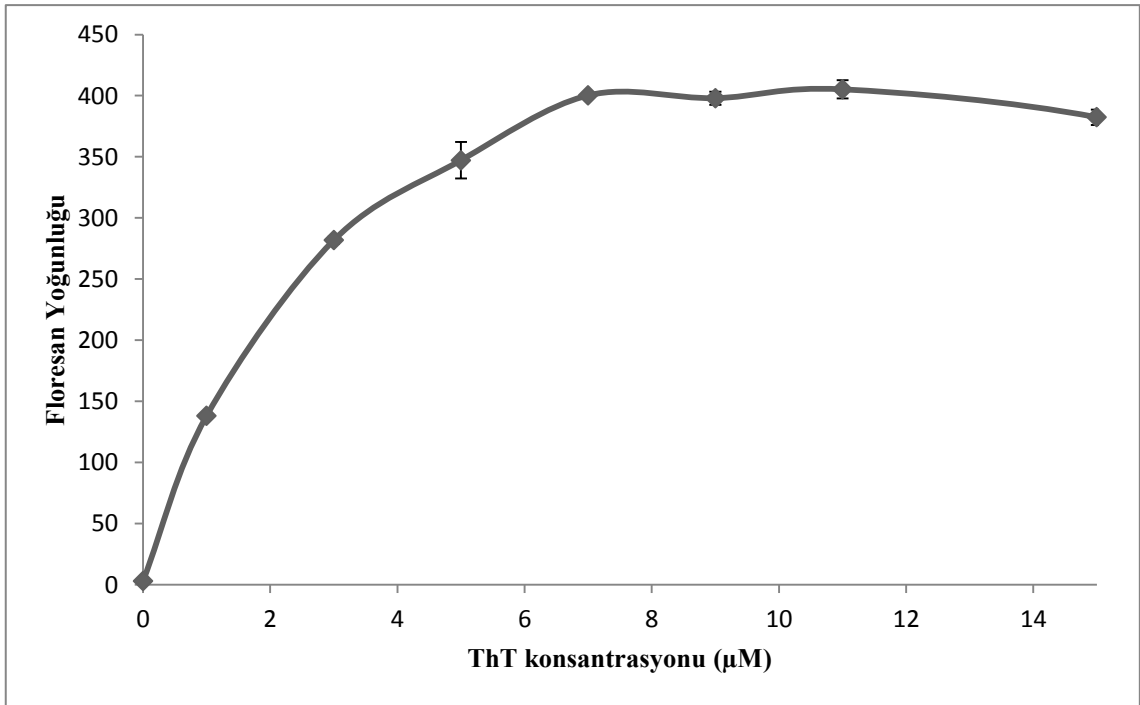


Şekil 4. 1: Tasarlanan Algılama Metodunun Uygulanabilirlik Ölçümü

Şekil 4.1'de açıkça görüldüğü gibi ThT kendiliğinden floresan özelliğe sahip değildir. Bakır (II) iyonlarıyla bir araya geldiğinde de yine floresan özellikten söz etmek mümkün değildir. Fakat ThT ve G-quadrupleks DNA bir araya geldiğinde floresan yoğunluğunda çok yüksek bir artışa neden olmaktadır. Bu artış 495 nm dalga boyunda maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Bakır (II) iyonları ortamda bulunduğu ise bu floresan yoğunluk sönümlenmekte ve yine floresan özellik ortadan kalkmaktadır.

## 4.2 ThT Optimizasyonu

ThT optimizasyonu deneyi yapıldıktan ve florimetre cihazı ile ölçümleri alındıktan sonra FL Solutions spektrofotometre programı aracılığıyla deney verileri elde edildi ve 0-15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ThT'nin floresan spektrumunda meydana getirdiği değişikliğin görülebilmesi için 495 nm dalga boyunda elde edilen maksimum floresan yoğunluğu değerleri ile Şekil 4.2'de yer alan grafik oluşturuldu.

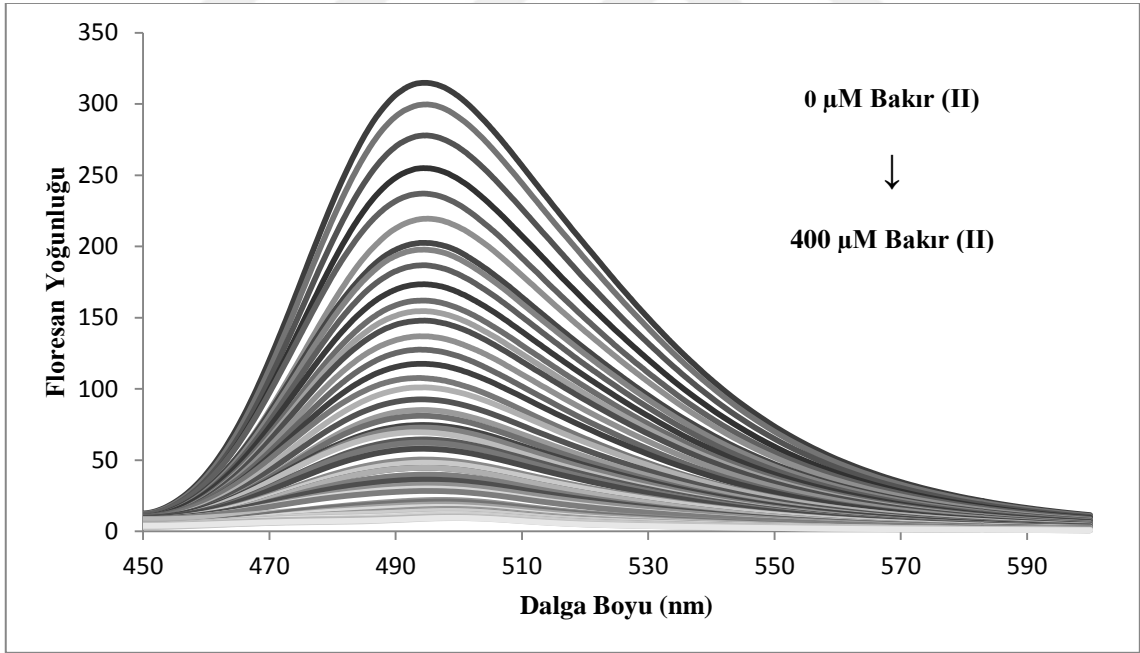


Şekil 4. 2: Artırılan ThT Konsantrasyonları İle Floresan Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişim

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 200 nM G-quadrupleks DNA dizisi varlığında, ThT miktarı arttıkça floresan yoğunluğu da başta arttı, ardından 7-15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasında birbirlerine çok yakın bir şekilde ilerledi. ThT'nin 7  $\mu\text{M}$  ve sonraki konsantrasyonlarda bağlanabildiği maksimum G-quadrupleks diziye bağlanarak ortamda daha fazla ThT'nin olması durumunda dahi belirli bir absorbans sonucundan fazlasının alınamadığı görüldü. Buradan hareketle ThT ile maksimum floresan yoğunluğunu yakalanabildiği 7  $\mu\text{M}$  ThT konsantrasyonu, takip eden tüm deneylerde kullanılmak üzere seçilen ThT konsantrasyonu oldu.

### 4.3 Bakır(II) İyonu ile Floresan Sönümlenme Deneyi

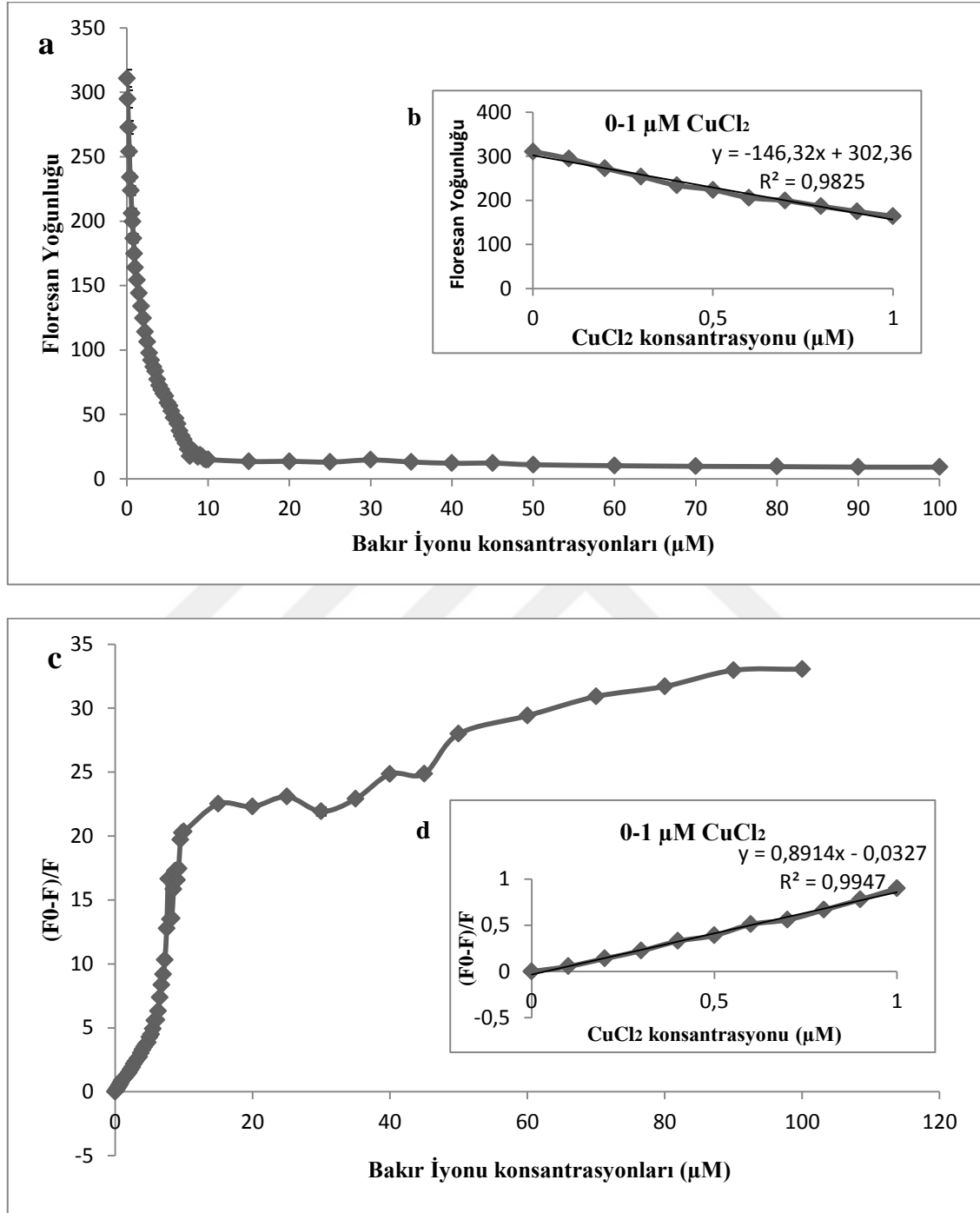
Uygulanabilirlik çalışması başarılı olduktan ve en yüksek floresan sinyalinin alınabildiği ThT konsantrasyonu belirlendikten sonra farklı bakır (II) iyonu konsantrasyonlarında floresan yoğunluğunda oluşan değişimin görülmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda metot kısmında belirtilen aralıklarda farklı konsantrasyonlarla 0-100  $\mu\text{M}$  arasında bakır (II) iyonu ile çalışma yapıldı ve Şekil 4.3'te görülen grafik elde edildi. Bu grafik yardımıyla 495 nm dalga boyunda en yüksek floresan yoğunluğunun elde edildiği ve bu dalga boyundan düşük ya da yüksek dalga boylarında floresan yoğunluğunun giderek azaldığı görüldü. Takip eden çalışmalarda da floresan yoğunluğu değerleri incelenirken 495 nm dalga boyundaki maksimum yoğunluk değerleri esas alındı. Ayrıca bu grafikte çok düşük konsantrasyonlarda bakır (II) iyonu ile bile floresan yoğunluğunda düşüşlerin meydana geldiği açıkça bellidir. Bu düşüşlerin anlamlı bir düşüş oluşturması halinde tasarlanan sistemin başarısının daha net görülebileceği anlaşıldı.



Şekil 4. 3: Floresan Yoğunluğunun 0-100  $\mu\text{M}$  Arasındaki Bakır (II) İyonlarıyla Değişimi

Floresan sönümlenmenin daha net bir sayısal grafikte görülebilmesi için 495 nm dalga boyunda maksimum floresan yoğunluğu sonuçlarıyla Şekil 4.4'te yer alan grafikler elde edildi. Şekil 4.4.b ve 4.4.d grafikleri 0 ile 1  $\mu\text{M}$  arasındaki düşük konsantrasyon

aralıklarında bakır (II) iyonunun ölçülmesine dayanan standart eğri grafikleri ve denklemleri içermektedir.



Şekil 4. 4: Farklı Bakır (II) İyonu Konsantrasyonlarında Floresan Yoğunluğunda Oluşan Değişim (a) 0-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonunun floresan yoğunluğunda oluşturduğu değişim (b) 0-1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonunun floresan yoğunluğunda oluşturduğu değişimle elde edilen standart grafik (c) 0-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonunun floresan yoğunluğunu değiştirme oranı (d) 0-1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonunun floresan yoğunluğunu değiştirme oranıyla elde edilen standart grafik

Tasarlanan algılama sisteminin bakır (II) iyonlarına özgün hassasiyetinin tespit edilebilmesi için 0 ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlar arasındaki artış 0,1  $\mu\text{M}$ , 1 ve 10  $\mu\text{M}$  arası artış 0,25  $\mu\text{M}$ , 10 ve 50  $\mu\text{M}$  arası artış 5  $\mu\text{M}$  ve 50-100  $\mu\text{M}$  arası artış 10  $\mu\text{M}$  kadar olacak şekilde bakır (II) iyonları konsantrasyonları birbirlerine çok yakın aralıklarla seçildi. Şekil 4.4.a'da görüldüğü üzere yaklaşık 8  $\mu\text{M}$  bakır (II) ile dahi floresan sönümlenme neredeyse tamamlandı ve sonraki konsantrasyonlar için de artık herhangi bir floresan özellikten söz edilmesine olanak kalmadı. Bakır (II) iyonları ortama eklendiğinde G-quadrupleks DNA dizisi, özgün olduğu ve çok yüksek afinite gösterdiği bakır (II) iyonlarına bağlanmak üzere ThT ile oluşturmuş olduğu G-quadrupleks yapısından ayrılır. Bu ayrılma ThT'nin G-quadrupleks yapıdan ayrılarak serbest kalmasına, floresan kuantum verimini düşürmesine ve floresan yoğunluğunun sönümlenmesine neden olmaktadır. Her bakır (II) iyonu konsantrasyonu değişiminde floresan yoğunluğunda sönümlenmesi ve 8  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda floresan sönümlenmenin tamamlanması, tasarlanan algılama sisteminin bakır (II) iyonuna özgün hassasiyetini açıkça gösterir.

Bakır (II) iyonu konsantrasyonunun artması ile floresan yoğunluğunda meydana gelen değişimin daha rahat anlaşılabilmesi için Şekil 4.4.c'de görülen  $(F_0-F)/F$  grafiği de ayrıca çizildi. Burada  $F_0$  değeri içerisinde hiç bakır iyonu bulunmayan tüplerdeki floresan yoğunluğu değeridir.  $F$  değeri ise içerisinde bakır iyonu bulunan tüplerdeki floresan yoğunluğu değerleridir. Bu değerler her bir bakır konsantrasyonu için ayrı ayrı hesaplandı.  $F_0-F$  değeri ile floresan miktarında meydana gelen değişim görüldü. Ardından her konsantrasyonun  $F_0-F$  değeri kendi  $F$  miktarına bölünerek bu değişimin floresan yoğunluğuna oranı ile floresan sönümlenme oranının artış miktarı hesaplandı. Her iki grafik içerisine de standart eğri oluşturulabilecek minimum değerler (0-1  $\mu\text{M}$  arası) ile ayrıca küçük grafikler de gösterildi. Bakır (II) iyonları, Şekil 4.4.b ve 4.4.d grafiklerinden de anlaşılacağı üzere, 0 ve 1  $\mu\text{M}$  arasındaki 0,1  $\mu\text{M}$ 'lık küçük konsantrasyon değişimleri bile floresan sönümlenmesinde önemli artışlar sağladı.

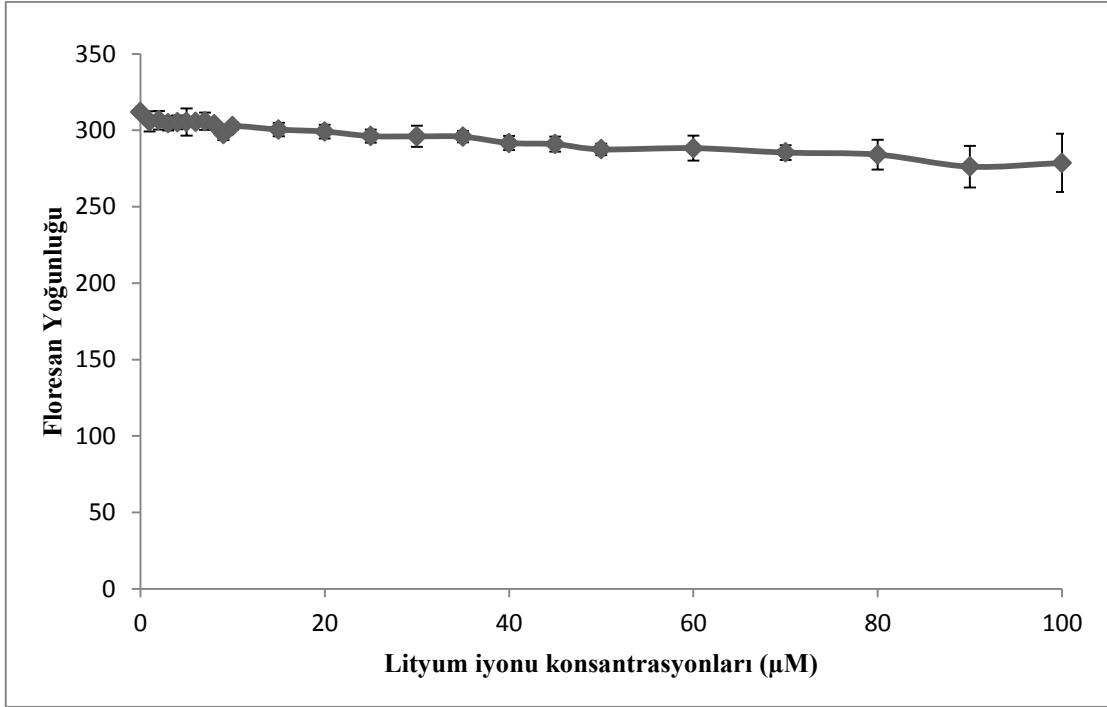
Elde edilen standart grafiklerin denklemleri her iki grafik türü için aşağıdaki şekildedir.

a.)  $y = -146,32x + 302,36$   $R^2 = 0,9825$  → Şekil 4.3.b

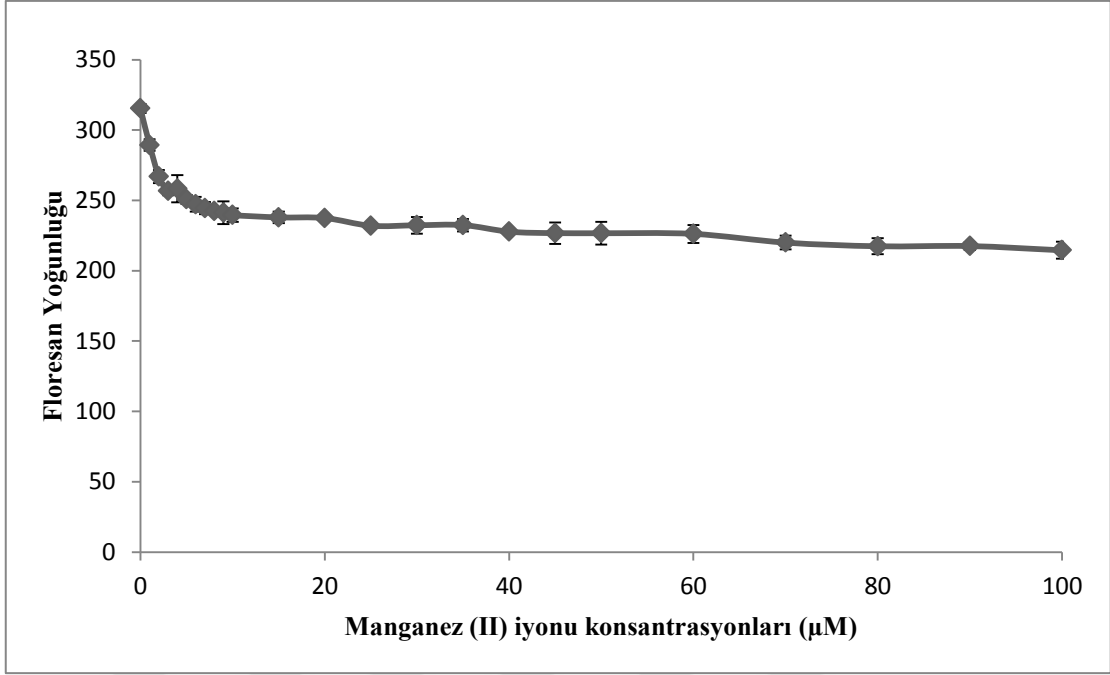
b.)  $y = 0,8914x - 0,0327$   $R^2 = 0,9947$  → Şekil 4.3.d

Düşük konsantrasyonlardaki bakır (II) iyonu ile belirgin sönümlenme sonuçları sayesinde 0 ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasındaki değerler ile çizilen küçük doğrusal grafiklerin eğimleri sayesinde elde edilen denklemler aracılığıyla, herhangi bir numunedeki bakır (II) iyonunun konsantrasyonunun bilinmemesi halinde floresan yoğunluğu sonucundan yararlanılarak o numunedeki bakır (II) iyonunun konsantrasyonu büyük bir doğruluk oranı ile bulunabilmesi amaçlandı. Floresan yoğunluğunun sönümlenmesi esasına göre bir algılama sistemi tasarlandığından dolayı Şekil 4.4.b’de gösterilen standart grafiğin denklemi hem tespit limit hem de tayin limiti hesaplamalarında kullanıldı.

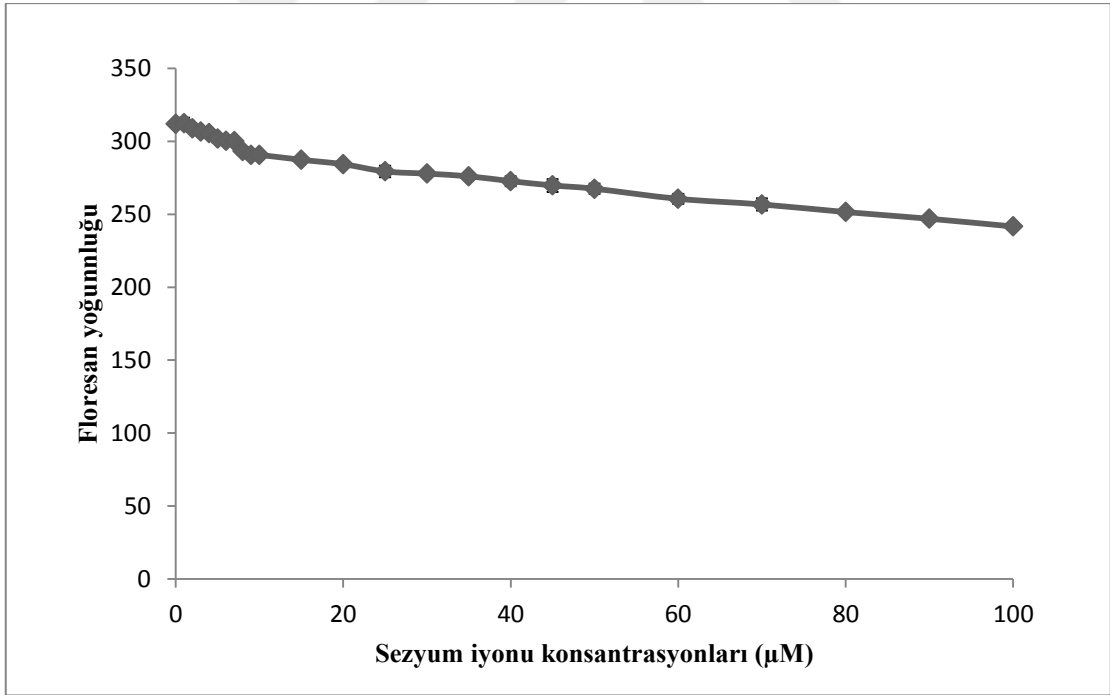
#### 4.4 Floresan Sönümlenme Üzerinde Çeşitli İyon Konsantrasyonlarının Etkileri



Şekil 4. 5: Lityum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi

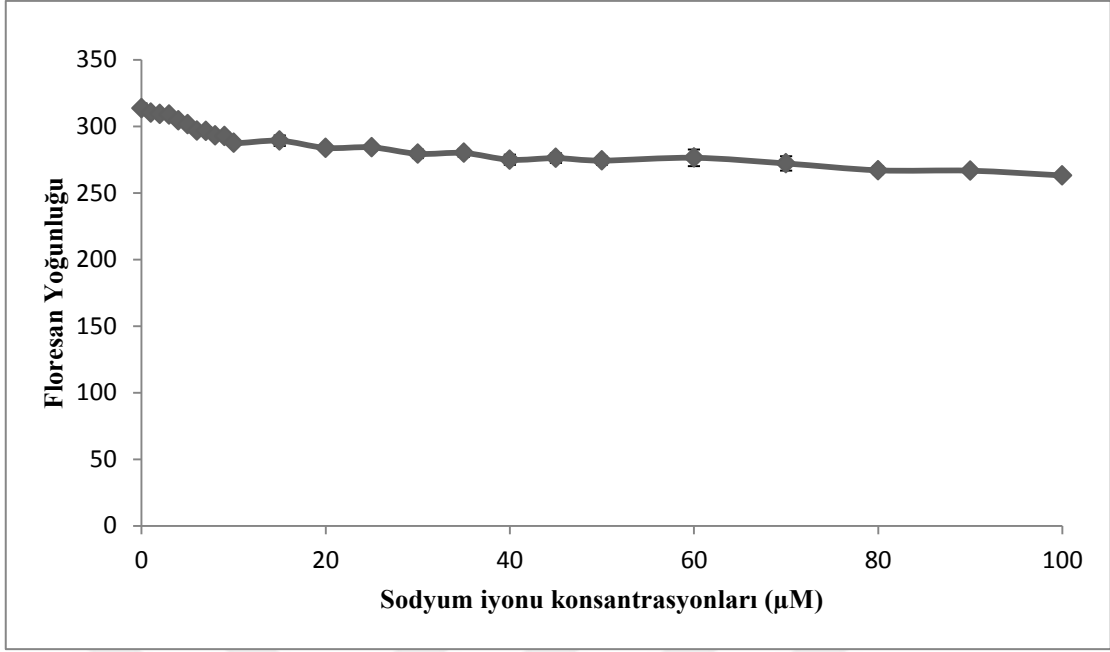


Şekil 4. 6: Manganez (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi

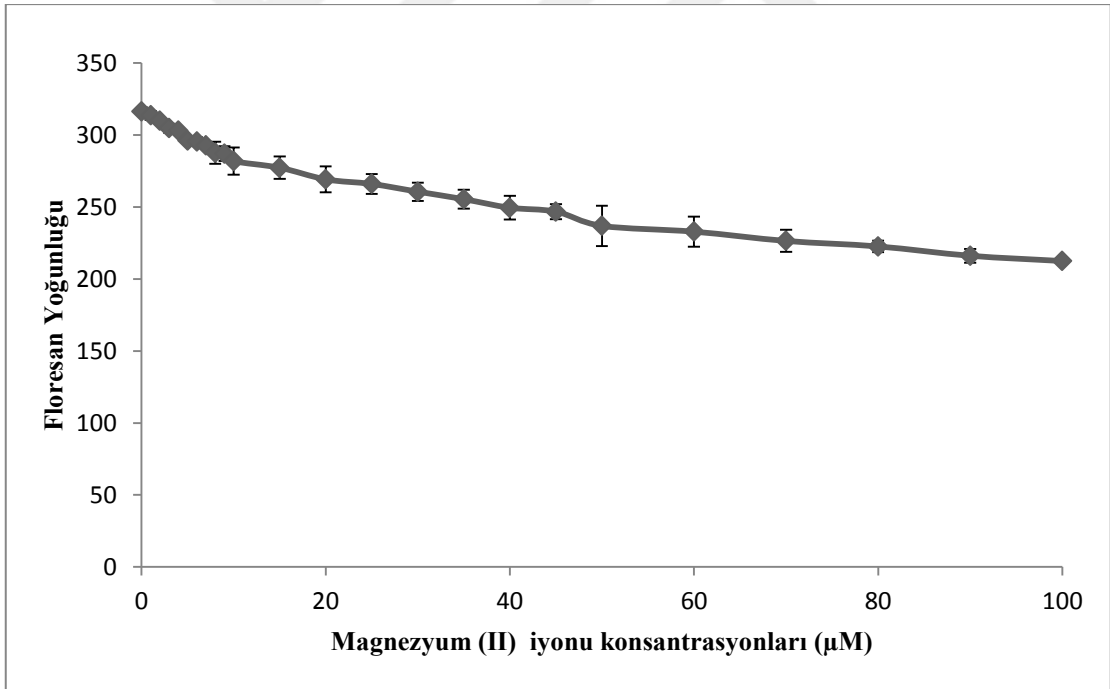


Şekil 4. 7: Sezyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi

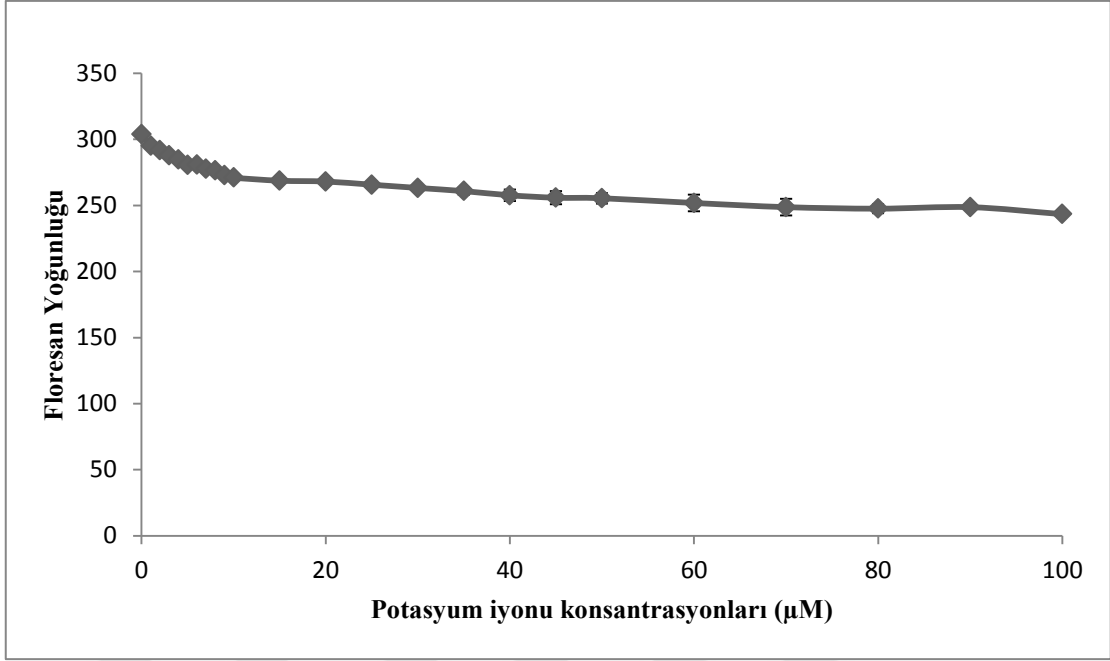




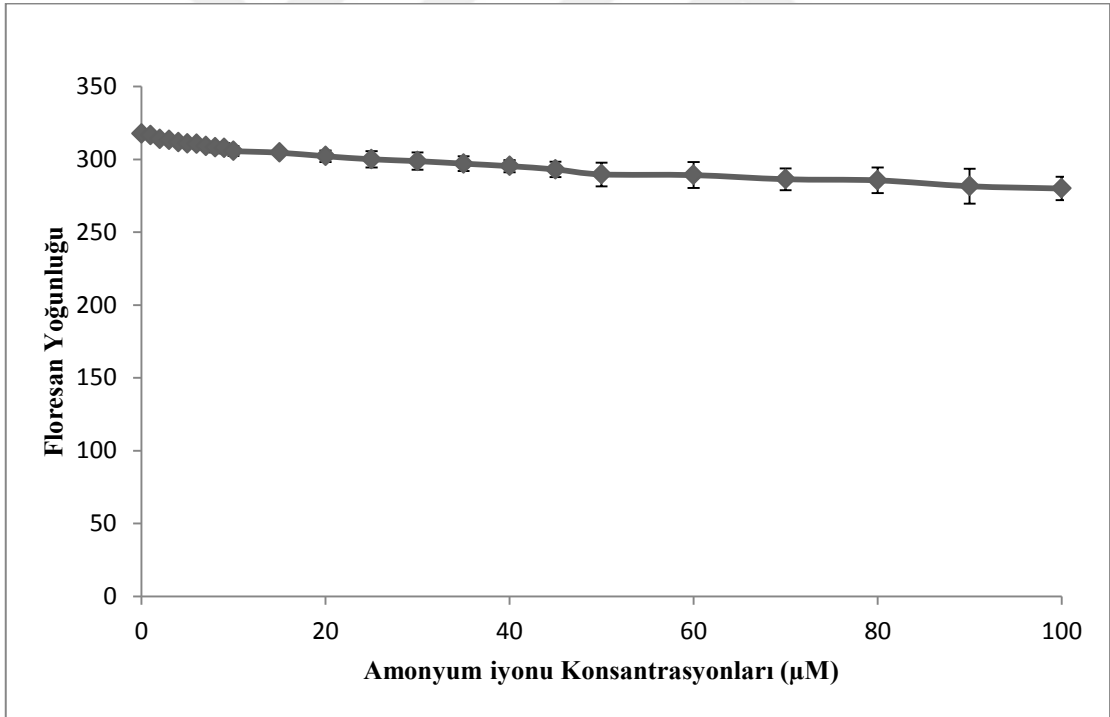
Şekil 4. 8: Sodyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



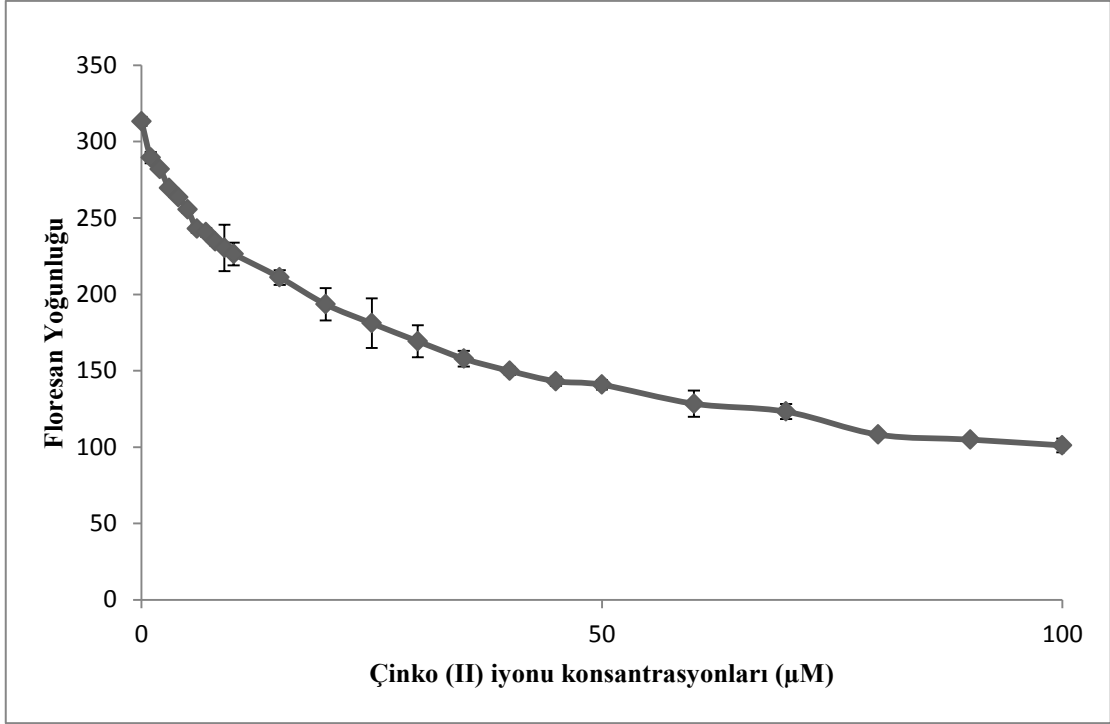
Şekil 4. 9: Magnezyum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



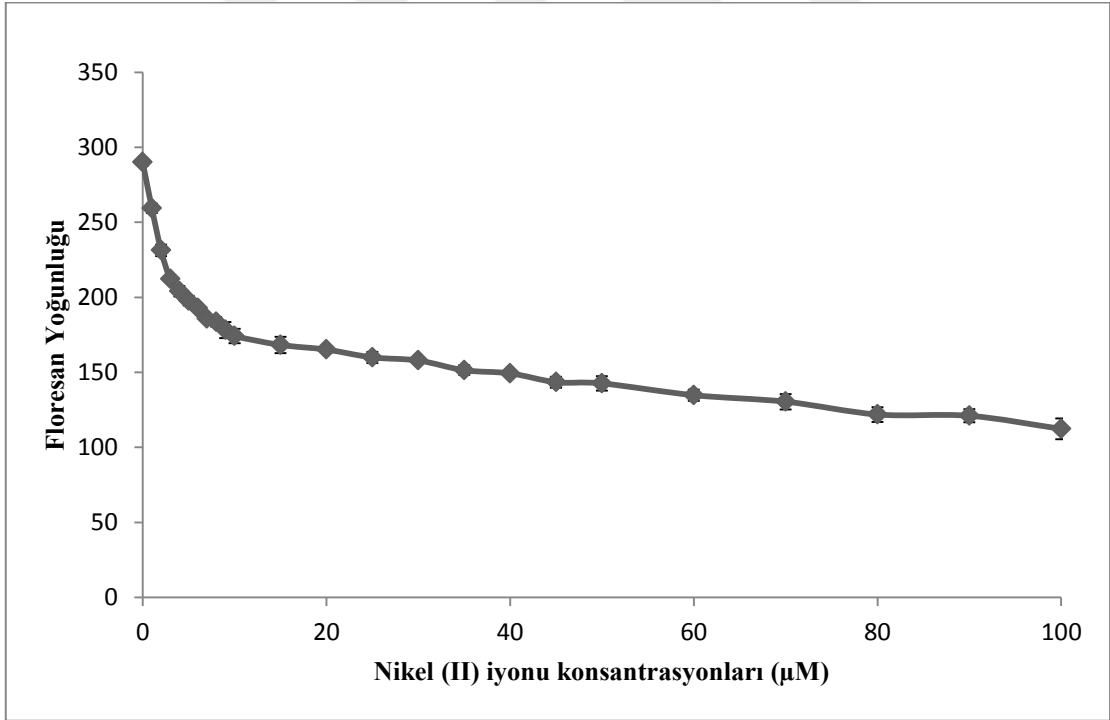
Şekil 4. 10: Potasyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



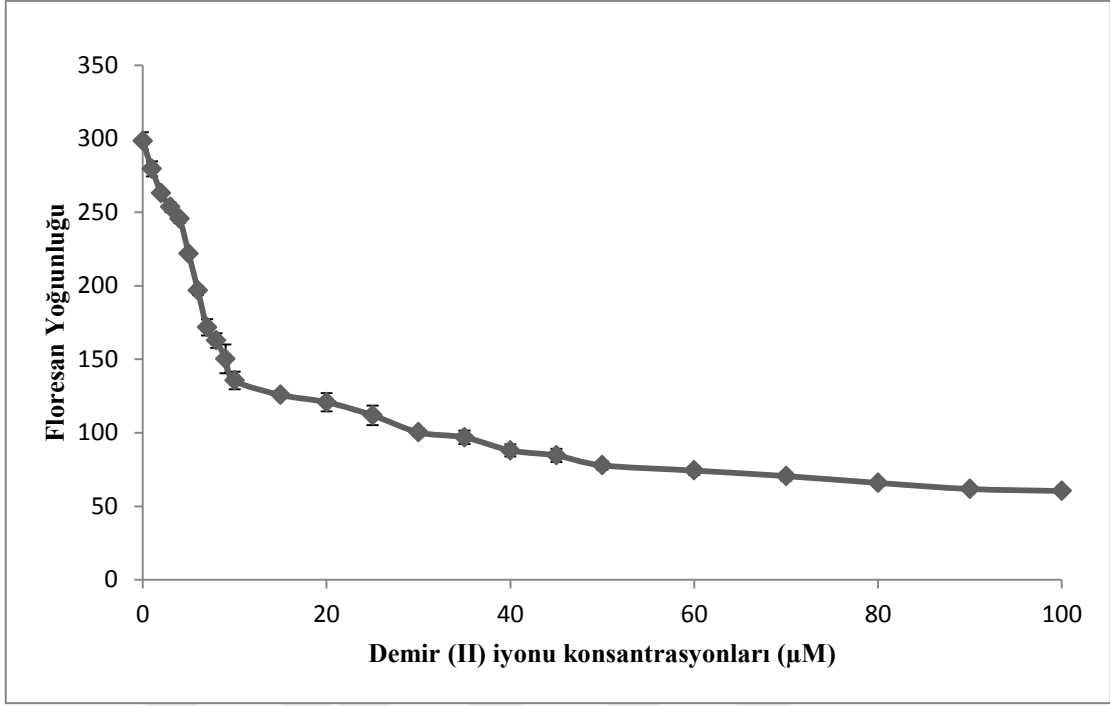
Şekil 4. 11: Amonyum İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



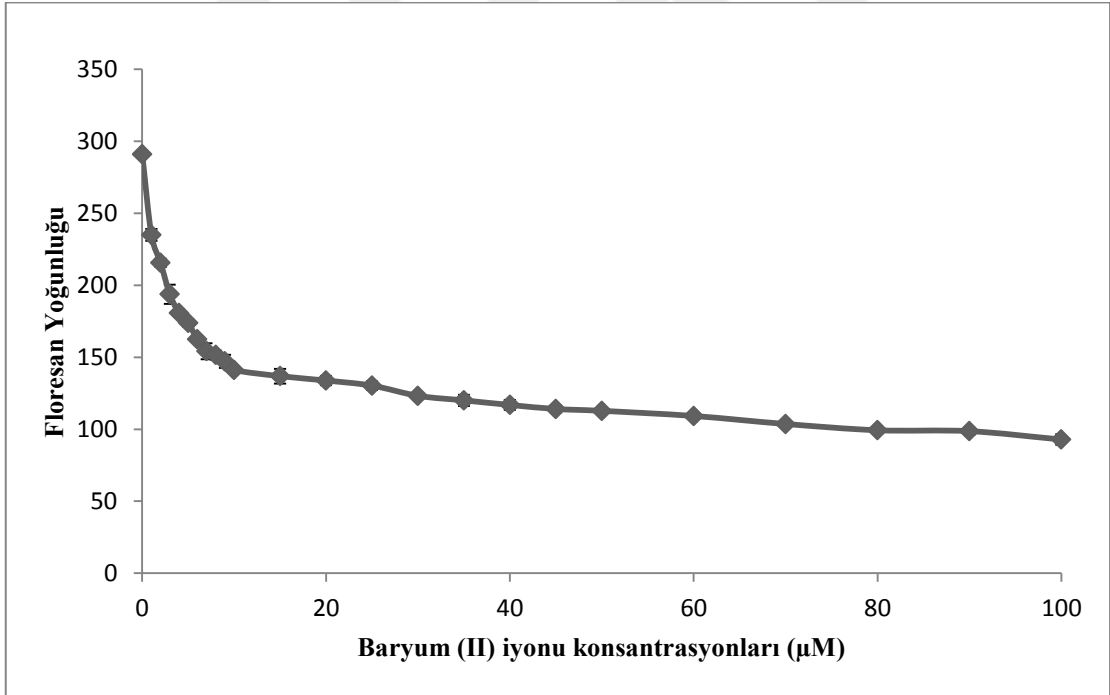
Şekil 4. 12: Çinko (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



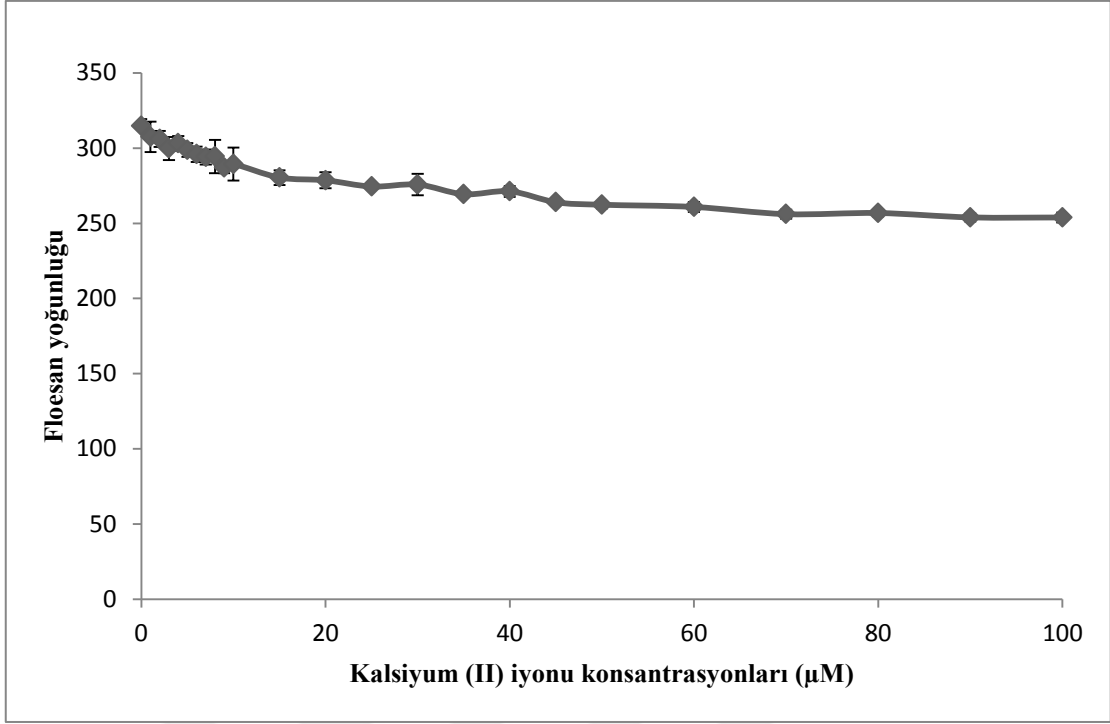
Şekil 4. 13: Nikel (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



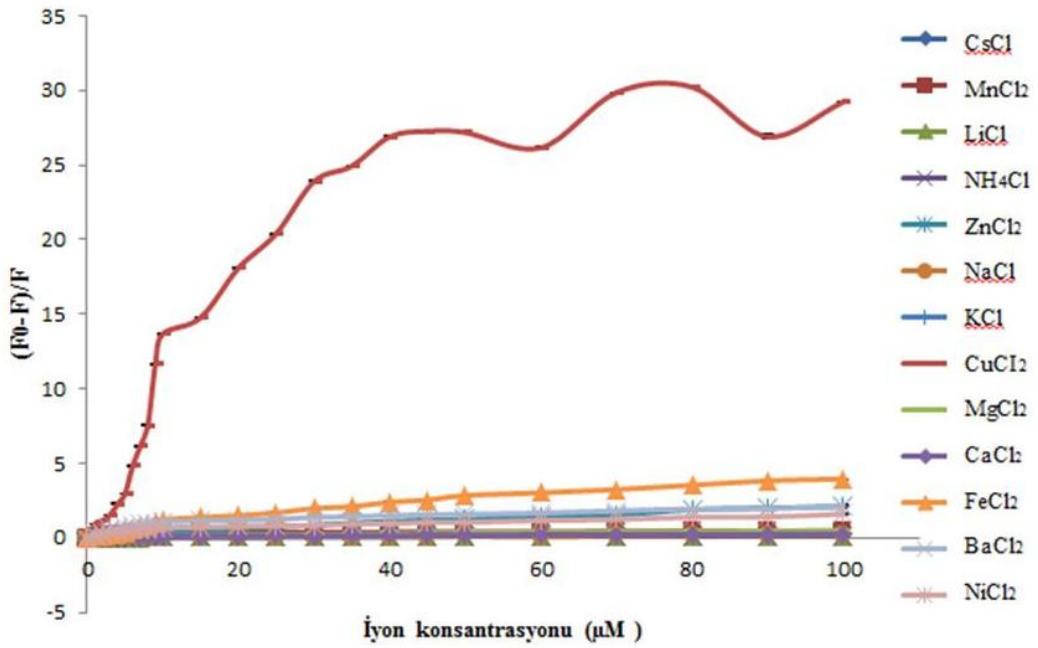
Şekil 4. 14: Demir (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



Şekil 4. 15: Baryum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



Şekil 4. 16: Kalsiyum (II) İyonunun Floresan Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi



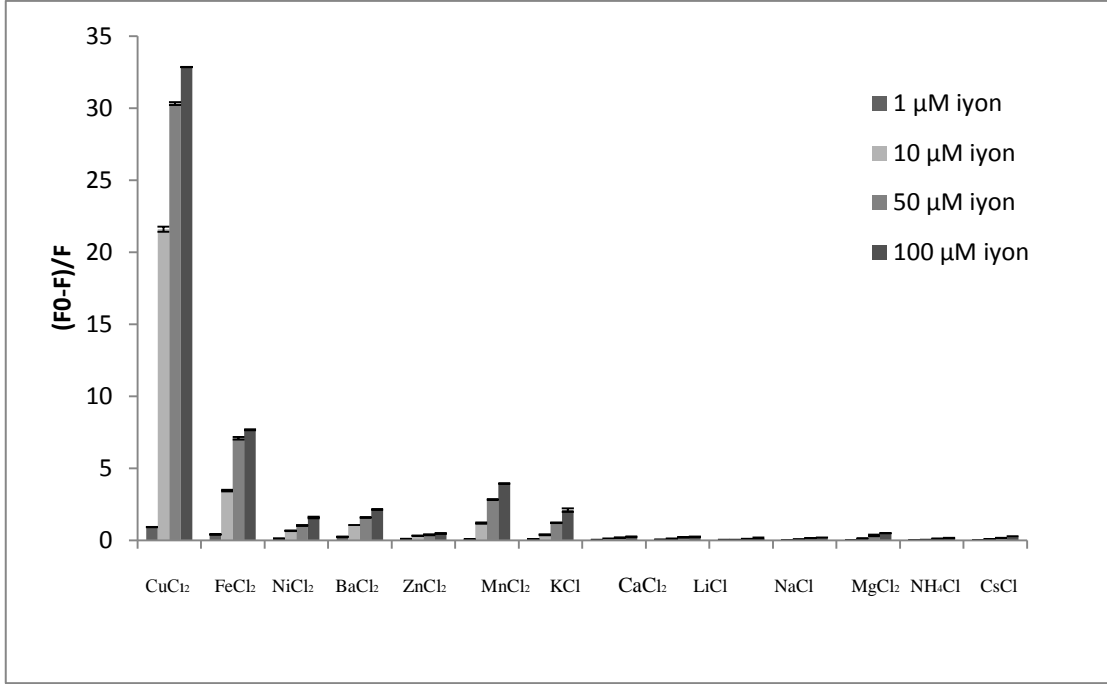
Şekil 4. 17: Bakır (II) ve Diğer Tüm İyonların Floresan Sönümlenme Üzerinde Etkisi ((F<sub>0</sub>-F)/F)

Floresan sönümlenme üzerinde bakır (II) iyonundan farklı olarak diğer iyonların nasıl etkilerinin olabileceğinin anlaşılması için bakır (II) iyonu ile yapılan floresan sönümlenme deneyinde olduğu gibi 0 ile 100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda

farklı iyonlar ile deney yapıldı. Bundan dolayı 0 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlar arasındaki artış 1  $\mu\text{M}$ , 10 ve 50  $\mu\text{M}$  arası artış 5  $\mu\text{M}$  ve 50-100  $\mu\text{M}$  arası artış 10  $\mu\text{M}$  kadar olacak şekilde iyon konsantrasyonları birbirlerine yakın aralıklarla seçildi. Şekil 4.5 lityum, Şekil 4.6 manganez, Şekil 4.7 sezyum, Şekil 4.8 sodyum, Şekil 4.9 magnezyum, Şekil 4.10 potasyum, Şekil 4.11 amonyum, Şekil 4.12 çinko, Şekil 4.13 nikel, Şekil 4.14 demir (II), Şekil 4.15 baryum, Şekil 4.16 kalsiyum iyonunun 495 nm dalga boyunda, floresan sönümlenme üzerinde oluşturduğu değişikliklerin grafikleri incelendiğinde açıkça görülmektedir ki bakır (II) iyonu gibi çok düşük iyon konsantrasyonlarda floresan yoğunluğunda büyük bir değişim iyonların hiçbirinde gerçekleşmedi ve neredeyse hiçbir iyon ile floresan sönümlenme tam olarak sağlanamadı. Ayrıca Şekil 4.17’de tüm iyonların 0-100  $\mu\text{M}$  iyon konsantrasyonları arasındaki floresan yoğunluğu değişim oranları toplu bir şekilde görülebilmektedir. Rölatif floresan birimi (RFU) olarak da adlandırılan birimsel ilerleme göz önüne alındığında tüm iyonların 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda floresan yoğunluğunda RFU oranını 0,5 bandında seyrederken bakır (II) iyonu 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyon ile floresan yoğunluğunu 13 RFU olarak değiştirdi. Aradaki dramatik fark iyon konsantrasyonları arttıkça devam etti ve daha da çok arttı. Son olarak ölçümü alınan 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda floresan yoğunluğunu değiştirme oranı diğer tüm iyonlar için 1 ve 3 RFU arasında değişirken bakır (II) iyonu için RFU değeri 29 birime ulaştı. Bu veriler yardımıyla tasarlanan algılama sisteminin bakır (II) iyonlarına yüksek miktarda özgünlük gösterdiği ve floresan yoğunluğunu etkileme oranları ile diğer tüm iyonlar arasından rahatlıkla seçilebildiği açıkça görüldü.

#### **4.5 Bakır (II) Seçicilik Deneyi**

Bakır (II) iyonu ve analog iyonlarının 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında iyonlar için seçicilik deneyi sonuçlarının grafikleri Şekil 4.18’de bulunmaktadır.



Şekil 4. 18: Farklı Konsantrasyonlarda Bakır (II) ve Diğer Tüm İyonların 1-10-50-100 μM Konsantrasyonlarında Seçiciliği

Çeşitli iyonların 0-100 μM arasındaki konsantrasyonlarının floresan sönümlenme üzerindeki etkisi görüldükten sonra sistemin bakır (II) iyonlarına olan özgünlüğü bir sonraki araştırma konusunu oluşturdu. Bu doğrultuda elde edilen deneysel veriler ile Şekil 4.18'deki grafikler elde edildi. 1, 10, 50 ve 100 μM iyon konsantrasyonları için ayrı ayrı grafikler oluşturularak farklı konsantrasyonlarda bakır (II) iyonu ile diğer tüm iyonların aynı konsantrasyonlardaki floresan sönümlenme oranının net bir şekilde görülebilmesi amaçlandı. Floresan sönümlenme oranının artış miktarı  $(F_0-F)/F$  değerleri ile hesaplandı.  $F_0$  değeri içerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan analitin floresan yoğunluğu değeridir.  $F$  değeri ise bu analitlerin içerisinde 1, 10, 50 ve 100 μM bakır ve diğer iyonlar bulunduğu floresan yoğunluğu değeridir.  $(F_0-F)/F$  değeri de floresan yoğunluğunda meydana gelen artış miktarıdır. Elde edilen grafikler doğrultusunda her bir konsantrasyonda bakır (II) iyonunun floresan sönümlenme oranını en çok artıran iyon olduğu görülmektedir. Her konsantrasyon artışı ile birlikte floresan sönümlenme oranındaki artış büyümekte fakat sonuçlar diğer iyonlar için değişmemektedir. Bu grafiklerden de anlaşılacağı üzere tasarlanan algılama sistemi bakır (II) iyonlarına çok yüksek oranda özgündür ve diğer iyonlara göre bakır (II) iyonu kolaylıkla ayırt edilebilecek kadar büyük bir floresan sönümlenme oranına sahiptir.

#### 4.6 Tespit Limiti ve Tayin Limitinin Hesaplanması

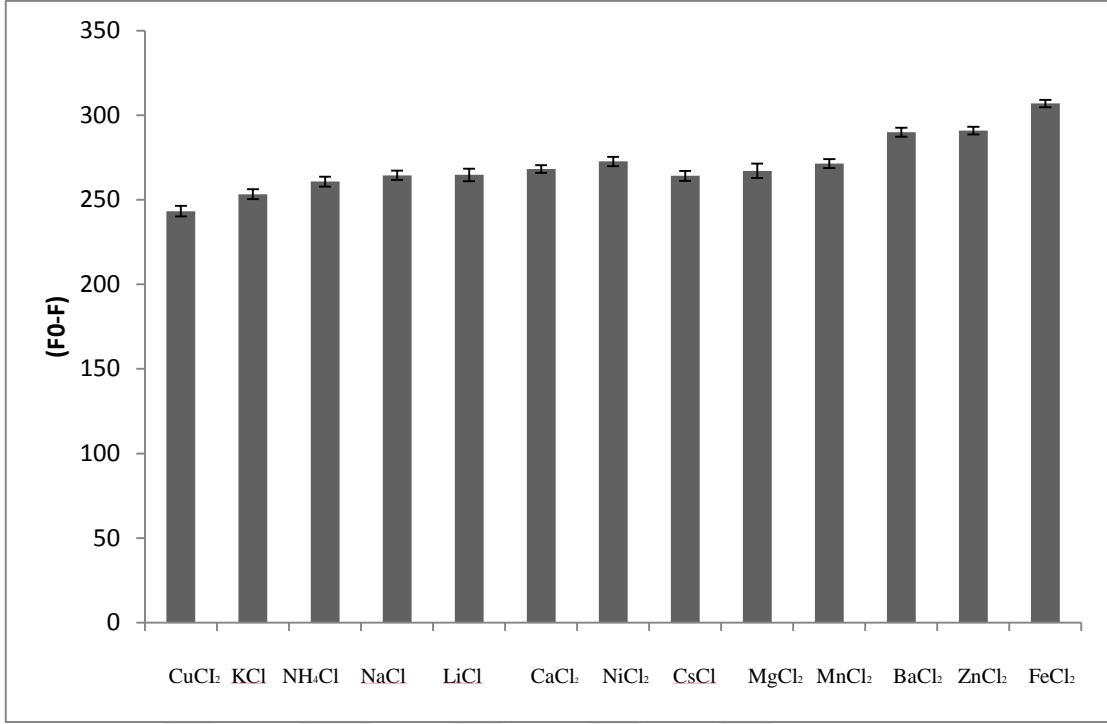
Tespit limiti (LOD) ve kantitatif limit (LOQ) parametreleri birbirleri ile ilişkili ancak farklı tanımlara sahip terimlerdir. İki terim için de amaç, bir metot ile tespit edilebilecek en küçük analit konsantrasyonunu tanımlamak ve o metot sayesinde hassasiyetle ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonunu tanımlamaktır. Tespit limiti uygulanan metot ile belirli koşullar altında aranılan analitin var/yok analizinin yapılabileceği en düşük analit konsantrasyonudur. Tayin limiti ise, uygulanan metot ile belirli şartlar altında kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla aranılan analitin miktarının ölçülebildiği en düşük analit konsantrasyonudur. Farklı yöntemlerle hesaplanabilmesine rağmen, analitik çalışmalarda en sık kullanılan doğrusal eğri eğimi ve en düşük analit konsantrasyonu için alınan ölçümlerin standart hataları içeren denklemler ile hesaplanan yöntemdir. Bu denklemlere göre tespit limiti; en düşük analit konsantrasyonunu içeren ölçümlerinden alınan sonuçların standart hatasının 3 katının doğru eğimine bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Kantitatif limit ise en düşük analit konsantrasyonunu içeren ölçümlerinden alınan sonuçların standart hatasının 10 katının doğru eğimine bölünmesiyle hesaplanmaktadır.

Tasarlanan metodun hassasiyetini değerlendirmek için, optimum deney koşulları altında 0-400  $\mu\text{M}$  arasında farklı bakır (II) konsantrasyonlarının artırıldığı ve floresan sönümlenmenin tespit edildiği deney sonuçlarından hareketle tespit limiti belirlendi. Şekil 4.4.b ve Şekil 4.4.d'deki küçük grafiklerde 0-1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu ile floresan sönümlenme arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir. Bu grafiklerin regresyon katsayısı ve grafik eğimlerini içeren denklemleri bulunmaktadır. En düşük analit konsantrasyonunu içeren ölçümlerin standart hatası 0,15'tir. Şekil 4.2'de yer alan floresan yoğunluğu iç grafiğinde, oluşan doğrunun eğimi 146,32 olarak görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında tasarlanan metodun tespit limiti 30,7 nM ve kantitatif limiti 102,5 nM olarak hesaplandı.

#### 4.7 Bakır (II) İyonu ile Yarışmalı Seçicilik Deneyi

Bakır (II) iyonunun 4  $\mu\text{M}$ , analoglarının ise 10 katı kadar olduğu yarışmalı seçicilik deneyi sonuçları Şekil 4.19'da görülmektedir.



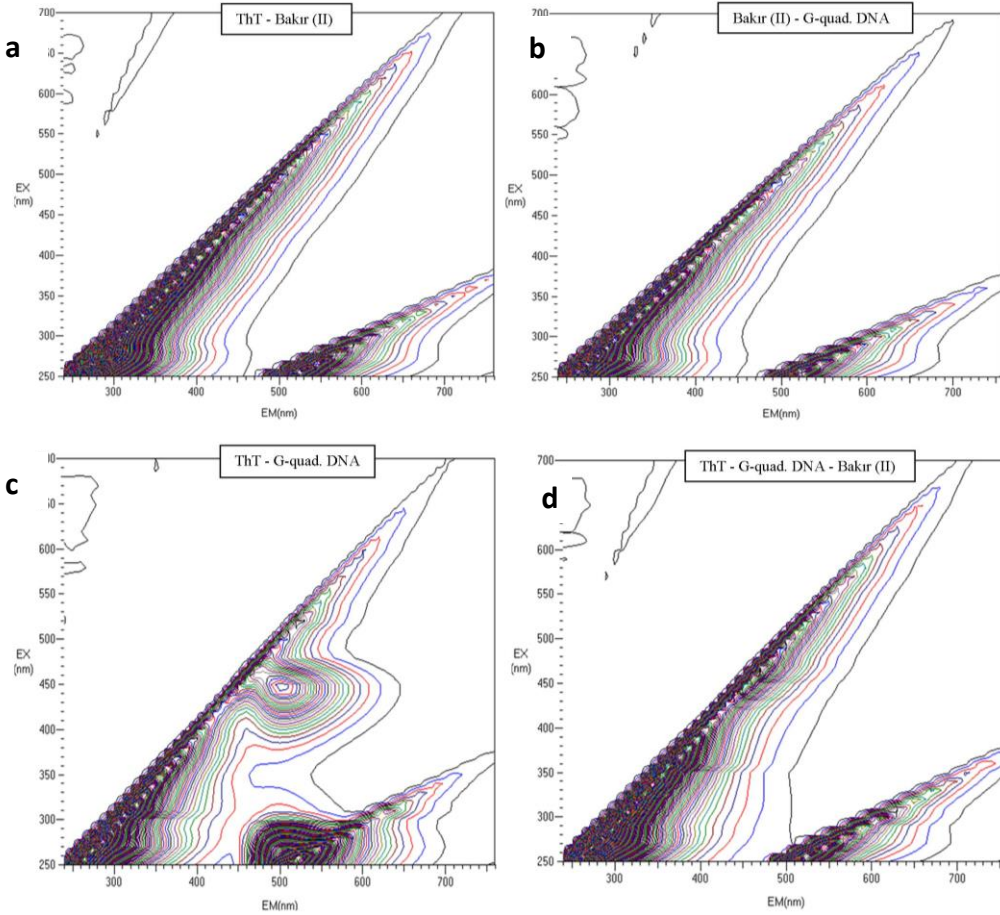


Şekil 4. 19: Bakır(II) iyonu İle Diğer Tüm İyonların Yarışmalı Seçiciliği

Bakır (II) iyonunun bulunduğu kompleks ortamlar ele alındığında bakır (II) iyonunun tek olarak bulunmadığı ve diğer iyonlar ile etkileşim halinde olduğu birçok ortam bulunduğundan, bakır (II) iyonunun ortamda diğer iyonlar bulunuyorken de seçiciliği araştırıldı. Bu doğrultuda floresan yoğunluğunu tam olarak söndürmeyen fakat bariz bir floresan değişikliğinin görülebildiği 4  $\mu$ M bakır (II) konsantrasyonu seçildi. İçerisinde hiç bakır iyonu bulunmayan tüplerin de floresan yoğunlukları referans alınarak, 4  $\mu$ M bakır (II) iyonu ile gerçekleşen floresan sönümlenmenin ölçümleri alındı. Bakır (II) dışında kalan tüm iyonlar, bakır (II) iyonunun 10 katı olarak 40  $\mu$ M konsantrasyonda içerisinde 4  $\mu$ M bakır (II) iyonu bulunan tüplere eklendi ve ölçümleri böylece alındı. Meydana gelen değişimin daha rahat izlenebilmesi için  $F_0$ -F grafikleri çizildi.  $F_0$  değeri içerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan tüplerin floresan yoğunluğu değeridir. F değeri ise içerisinde 4  $\mu$ M bakır ve 40  $\mu$ M iyon bulunduğundaki floresan yoğunluğu değeridir.  $F_0$ -F değeri ile floresan yoğunluğunda meydana gelen değişim miktarı özetlendi. Şekil 4.19'deki grafikten hareketle floresan yoğunluğunda bakır ile birlikte hiçbir iyonun yüksek bir floresan yoğunluğu sönümlenmesine neden olmadığı anlaşıldı.

#### 4.8 Üç Boyutlu Floresan Ölçümü

ThT- Bakır (II) ve G-quadrupleks DNA dizisinin ikili ve üçlü kombinasyonlarının 700-250 nm uyarma ve 760-240 nm emisyon dalga boyları arasında alınan 3 boyutlu floresan ölçümünün görüntüleri Şekil 4.20’da bulunmaktadır.



Şekil 4. 20: ThT-G-quadrupleks DNA-Bakır (II) İyonu Üç Boyutlu Floresan Spektrumları a.)ThT-Bakır(II) b.)Bakır(II)-G-quad. DNA c.)ThT-G-quad. DNA d.)ThT-G-quad. DNA-Bakır (II)

Üç boyutlu floresan spektroskopisi sayesinde bir malzemenin, seçilen tüm uyarma dalga boylarındaki emisyon spektrumları adeta o malzemelerin parmak izini oluşturacak şekilde görülebilmektedir. Uyarma ve emisyon dalga boylarının tüm olası kombinasyonları ölçülmektedir. Yani her bir ölçüm sonucunda farklı uyarma dalga boylarındaki emisyon spektrumu görülmektedir. Bu yöntemin avantajını kullanarak farklı uyarma dalga boylarında ThT, G-quadrupleks DNA ve bakır (II) iyonlarının kombinasyonları ile floresan yoğunluğunun artması ya da söndürülmesinin; uyarma ve emisyon aralıklarında oluşturduğu farklılıkların daha açıkça görülebilmesi amaçlandı.

Bu deneylerde ThT ve G-quadrupleks dizi miktarı tüm deneyler boyunca sabit olan konsantrasyonlarda kullanıldı. Bakır (II) iyonu ise sönümlemeyi tam olarak sağlayan bir konsantrasyon olan 10  $\mu$ M kullanıldı.

Deneylerde boyunca kullanılan Tris-HCl tampon çözeltisinin yalnız olarak ölçümü alındı ve ThT-G-quadrupleks kompleksine göre herhangi bir farkı olmadığı ve bir arka plan sinyali oluşturmadığı tespit edildi. Ardından ThT, G-quadrupleks DNA ve bakır (II) iyonlarının tampon çözelti içerisinde tekli olarak ölçümleri alındı. Tampon çözeltideki ölçüm sonuçlarının aynısı elde edildi. Ardından bakır (II)-G-quadrupleks DNA, ThT-G-quadrupleks DNA, bakır (II)-G-quadrupleks DNA ve bakır (II)-G-quadrupleks DNA-ThT ölçümü alınarak, farklı kombinasyonlardaki ölçüm farklılıklarının görülmesi amaçlandı. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi floresan yoğunluğu artışı ancak ThT-G-quadrupleks kompleksi ile oluşmaktadır. Deneyler boyunca ölçüm alınan ThT uyarma aralıkları olan 425-450 nm dalga boylarında maksimum emisyonun alındığı ve tepe noktasının da bu kısımda olduğu açıkça görülmektedir. Bu da kullanılan boyanın kendiliğinden floresan yoğunluğu artışını sağlamadığı fakat G-quadrupleks DNA gibi çeşitli yapılarla birleştiğinde floresan yoğunluğunu artırdığını üç boyutlu olarak kanıtlamaktadır.

ThT-G-quadrupleks-bakır (II) kompleksi ile alınan ölçüm sonuçlarında da floresan yoğunluğunun eski haline döndüğü yani artık bir floresanlıktan söz edilemeyeceği açıkça anlaşıldı. Tüp içerisinde ThT-G-quadrupleks miktarı değişmediği halde bakır (II) iyonlarının ortamda bulunmasıyla ThT’nin G-quadrupleks yapısından çıkarıldığı ve yerine bakır (II) iyonlarının geçtiği görülmektedir. Yapılan üç boyutlu spektroskopi çalışmaları sayesinde algılama sisteminin tasarlandığı gibi çalıştığı, ortamda G-quadrupleks DNA ve ThT olduğunda yüksek bir floresan yoğunluğunun oluştuğu fakat ortama bakır (II) iyonları eklendiğinde bu yoğunluğun kademeli olarak hassasiyetle azaldığı ve nihayetinde son bulduğu tekrar kanıtlanmaktadır.

#### **4.9 Geri Kazanım Deneyi**

Karaman ilinin şebeke sularından alınan 2 numune ile yapılan geri kazanım deneyinin sonuçları Tablo 4.1’deki gibidir.

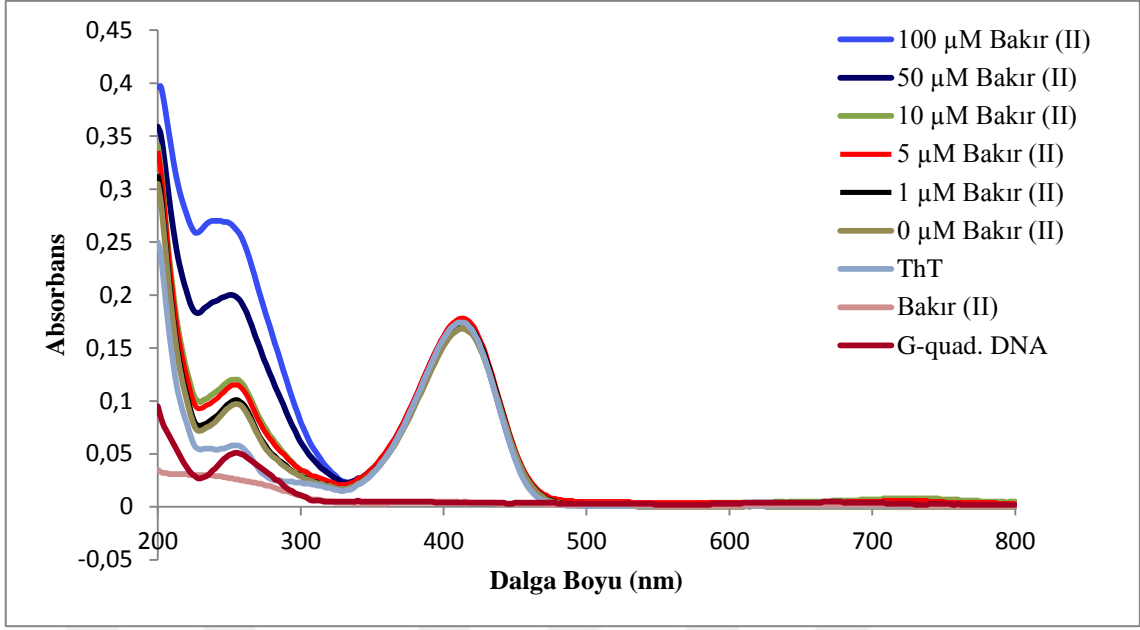
<b>Eklenen Bakır(II) Kons. (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Tespit Edilen Kons. (1. Numune)</b>	<b>Geri Kazanım Yüzdesi (1. Numune)</b>	<b>Tespit Edilen Kons. (2. Numune)</b>	<b>Geri Kazanım Yüzdesi (2. Numune)</b>
<b>0</b>	0	100	0	100
<b>0,2</b>	0,21	102,34	0,14	72,49
<b>0,4</b>	0,42	105,91	0,40	101,49
<b>0,6</b>	0,61	101,03	0,63	105,20
<b>0,8</b>	0,74	92,61	0,77	96,56
<b>1</b>	1,17	117,54	1,03	100,35

Tablo 4.1. Karaman Şebeke Suyu Örneklerinin Referans Değerler ile Benzerlik Oranları

Yapılan deneyler neticesinde başarılı olduğu anlaşılan algılama sistemi ile su numunelerindeki bakır oranlarının ölçülmesi ve sistemin hassasiyet oranının görülmesi istendi. Bu doğrultuda Karaman ili şebeke sularından iki farklı bölgeden numuneler toplanmıştır ve bu numuneler ile G-quadrupleks DNA, ThT ve bakır (II) iyonları deneylerde kullanılan konsantrasyonları kullanılarak algılama sisteminin ana deneyleri yapıldı ve ölçüm sonuçları alındı. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi 2 farklı su numunesi ile yapılan deney sonuçları yüksek güvenilirlikle referans değerlerle uyum sağlamaktadır. Özellikle 0,4  $\mu$ M bakır (II) konsantrasyonu için her iki su numunesinden alınan sonuçlarda 0,4 değeri elde edildi. Aynı şekilde 0,6  $\mu$ M bakır (II) konsantrasyonları için 2 numuneden alınan sonuçlar da 0,6 değerini göstermektedir. Bakır (II) iyonu 1  $\mu$ M konsantrasyona ulaştığında da yine 2 su numunesinin de benzer sonuçlar oluşturduğu görüldü ve sistemin hassasiyeti açıkça anlaşıldı. Bu sonuçlar neticesinde tasarlanan algılama sisteminin su numunelerinde bakır (II) iyonu tespitinde kullanılabileceği ve elde edilecek sonuçların da referans değerlere çok yakın değerler olduğu görüldü.

#### 4.10 UV Spektral Tarama

Bakır (II) iyonu konsantrasyonu arttıkça, G-quadrupleks DNA dizisi ve ThT kompleksinde meydana gelen değişikliklerin UV Spektral ölçümleri Şekil 4.21’de bulunmaktadır.



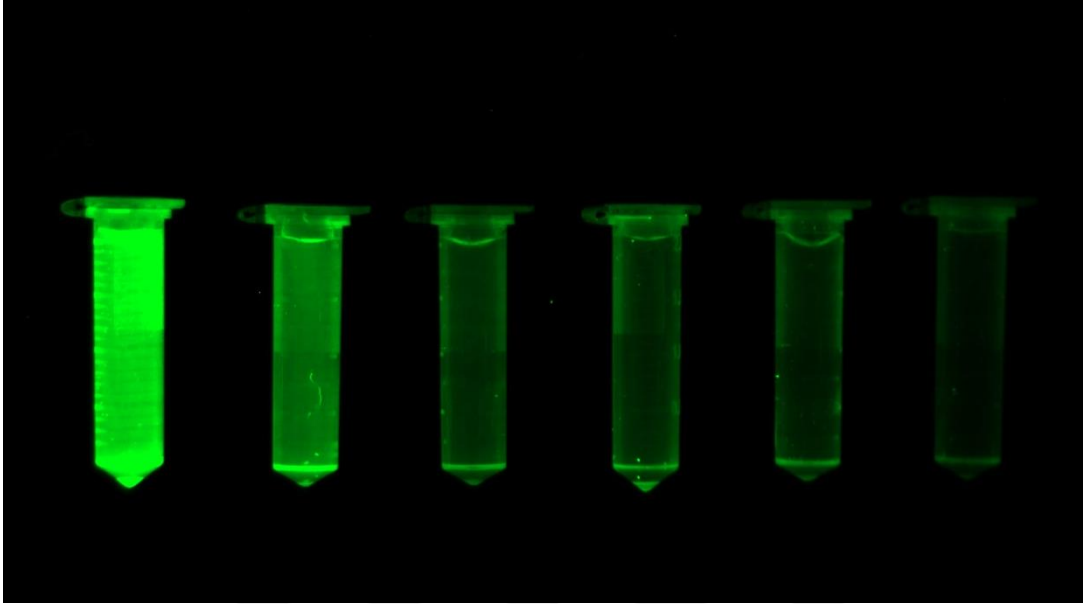
Şekil 4. 21: ThT-G-quadrupleks DNA-Bakır (II) İyonu Kombinasyonlarının 200-800 nm Dalga Boylarında UV Spektral Taraması

İçerisinde herhangi bir G-quadrupleks DNA dizisinin bulunmayan serbest haldeki ThT, 410-420 nm dalga boyları arasında yüksek bir pik oluşturdu. Tek başına bakır (II) iyonu absorbans spektrumunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Sadece G-quadrupleks DNA dizisinin absorbans sonucuna göre ise DNA absorbans spektrum dalga boyu olan 260 nm dalga boyunda pik oluşturdu. İçerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan ThT-G-quadrupleks kompleksi, hem DNA absorbans dalga boyu olan 260 nm'de hem de ThT absorbans dalga boyu olan 410-420 nm dalga boylarında birer pik oluşturdu. Bakır (II) konsantrasyonu arttıkça ThT'nin absorbans dalga boyu olan 410-420 nm dalga boylarındaki pik neredeyse hiç değişmedi fakat artan her bakır (II) iyonu konsantrasyonu ile birlikte DNA absorbans dalga boyu olan 260 nm'deki pikler arttı. Bu artış G-quadrupleks DNA dizisinin, bakır (II) iyonunun artışıyla birlikte ThT-G-quadrupleks kompleksinden ayrılarak bakıra konformasyonel bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Bakır (II) iyonu arttıkça G-quadrupleks yapıdan ayrılan G-quadrupleks DNA dizisi artmakta, bu da 260 nm'deki absorbans pikinin daha da artmasına yol açmaktadır.

#### 4.11 Floresan Sönümlenmenin Görüntülenmesi

Floresan sönümlenme üzerinde bakır (II) iyonu konsantrasyonu artışının etkilerinin renkli olarak görüntülenebilmesi için jel görüntüleme cihazının ThT için en uygun olan 480

nm uyarma ve 510 nm emisyon aralıklarındaki metot kullanıldı. G-quadrupleks-ThT kompleksinin oluşturduğu floresan yoğunluğunun bakır (II) iyonu konsantrasyonunun artırılmasıyla kademeli olarak düşüşünün görüntüleri Şekil 4.22’de yer almaktadır.

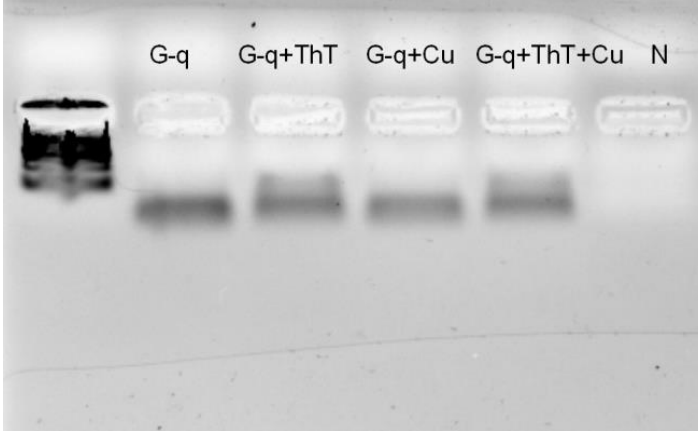


Şekil 4. 22: Artan Bakır (II) Konsantrasyonları ile Floresan Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişimin Görüntülenmesi

Sol baştan itibaren içerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan ve 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bakır (II) iyonu bulunan tüplerin floresan yoğunluklarında meydana gelen değişim Şekil 4.22’de açıkça görülmektedir. 1  $\mu\text{M}$  bakır (II) iyonu varlığında dahi floresan yoğunluğunda gözlenen çarpıcı azalma, tasarlanan sistemin hassasiyetini göstermektedir.

#### 4.12 Jel Görüntüleme Deneyi

Deney sonuçlarının hepsinde görülen floresan yoğunluğu artışı ve sönümlenmesi fenomeninin jel görüntüleme çalışmalarıyla da pekiştirilmesi amaçlandı. Bu çalışmalarda da üç boyutlu floresan spektroskopisi çalışmalarında olduğu gibi kullanılan G-quadrupleks DNA, ThT ve bakır (II) iyonların deneylerde kullanılan konsantrasyonlarda kullanıldı. Fakat bu yöntem ile içerisinde DNA bulunmayan bir kombinasyon herhangi bir sonuç alınamayacağı için kullanılmadı. Tüm kombinasyonların içerisinde G-quadrupleks DNA bulunmaktadır. Aksi takdirde agaroz jel içerisinde elektriksel yük yardımı ile yürüme yapabilecek bir analit bulunmayacağından bir görüntü de alınamayacaktır.



Şekil 4. 23: G-quadrupleks DNA ile ThT ve Bakır (II) İyonlarının Kombinasyonlarının Jel Yürütme Deneyi Görüntüsü (10 dk)

Şekil 4.23'te 10 dakika yürütülen jel görüntüleme sonucu bulunmaktadır. G-quadrupleks DNA dizisi uzunluğu çok kısa olduğundan 10 dakika sonra görüntüleme yapılmıştır ve kuyucuklardaki yürüme oranına bakıldı. Bu nedenle ladder olarak adlandırılan ve 25 baz çifti uzunluğunda olan DNA referans çerçevesi tam olarak açılmadı. G-quadrupleks DNA dizisini barındırmayan kombinasyonlar jel elektroforezi yönteminde görüntülenemeyeceği için kullanılmadı. Şekildeki jel görüntüsünde açıkça görülebildiği gibi içerisinde ThT bulunan kuyucuklarda sürüklenmeli bir bant elde edildi ve diğer kuyucuklara göre daha az yürüdü. Negatif olan kuyucukta sadece yürütme boyası kullanıldı ve herhangi bir kontaminasyon sonucunun oluşmadığı görüldü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1 Tartışma

Ağır metaller yerkabuğunda bulunan doğal bileşenlerdir ve tüm dünya ekosisteminde bulunmaktadır. Bakır hem bir zorunlu iz element hem de zararlı bir ağır metal olarak hayatın birçok alanında karşımıza çıkmaktadır. Bakırın eksikliği canlıların yaşamsal faaliyetlerini sıkıntıya sokabileceği gibi çok fazla olması da yaşamı tehlikeye sokabilir. Bu mükemmel dengenin kurulmasında en önemli faktör bakırın miktarıdır. Böyle hassas bir denge için ancak aynı hassasiyette ölçüm metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç dolayısıyla hassas bir ölçüm metodu olarak etiket gerektirmeyen, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlayan G-quadrupleks oluşumuna dayanan bir sensör sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır ve bu tez kapsamında çalışılmıştır. Çeşitli ağır metal iyonları, antibiyotikler ve çok çeşitli moleküllere özgü bu tarz algılama sistemleri önceki çalışmalarda da tasarlanmış ve başarıya ulaşmıştır (Giurgiu ve ark., 2018; Leung ve ark., 2013; Man ve ark., 2010).

Planlanan sistemin temel mekanizması; bakır iyonuna özgün ama aynı zamanda da G-quadrupleks oluşturabilecek bir DNA dizisi ile normalde floresan özelliği bulunmayan fakat belirli yapılarla birleştiğinde artan floresan özellik gösteren, floresan moleküler rotor grubundan bir boyanın kompleks oluşturması ve bunun sonucunda yüksek bir floresan yanıtın alınmasıdır. Ardından da G-quadrupleks DNA yapısına daha özgün bağlanma gösterecek olan bakır (II) iyonunun ortama eklenmesi ile floresan yoğunluğunda düşme sağlanarak sönümlenme işleminin tamamlanması. Bu sönümlenmenin bakır konsantrasyonundaki değişiklikler ile paralel olarak anlamlı bir sonuç oluşturarak elde edilecek bulguların bakır (II) iyonunun miktarının tespitinde kullanılmasıdır.

Planlanan algılama ve ölçme sistemini gerçekleştirmek için G-quadrupleks oluşturabilen bir DNA dizisi ve floresan moleküler rotor özelliğine sahip bir boya olan ThT seçilmiştir. Guanin tetratları ve ardından da G-quadrupleks yapısını oluşturabilecek guanin nükleotidince zengin DNA dizisi literatür taramaları ile seçilmiştir. Yine literatür aracılığıyla sensör çalışmaları geçmişte çok eskiye dayanmayan, floresan kuantum verimi belirli maddelerle bağlandığında artış gösteren ve düşük maliyetli bir boya olan



ThT boyası çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Potasyum iyonunun G-quadrupleks tabanlı bir yöntemle tespiti için Ueyama ve ark.'nın çalışmalarında kullandığı 5 mM Tris-HCl (pH 7,0) tampon çözeltisi deneyde kullanılmak üzere seçilmiştir (Ueyama, Takagi, & Takenaka, 2002).

Bir dalga boyunda uyarılan cisimdeki elektronlar, uyarılmanın etkisiyle bir üst enerji kabuğuna çıkmaktadırlar. Bu kabukta titreşim halinde ve kararsız olarak bulunan elektronlar temel durumlarındaki enerji kabuğuna dönüş yapmaktadırlar. Bu dönüş esnasında foton olarak adlandırılan bir ışık birimi yaymaktadırlar. Floresan, bir dalga boyundaki bir fotonun absorbe edilmesi ve ardından daha farklı bir dalga boyunda bir fotonun yayılmasıyla gerçekleşen ışık verme olayı olarak açıklanmaktadır. Floresan özelliğe sahip moleküller genellikle aromatik moleküllerdir. Floresan özelliği en çok etkileyen durumlardan biri floresan özelliğe sahip moleküllerin floresan kuantum verimleridir. Kuantum verimi o molekülün absorbe ettiği fotonların sayısına göre yaydığı fotonların sayısıdır. Rodamin gibi yüksek kuantum verimine sahip moleküller en parlak floresan yoğunluğuna sahip olmaktadır (Lakowicz, 2013).

Floresan moleküler rotor sınıfına ait benzotiazol bir boya olan ThT hem elektron alıcı hem de elektron verici gruplardan oluşmaktadır. Her iki grubu da bünyesinde bulunduran ThT gibi boyalar TICT mekanizması ile floresan özelliğe sahip olmaktadır. Uyarılan durumdaki ThT, benzotiazol parçasını dimetilalanin halkasına bağlayan molekülün ortasındaki tek karbon bağının etrafında dönmesinin bir sonucu olarak yük transferi duruma geçmektedir. Bu bükümlü iç yük transferi ThT'nin moleküler rotor davranışından sorumludur (Lakowicz, 2013). ThT molekülünde bulunan benzotiazol kısmındaki pozitif yüklü azotun çeşitli yapılarla hidrojen bağı kurarak özgün bir bağlanma oluşturduğu düşünülmektedir. Bağlanmanın ardından ThT molekülünde karbon molekülünün etrafında devamlı rotasyon yapan dimetilalanin halkasının rotasyonu kısıtlanmaktadır. Kısıtlanma ile birlikte ThT molekülü düzlemsel bir hal almaktadır ve floresan kuantum veriminde büyük bir artış meydana gelmektedir (Sulatskaya ve ark., 2011). Bu sayede normalde kendiliğinden floresan özelliği bulunmayan ThT molekülü amiloid fibriller gibi ya da G-quadrupleks gibi ikincil yapılarla bir araya geldiğinde floresan yoğunluğunda büyük bir artış oluşturmaktadır.

Planlanan deney sisteminin anlamlı bir sonuç oluşturup oluşturmayacağını anlaşılması için öncül bir ilk deney gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü üzere ThT kendiliğinden floresan spektrumunda anlamlı bir artışa sebep olmamaktadır. Bakır (II) iyonlarıyla bir araya geldiğinde de floresan yoğunluğunda artış oluşmamıştır. ThT, G-quadrupleks DNA dizisi ile birleştiğinde floresan yoğunluğunda dramatik bir artış görülmüştür ve bu kompleks için floresan özellikten söz edilebilir hale gelmiştir. Ardından aynı sistemin içerisinde bakır (II) iyonlarının da varlığında floresan yoğunluğunun eski haline döndüğünün ve floresan özelliğinin ortadan kalktığı görülmektedir. ThT amiloid fibriller gibi  $\beta$  tabaka yoğun moleküller gibi yapılara bağlandığında, molekül yapısı düzlemsel hale gelmektedir, moleküller rotasyonu kısıtlanmaktadır ve bu sayede floresan kuantum veriminde büyük bir artış meydana gelerek floresan yoğunluğunda artış oluşturmaktadır. Ortamda G-quadrupleks DNA dizisinin daha özgün olduğu bakır (II) iyonu bulunduğu ise, bakır (II) iyonu yüksek afinite gösterdiği G-quadrupleks dizi ile kompleks oluşturacağından G-quadrupleks DNA ThT ile olan etkileşiminden ayrılmaktadır ve sönmeme olarak adlandırılan floresan yoğunluğunda düşüş meydana gelmektedir. Öncül deneyden elde edilen floresan değeri sonuçlarına göre planlanan deney mekanizmasının başarıyla ilerleyebileceği anlaşılmıştır.

Deneylerde kullanılacak kimyasal malzemeler açısından en dikkate değer ve yüksek maliyetli olan G-quadrupleks DNA olduğu için literatürde genel olarak kullanılan oran olarak 200 nM sabit konsantrasyon olarak seçilmiş ve optimizasyona gerek duyulmamıştır. Çünkü aptamer konsantrasyonu arttıkça ortam viskozitesi de artacağından floresan quantum veriminin artması da beklenen bir durumdur. Bu sonuç çok açık olduğu için ve malzemelerin en minimumuyla maksimum verim alınması mantığı ile daha yüksek konsantrasyonlarda G-quadrupleks DNA dizisi için seçilmemiştir.

Belirlenen G-quadrupleks DNA dizisi ve artan ThT konsantrasyonunda floresan yoğunluğu değişiminin görülmesi amaçlanmıştır. Floresan yoğunluğunun maksimum görüldüğü dalga boyu olan 495 nm’deki floresan yoğunluğu değerleri alınarak Şekil 4.2’deki grafik ThT konsantrasyonuna karşı floresan yoğunluğu biçiminde çizilmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi ThT miktarı arttıkça floresan yoğunluğu da başta artmış, ardından 7-15  $\mu$ M arasında sabit olarak ilerlemiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde

anlaşılmıştır ki ThT miktarının çok artırılması floresan yoğunluğunda da hep artışa sebep olmamaktadır. G-quadrupleks DNA dizisi ile etkileşime giren ThT molekülünün bağlanma yapabildiği maksimum bir konsantrasyon mevcuttur ve bu konsantrasyonun üzerinde ThT'nin ortamda bulunması floresan yoğunluğunda artışa sebep olmamaktadır. Buradan hareketle en düşük ThT konsantrasyonu ile maksimum floresan yoğunluğunu yakalayabildiğimiz 7  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu takip eden tüm deneylerde kullanılmak üzere seçilen konsantrasyonu olmuştur.

Tasarlanan metodun hassasiyetinin ölçülmesi için çeşitli bakır (II) iyonları konsantrasyonlarının floresan yoğunluğu üzerindeki sönümlenme oranları ölçülmüştür. Bu kapsamda bakır (II) iyonları konsantrasyonları çok küçük aralıklarla artırılmıştır. Şekil 4.3'te grafikte görüleceği üzere başlangıçta 0,1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonundaki bakır (II) iyonu varlığında dahi önemli floresan sönümlenmelerine sebep olmuştur ve sönümlenme anlamlı bir biçimde bakır (II) iyonu konsantrasyonu arttıkça devam etmiştir. Ardından elde edilen sonuçların daha net görülebilmesi açısından, yine en yüksek floresan yoğunluğu değerlerinin gözlemlendiği 495 nm'deki floresan yoğunluğu değerleri alınarak bakır (II) iyonu konsantrasyonuna karşı floresan yoğunluğu grafikleri elde edilmiştir. Şekil 4.4.a'da görüldüğü üzere yaklaşık 8  $\mu\text{M}$  bakır (II) ile floresan sönümlenme neredeyse tamamlanmıştır ve sonraki konsantrasyonlar için de artık herhangi bir floresan özellikten söz edilmesine olanak kalmamıştır. Bakır (II) miktarının artması ile floresan yoğunluğunda meydana gelen değişimin daha rahat anlaşılabilmesi için Şekil 4.4.b'de  $(F_0-F)/F$  grafiği de ayrıca çizilmiştir. Burada  $F_0$  değeri içerisinde hiç bakır iyonu bulunmayan tüplerdeki floresan yoğunluğu değeridir.  $F$  değeri ise içerisinde  $x$   $\mu\text{M}$  bakır iyonu bulunan floresan yoğunluğu değerleridir.  $F_0-F$  değeri ile floresan miktarında meydana gelen değişim görülmüştür. Ardından her konsantrasyonun  $F$  değeri kendi değişim miktarına bölünerek bu değişimin floresan yoğunluğuna oranı ile floresan sönümlenme oranının artış miktarı hesaplanabilmiştir. Bakır (II) iyonları Şekil 4.4.c ve 4.4.d'de bulunan küçük grafiklerden de anlaşılacağı üzere 0 ve 1  $\mu\text{M}$  arasındaki küçük konsantrasyon değişimleri bile floresan sönümlenmesinde önemli artışlar sağlayarak sistemin hassasiyetinin çok fazla olduğunu gözler önüne sermiştir. Bu küçük grafikler içerisinde regresyon katsayısı ve denklemler yer almaktadır. Her iki grafik için de regresyon katsayıları 1 tam değerine çok yakın değerler olmuştur ve elde edilen düşme verilerinin deneysel olarak çok başarılı olduğu

görülmüştür. Denklemler sayesinde ise herhangi bir numunede bakır (II) konsantrasyonu bilinmeyen bir numunenin floresan yoğunluğuna bakılarak denklemler yardımıyla içerisinde yaklaşık olarak ne kadar bakır (II) iyonu bulunduğu hesaplanabilecektir.

Algılama sisteminin doğrusal aralığının 0-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasında olduğu görülmüştür. Bunun ardından sistemin hassasiyetinin de tespit edilebilmesi için tespit ve tayin limitleri hesaplanmıştır. Standart hata değerleri ve standart eğri eğimi değerlerine dayanan ve metot kısmında açıklanan yöntem sayesinde tespit ve kantitatif limit hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda tespit limiti 30 nM ve tayin limiti 100 nM şeklinde elde edilmiştir ve ardından literatür taraması yapılarak bakır (II) tespiti yapabilen farklı metotlara ait tespit limiti verileri araştırılmıştır.

<b>Tespit Limiti</b>	<b>Lineer Aralık</b>	<b>Tespit Yöntemi</b>	<b>Referans</b>
50 $\mu\text{M}$	10-500 $\mu\text{M}$	Altın-Nanoparçacık	Zhou ve ark., 2008
0.226 $\mu\text{M}$	0-15 $\mu\text{M}$	Grafen Kuantum Noktaları	Wang ve ark., 2014
0,15 $\mu\text{M}$	0-2 mM	Fonksiyonelleştirilmiş Kompozit Adsorban	Awual, 2015
50 nM	0-5 $\mu\text{M}$	Yakın-Kızılötesi Floresan Prob	Li ve ark., 2011
30 nM	0 -10 $\mu\text{M}$	ThT-G-quadrupleks	Bu çalışma
5 nM	0-100 $\mu\text{M}$	CdSe Kuantum Noktaları	Chan ve ark., 2010

Tablo 4.2. Bakır (II) İyonunun Tespiti İçin Farklı Analitik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Tablo 4.2’de farklı metotlar ile elde edilen lineer aralıklar ve tespit limitleri görülmektedir. Tabloda yer alan farklı metotların çoğu ön bir hazırlanma sürecine ve yüksek maliyetli ekipmanlar gerektirmektedir. Örneğin CdSe kuantum noktalar ile yapılan bakır (II) tespiti için gümüş nanoprizmaların, kadmiyum selenidin ve farklı

yapıların UV ozon altında cam yüzeylere immobilizasyonunun ardından iyon tespiti işlemlerine geçilebilmektedir. Uzun ön işlem aşamalarına sahip metotlar hem ekipman açısından hem de zaman ve maliyet açısından ölçümlere kısıtlamalar getirebilmektedir. Buradaki örnekte olduğu gibi uzun bir ön işlem aşaması kısmına gerek duymayan tasarladığımız metot eş zamanlı olarak yüksek hassasiyetle ve hızlı bir biçimde sonuç oluşturmakta ve iyon tespitini anında gerçekleştirebilmektedir. Düşük tespit limitine, yüksek hassasiyete ve düşük maliyete sahip olan bu metot kullanılabilir en avantajlı yöntemlerden birisi haline gelmektedir.

Floresan sönümlenme üzerinde katyonik bakır (II) iyonuna analit olabilecek katyon yapıdaki farklı iyonların nasıl bir etkisinin olduğunun görülebilmesi için 0 ile 100  $\mu\text{M}$  arasında değişen konsantrasyonlarda iyonlar ile floresan sönümlenme deneyi yapılmıştır. Şekil 4.17'de toplu bir şekilde görülebilen floresan sönümlenmedeki artış oranları incelendiğinde bakır (II) dışında kalan tüm iyonların 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda bile 3 birim artış sağlamışken, bakır (II) iyonu 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda 3 birime ulaşmış ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda bu rakam 30'a ulaşmıştır. Bakır (II) iyonunda düşük konsantrasyonlarda dahi görülen önemli floresan yoğunluğu değişimi diğer iyonların hiçbirinde gerçekleşmemiştir ve neredeyse hiçbir iyon ile floresan sönümlenme tam olarak sağlanamamıştır.

Farklı konsantrasyonlarda bakır (II) iyonu ile birlikte diğer tüm iyonların floresan sönümlenme üzerindeki etkilerinin net bir şekilde görülebilmesi için 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlar seçilerek bu konsantrasyonlarda tüm iyonların sönümlenme artış oranları incelenmiştir. Şekil 4.18'teki grafikte, her bir konsantrasyonda bakır (II) iyonunun floresan sönümlenme oranını en çok artıran iyon olduğu görülmektedir. Her konsantrasyon artışı ile birlikte floresan sönümlenme oranındaki artış büyümekte fakat sonuçlar diğer iyonlar için değişmemektedir. Bu grafiklerden de anlaşılacağı üzere tasarlanan algılama sistemi bakır (II) iyonlarına çok yüksek oranda özgündür ve diğer iyonlara göre bakır (II) iyonu kolaylıkla ayırt edilebilecek kadar büyük bir floresan sönümlenme oranına sahiptir.

Vücut içerisindeki sistemler ya da doğal çevre ortamı düşünüldüğünde bakır (II) iyonunun tek olarak bulunmadığı ve diğer iyonlar ile etkileşim halinde olduğu birçok ortam bulunduğundan bakır (II) iyonunun ortamda diğer iyonlar bulunuyorken de

seçiciliği araştırılmıştır. Oluşabilecek herhangi bir değişimin net bir şekilde gözlemlenebilmesi için tam olarak sönümlemeyi sağlamayan 4  $\mu\text{M}$  bakır (II) konsantrasyonu seçilmiştir ki sönümleme üzerinde diğer iyonları katkısı ne kadar olacak anlaşılabilir. Floresan yoğunluğundaki değişim oranları esas alınarak oluşturulan Şekil 4.19'deki grafiklerde floresan yoğunluğunda bakır ile birlikte hiçbir iyonun yüksek bir floresan yoğunluğu sönümlemesine neden olmadığı açıkça görülebilmektedir. Kompleks sistemler düşünüldüğünde herhangi bir yapı içerisinde bakır (II) iyonu ile birlikte herhangi başka iyonların da bulunması floresan yoğunluğunda büyük bir değişikliğe sebep oluşturmamaktadır.

Spektroskopi tekniklerinden biri olan üç boyutlu floresan spektroskopisi tekniği üç boyutlu bir tarama yöntemi olup, uyarma ve emisyon dalga boyuna karşı floresan yoğunluğunun dağılım grafiği ile sonuçlanmaktadır. Hem floresan spektrumu hem de absorpsiyonu aynı anda ölçerek bir numunedeki toplam floresan yoğunluğu modeli ortaya çıkarmaktadır. Uyarma-emisyon matriksi ya da floresan parmak izi olarak da adlandırılan bu yöntem genellikle kromoforik çözülmüş organik maddelerin incelenmesi için ve özellikle de suyun kalite analizi için kullanılmaktadır (Sugiyama ve ark., 2013). Farklı uyarma ve emisyon dalga boylarında ThT, G-quadrupleks DNA ve bakır (II) iyonlarının kombinasyonları ile floresan yoğunluğunun artması ya da söndürülmesinin; uyarma ve emisyon aralıklarında oluşturduğu farklılıkların açıkça görülebilmesi amaçlanmıştır. Şekil 4.20.a ve Şekil 4.20.b'de görülen sonuçlara göre ThT-bakır ve ThT-G-quadrupleks kompleksleri absorpsiyon spektrumlarında bir değişikliğe neden olmamıştır. Şekil 4.20.c'de görüldüğü gibi ThT ve G-quadrupleks kompleksi spektrumunda 2 bölgede özel pikler oluşturmuştur. Uyarma dalga boyu hem 400-500 aralığında büyük bir pik oluşmuştur hem de 200-300 aralığında bir pik oluşmuştur. ThT'nin deneyler boyunca ölçümü alınan dalga boyları da 400-500 uyarma dalga boyu bandında bir pik oluşturduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca heterosiklik bir yapıya da sahip olan ThT, G-quadrupleks DNA yapısıyla bir araya gelince de 200-300 nm bandında bir pik oluşturmuştur. Oluşan her iki pik de ThT molekülünün G-quadrupleks yapıyla olan etkileşimi doğrultusunda meydana gelmiştir. Şekil 4.20.d'de ise ortamda hem G-quadrupleks DNA'nın hem de bakır (II) iyonunun bulunması ile birbirlerine özgün olan iki molekül kompleks oluşturmuşlardır ve G-quadrupleks DNA'dan ayrılıp tek hale dönen ThT'nin varlığı bile absorpsiyon spektrumunda bir pik

oluşmasını sağlayamamıştır. Sönümlenme mekanizmasının rahatça anlaşılabilirdiği bu deney sonuçları sayesinde, ThT'nin G-quadrupleks yapıyla özgün bir şekilde bağlanarak floresan yoğunluğunda artışa sebep olduğu, ortamda G-quadrupleks yapının bulunduğu durumda ise sistemden çıkarılarak floresan yoğunluğunun sönümlendiği ve ThT'nin kendiliğinden floresan bir özelliği bulunmadığı görülmektedir.

Yapılan deneyler neticesinde başarılı olduğu anlaşılan algılama sistemi ile su numunelerindeki bakır oranlarının ölçülmesi istenmiştir. Bu doğrultuda Karaman ili şebeke sularından iki farklı bölgeden numuneler toplanmıştır ve bu numuneler ile G-quadrupleks DNA, ThT ve bakır (II) iyonları deneylerde kullanılan konsantrasyonları kullanılarak algılama sisteminin ana deneyleri yapılmıştır ve ölçüm sonuçları alınmıştır. Ardından absorpsiyon sonuçları Şekil 4.4.b'de yer alan denklem içerisinde yerine konmuş ve x faktörü hesaplanarak bakır (II) iyonunun su numunelerindeki konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonların birbirilerine benzerlik oranı yüzdelik olarak da ayrıca ifade edilmiştir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi elde edilen bakır (II) iyonu ölçüm sonuçları çok yüksek oranda referans ve yüzdelik değerler ile benzerlik oranlarının güven sınırları içerisinde bulunduğu görülmektedir. Bu sonuçlar neticesinde tasarlanan algılama sisteminin su numunelerinde bakır (II) iyonu tespitinde kullanılabileceği ve elde edilecek sonuçların da referans değerlere çok yakın değerler olduğu görülmüştür.

Su numuneleri ile yapılan başarılı ölçümlerin ardından floresan sönümlenme mekanizmasının UV spektral ölçümleri ile pekiştirilmesi amaçlanmıştır. Şekil 4.21'de UV spektral tarama sonuçları görülmektedir. Bu sonuca göre ThT yalnız başına 410-420 nm bandında yüksek bir pik oluşturmuştur. Bakır (II) iyonu yalnız başına çok düşük bir absorpsiyon göstermiş ve herhangi bir yerde pik oluşturmayan bir sonuç vermiştir. ThT ile bir arada bulunmayan G-quadrupleks DNA dizisi ise DNA yapısının pik verdiği 260 nm'de beklenen bir şekilde bir pik oluşturmuştur. ThT ile G-quadrupleks DNA'nın bulunduğu fakat hiç bakır (II) iyonunun bulunmadığı numunede ThT pikinde bir değişiklik görülmemişken 260 nm'deki pikte de yine neredeyse sadece G-quadrupleks DNA'da görülen bir pik görülmüştür. Fakat ortamdaki bakır (II) iyonu arttıkça ThT için olan 410-420 nm'de bir değişiklik gözlemlenmezken DNA için olan 260 nm kısmında kademeli olarak bir artış görülmüştür. DNA yapısındaki fosfodiester bağlarının uyarılması ile absorpsiyonunun alındığı 260 nm dalga boyunda, DNA tek zincirli hale geçtiğinde çift zincirli ya da quadrupleks halinden daha yüksek absorpsiyon

göstermektedir (D'Abramo ve ark., 2013). Hiperkromik kayma olarak adlandırılan bu mekanizma sayesinde ortamda bakır (II) iyonu konsantrasyonu arttıkça ThT'den ayrılan G-quadrupleks DNA yapısı artmakta ve bakır (II) iyonları ile özgün bir bağlanma yaparak tek zincirli hale geçtiği desteklenmektedir.

Floresan yoğunluğu bakır (II) iyonu konsantrasyonu arttıkça değişiminin görüntülenmesi amacıyla 0, 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda bakır (II) iyonu bulunan 6 tüp hazırlanmıştır. Jel görüntüleme analizinin yapıldığı cihazda Cy2 metodu ile görüntüleme yapılmıştır. ThT için en yakın dalga boyu aralıklarına sahip olan 480 nm uyarma ve 510 nm emisyon aralıklarına sahip metot kullanılarak ThT'nin uyarma ve emisyon aralıklarının en yakın olduğu aralıklar görüntüleme için seçilmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi içerisinde hiç bakır (II) iyonu bulunmayan numunedeki floresan yoğunluğu çok keskin ve yüksektir. 1  $\mu\text{M}$  bakır (II) iyonunun dahi ortamda bulunması ile floresan yoğunluğunda ciddi bir azalma ve renk değişimi gözlemlenmiştir. Bakır (II) konsantrasyonu arttıkça floresan yoğunluğu çok hızlı bir şekilde azalmış ve beklenen üzere 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ve daha sonrasında floresan sönümlenme tamamen gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan hareketle sistemin hızlı, hassas ve güvenilir olarak bakır (II) iyonlarının tespitini yapabildiği bir kez daha görülmüştür. Yapılan çalışmanın ilerletilmesi halinde yakın gelecekte cep telefonlarına bile yüklenebilecek bir uygulama sayesinde floresan yoğunluğu değişiminden yola çıkılarak bir numunedeki bakır (II) iyonunun tespiti yapılabilecek seviyeye gelebilir. Yapılan çalışma bu açıdan umut verici olmuştur.

Deney sonuçlarının hepsinde görülen floresan yoğunluğu artışı ve sönümlenmesi fenomeninin agaroz jel görüntüleme çalışmalarıyla pekiştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntem ile içerisinde DNA bulunmayan bir kombinasyon herhangi bir sonuç alınamayacağı için kullanılmamıştır. Tüm kombinasyonların içerisinde G-quadrupleks DNA bulunmaktadır. Şekil 4.23'de 10 dakikada alınan jel görüntüleme sonucu görülmektedir. İlk kuyucukta 25 baz çifti uzunluğunda DNA cetveli bulunmaktadır. DNA cetvelinin kısa tercih edilmesinin sebebi kullanılan G-quadrupleks DNA dizisinin baz çiftine yakın sayıda olmasıdır. Diğer tüm kuyucuklarda yürütme boyası ile birlikte diğer bileşenler kullanılmıştır. İkinci kuyucukta G-quadrupleks DNA, üçüncü kuyucukta G-quadrupleks DNA ve ThT, dördüncü kuyucukta G-quadrupleks DNA ve bakır (II), beşinci kuyucukta G-quadrupleks DNA, ThT ve bakır (II) ve son olarak



altıncı kuyucukta negatif olarak yalnızca yürütme boyası kullanılmıştır. Jel görüntüsü sonucunun 10 dakika sonra elde edilmesinin sebebi kullanılan G-quadrupleks DNA dizisinin kısa olması ve ilerleyen dakikalardaki jel görüntülemelerinde netliğinin kaybolmasıdır. Elde edilen jel görüntüsünden anlaşılacağı üzere ThT içeren kuyucuklarda sürüklenme meydana gelmiştir ve daha geç yürüme gözlemlenmiştir ve bu sonuç ThT'nin G-quadrupleks yapıya bağlandığını destekler niteliktedir. ThT'nin bulunmadığı kuyucuklarda ise yürüme daha çok olmuştur ve sürüklenme görülmemiştir. G-quadrupleks DNA-ThT-Bakır (II) kombinasyonunda ise görüntü açısından bir fark görülmemekle birlikte yine sürüklenme ve geç yürüme olduğu anlaşılmıştır.

## 5.2 Sonuç

Sonuç olarak bakır (II) iyonunun hızlı, etiketsiz, güvenilir ve düşük maliyetli tespiti için G-quadrupleks oluşumuna dayanan bir algılama sistemi tasarlanmış ve başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bakır (II) iyonunun hassas tespiti için, guanin nükleotidince zengin, bakır (II) iyonuna yüksek seçicilik gösteren bir DNA dizisi ile Thioflavin T'nin G-quadrupleks yapı oluşturmasını ve ardından da bakır (II) iyonu eklenerek bu yapının eski haline dönmesini temel alan etiketsiz bir algılama sistemi geliştirilmiştir. Guanin nükleotidi yönünden zengin dizi ThT ile karşılaştığında G-quadrupleks yapıları oluşturmakta ve floresan kuantum veriminde önemli bir artış sağlamaktadır. Fakat daha yüksek seçicilik gösterdiği bakır (II) iyonu ortamda bulunduğunda, bakır (II) iyonuna bağlanabilmek için G-quadrupleks yapıdan ayrılmakta ve bu da floresan kuantum veriminde düşüşe yani sönmeye neden olmaktadır. Bakır (II) iyonuna yüksek hassasiyet gösteren bu sistem sayesinde nanomolar seviyelerde bakır (II) iyonu analizine olanak sağlanmıştır. Bu sönmeye mekanizması sayesinde sönmeye oranına bakılarak bakır (II) iyonu tespiti yapılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar yardımıyla oluşturulan standart grafikler sayesinde bir numunede ne kadar bakır (II) iyonunun bulunduğu tespit etmek için absorbans değerinin bilinmesine dayanan bir denklem kurulmuştur. Bu sayede absorbans değeri yardımıyla o numunedeki bakır (II) iyonu miktarı yüksek hassasiyet ve doğruluk oranıyla bulunabilmektedir. Yine bu sayede sistemin hassasiyeti ile ilgili hesaplamalar yapılmış ve sistemin 30 nM tespit limiti ve 100 nM tayin limitine sahip olduğu görülmüştür. Bakır (II) iyonu tespiti için kullanılan diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında oldukça düşük tespit ve tayin limitlerine sahip olan sistemin zaman, maliyet ve ekipman açısından birçok avantaja sahip olduğu

görülmüştür. Çevresel şartlar göz önüne alındığında, bakır (II) iyonunun farklı ağır metaller ile birlikte sönümlenme oranının büyük bir oranda etkilenmemesi sistemin farklı çevrelerde ve başka iyonların varlığında da bakır (II) iyonlarına seçicilik gösterdiğini açıkça göstermektedir. Ayrıca bu algılama sistemiyle farklı su numunelerindeki bakır (II) iyonu oranının yüksek doğruluk oranıyla tespit edilebilmesi, hatta bazı ölçümlerde çok yüksek doğrulukta bir geri kazanım oranına sahip olması; bu sistemin su numunelerinden bakır (II) analizi yapılmak amacıyla rahatlıkla kullanılabilceğini göstermektedir.

Canlılar için hayati öneme sahip olan, yüksek konsantrasyonlarda maruz kalındığında oldukça toksik ve hatta ölümcül etkilere sebep olabilen bakır (II) iyonunun canlılar ile temasının birincil kaynaklarından olan su ekosistemlerinden alınacak bir numune ile doğrudan bakır (II) iyonu analizi yapılabilmektedir. Öyle ki ileride telefonlarda bile kullanılabilceği öngörülen çeşitli programlar vasıtasıyla bu çalışmanın doğrudan yapılabilecek seviyede olması gelecek çalışmalar için de umut vericidir. Son yılların gelişmekte olan algılama sistemi tekniklerinden birisi olan G-quadrupleks tabanlı algılama sistemi; bakır (II) iyonunun hassasiyetle, hızlı ve güvenilir ölçümlerine olanak sağlayarak algılama sistemlerinde kullanılabilirliğini bir kez daha kanıtlamıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adelstein, S., & Vallee, B. (1961). Copper metabolism in man. *New England Journal of Medicine*, 265(18), 892-897.
- Ahmed, K. O., Al-Swaidan, H. M., & Davies, B. (1993). Simultaneous elemental analysis in dust of the city of Riyadh, Saudi Arabia by inductively coupled plasma—mass spectrometry (ICP/MS). *Science of the Total Environment*, 138(1-3), 207-212.
- Al-Hassan, K. A., & Khanfer, M. F. (1998). Fluorescence probes for cyclodextrin interiors. *Journal of Fluorescence*, 8(2), 139-152.
- Allen, B. D., Benniston, A. C., Harriman, A., Rostron, S. A., & Yu, C. (2005). The photophysical properties of a julolidene-based molecular rotor. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(16), 3035-3040.
- Allen, T. M., & LaMont, R. (1982). Skeletal changes associated with copper deficiency. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(168), 206-210.
- Amdursky, N., & Huppert, D. (2012). Auramine-O as a fluorescence marker for the detection of amyloid fibrils. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(45), 13389-13395.
- Anonim. ATSDR. (2004). Toxicological profile for copper. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry New York.
- Anonim. EFSA Panel on Dietetic Products, N., & Allergies. (2013). Scientific opinion on dietary reference values for manganese. *EFSA Journal*, 11(11), 3419.
- Anonim. FDA, U. (2000). Total diet study statistics on element results. US Food and Drug Administration, Washington.
- Anonim. Organization, W. H. (1996). Trace elements in human nutrition and health.
- Anonim. Organization, W. H. (2004). Guidelines for drinking-water quality (Vol. 1): World Health Organization.
- Anonim. Principles, W. (2002). Methods for the Assessment of Risk from Essential Trace Elements. *Environmental Health Criteria Geneva: World Health Organization*.
- Anonim. Star, E. United States Environmental Protection Agency.(2008). Frequently asked questions: Information on compact fluorescent light bulbs (CFLs) and mercury. In.
- Apte, S., Gardner, M., & Ravenscroft, J. (1990). An investigation of copper complexation in the Severn Estuary using differential pulse cathodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry*, 29, 63-75.

- Arthanari, H., Basu, S., Kawano, T. L., & Bolton, P. H. (1998). Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA. *Nucleic acids research*, 26(16), 3724-3728.
- Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J., & Wapstra, A. (2003). The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nuclear Physics A*, 729(1), 3-128.
- Awual, M. R. (2015). A novel facial composite adsorbent for enhanced copper (II) detection and removal from wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 266, 368-375.
- Azargun, M., & Fridgen, T. D. (2015). Guanine tetrads: an IRMPD spectroscopy, energy resolved SORI-CID, and computational study of M (9-ethylguanine) 4+(M= Li, Na, K, Rb, Cs) in the gas phase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(39), 25778-25785.
- Baker, A. (2002). Fluorescence properties of some farm wastes: implications for water quality monitoring. *Water Research*, 36(1), 189-195.
- Baker, A., & Spencer, R. G. (2004). Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 333(1-3), 217-232.
- Balthazar, J. W. (1990). Copper and Bronze Working in Early through Middle Bronze Age Cyprus.
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Copper. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*.
- Barkay, T., Tripp, S. C., & Olson, B. H. (1985). Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(2), 333-337.
- Bates, D., Levick, J., & Mortimer, P. (1993). Change in Macro Molecular Composition of Interstitial Fluid from Swollen Arms after Breast Cancer Treatment, and Its Implications. *Clinical Science*, 85(6), 737-746.
- Beavington, F. (1977). Trace elements in rainwater and dry deposition around a smelting complex. *Environmental Pollution* (1970), 13(2), 127-131.
- Bedrat, A., Lacroix, L., & Mergny, J.-L. (2016). Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1746-1759.
- Beens, H., & Weller, A. (1975). Excited molecular  $\pi$ -complexes in solution. *Organic Molecular Photophysics*, 2, 159-215.
- Belton, J. C., Benson, N. C., Hanna, M. L., & Taylor, R. T. (1985). Growth inhibitory and cytotoxic effects of three arsenic compounds on cultured Chinese hamster ovary cells. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 20(1), 37-72.
- Bennet, M. A., Richardson, P. R., Arlt, J., McCarthy, A., Buller, G. S., & Jones, A. C. (2011). Optically trapped microsensors for microfluidic temperature

- measurement by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Lab on a Chip*, 11(22), 3821-3828.
- Bertinato, J., & L'Abbé, M. R. (2004). Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(6), 316-322.
- Beshgetoor, D., & Hambidge, M. (1998). Clinical conditions altering copper metabolism in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 1017S-1021S.
- Bhasikuttan, A. C., & Mohanty, J. (2015). Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors. *Chemical Communications*, 51(36), 7581-7597.
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405-1412.
- Biurrun, A., Caballero, L., Pelaz, C., León, E., & Gago, A. (1999). Treatment of a *Legionella pneumophila*-colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 20(6), 426-428.
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*, 13(11), 770.
- Bowen, H. J. (1985). *The Handbook of Environmental Chemistry. 1, The Natural Environment and the Biogeochemical Cycles*: D: Springer.
- Bradl, H. (2005). *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation (Vol. 6)*: Elsevier.
- Breslin, V. T. (1999). Retention of metals in agricultural soils after amending with MSW and MSW-biosolids compost. *Water, Air, and Soil Pollution*, 109(1-4), 163-178.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 5402-5415.
- Capone, D. G., Reese, D. D., & Kiene, R. P. (1983). Effects of metals on methanogenesis, sulfate reduction, carbon dioxide evolution, and microbial biomass in anoxic salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(5), 1586-1591.
- Carstea, E. M., Bridgeman, J., Baker, A., & Reynolds, D. M. (2016). Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: a review. *Water Research*, 95, 205-219.

- Cazeau-Dubroca, C., Peirigua, A., Lyazidi, S. A., & Nouchi, G. (1983). Twisted internal charge transfer fluorescence of para-N, N-dimethylaminobenzonitrile in rigid matrix at room temperature. *Chemical Physics Letters*, 98(5), 511-514.
- Chambers, V. S., Marsico, G., Boutell, J. M., Di Antonio, M., Smith, G. P., & Balasubramanian, S. (2015). High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nature Biotechnology*, 33(8), 877.
- Chan, Y.-H., Chen, J., Liu, Q., Wark, S. E., Son, D. H., & Batteas, J. D. (2010). Ultrasensitive copper (II) detection using plasmon-enhanced and photo-brightened luminescence of CdSe quantum dots. *Analytical Chemistry*, 82(9), 3671-3678.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., . . . Zhao, F. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 163(2), 109-120.
- Cioffi, N., Ditaranto, N., Torsi, L., Picca, R., Sabbatini, L., Valentini, A., . . . Zambonin, P. (2005). Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(3), 607-616.
- Cloe, A. L., Orgel, J. P., Sachleben, J. R., Tycko, R., & Meredith, S. C. (2011). The Japanese Mutant A $\beta$  ( $\Delta$ E22-A $\beta$ 1-39) Forms Fibrils Instantaneously, with Low-Thioflavin T Fluorescence: Seeding of Wild-Type A $\beta$ 1-40 into Atypical Fibrils by  $\Delta$ E22-A $\beta$ 1-39. *Biochemistry*, 50(12), 2026-2039.
- Connett, P. H., & Wetterhahn, K. E. (1983). Metabolism of the carcinogen chromate by cellular constituents. In *Inorganic Elements in Biochemistry* (pp. 93-124): Springer.
- D'Abramo, M., Castellazzi, C. L., Orozco, M., & Amadei, A. (2013). On the nature of DNA hyperchromic effect. *The Journal of Physical Chemistry*, 117(29), 8697-8704.
- Davis, C. D., & Johnson, W. T. (2002). Dietary copper affects azoxymethane-induced intestinal tumor formation and protein kinase C isozyme protein and mRNA expression in colon of rats. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 1018-1025.
- De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J.-F., & Mergny, J.-L. (2008). Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie*, 90(1), 131-155.
- Demchenko, A. P. (2005). The future of fluorescence sensor arrays. *TRENDS in Biotechnology*, 23(9), 456-460.
- Demchenko, A. P., Mély, Y., Duportail, G., & Klymchenko, A. S. (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 96(9), 3461-3470.

- Domek, M. J., Lechevallier, M. W., Cameron, S. C., & McFETERS, G. A. (1984). Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(2), 289-293.
- Duffus, J. H. (2002). " Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793-807.
- Effler, S., Litten, S., Field, S., Tong-Ngork, T., Hale, F., Meyer, M., & Quirk, M. (1980). Whole lake responses to low level copper sulfate treatment. *Water Research*, 14(10), 1489-1499.
- Efstathiou, P. A. (2011). The role of antimicrobial copper surfaces in reducing healthcare associated infections. *Eur Infect Dis*, 5(2), 125-128.
- Eisele, Y. S., Monteiro, C., Fearn, C., Encalada, S. E., Wiseman, R. L., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2015). Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nature Reviews Drug discovery*, 14(11), 759.
- Elder, J. F., & Horne, A. J. (1978). Copper cycles and CuSO<sub>4</sub> algicidal capacity in two California lakes. *Environmental Management*, 2(1), 17-30.
- Elghetany, M. T., & Saleem, A. (1988). Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technology*, 63(4), 201-212.
- Elmer, P. (2000). An introduction to fluorescence spectroscopy. PerkinElmer Ltd Post Office Lane Beaconsfield Buckinghamshire HP9 1QA.
- Emsley, J. (2011). *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*: Oxford University Press.
- Ernst, E., Matria, A., Schmölzl, C., & Magyarosy, I. (1987). Dose—effect relationship between smoking and blood rheology. *British Journal of Haematology*, 65(4), 485-487.
- Etienne, M., Bessiere, J., & Walcarius, A. (2001). Voltammetric detection of copper (II) at a carbon paste electrode containing an organically modified silica. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 76(1-3), 531-538.
- Flemming, C., & Trevors, J. (1988). Copper retention and toxicity in a freshwater sediment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 40(3-4), 419-432.
- Flemming, C., & Trevors, J. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2), 143-158.
- Flemming, C., & Trevors, J. (1989). Copper toxicity in freshwater sediment and *Aeromonas hydrophila* cell suspensions measured using an O<sub>2</sub> electrode. *Toxicity Assessment*, 4(4), 473-485.
- Flora, S., Saxena, G., Gautam, P., Kaur, P., & Gill, K. D. (2007). Response of lead-induced oxidative stress and alterations in biogenic amines in different rat brain

- regions to combined administration of DMSA and MiADMSA. *Chemico-Biological Interactions*, 170(3), 209-220.
- Florence, T., Batley, G., & Benes, P. (1980). Chemical speciation in natural waters.
- Förstner, U., & Wittmann, G. T. (1979). Metal pollution in the aquatic environment. In: Springer-Verlag, Berlin.
- Frees, S., Menendez, C., Crum, M., & Bagga, P. S. (2014). QGRS-Conserve: a computational method for discovering evolutionarily conserved G-quadruplex motifs. *Human genomics*, 8(1), 8.
- Gabby, P. (2006). Lead: in mineral commodity summaries. Reston, VA: US, Geological Survey.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163.
- Galhardi, C. M., Diniz, Y. S., Faine, L. A., Rodrigues, H. G., Burneiko, R. C., Ribas, B. O., & Novelli, E. L. (2004). Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food and Chemical Toxicology*, 42(12), 2053-2060.
- Ge, J., Li, X.-P., Jiang, J.-H., & Yu, R.-Q. (2014). A highly sensitive label-free sensor for Mercury ion (Hg<sup>2+</sup>) by inhibiting thioflavin T as DNA G-quadruplexes fluorescent inducer. *Talanta*, 122, 85-90.
- George, L., & Edmund, H. (1992). Encyclopedia of applied physics. 4: Combustion to Diamagnetism. In: VCH Publishers.
- Giancola, C., & Montesarchio, D. (2017). Not unusual, just different! Chemistry, biology and applications of G-quadruplex nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(5 Pt B), 1201.
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319(6055), 618.
- Giurgiu, C., Wright, T. H., O'Flaherty, D. K., & Szostak, J. W. (2018). A Fluorescent G-Quadruplex Sensor for Chemical RNA Copying. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(31), 9844-9848.
- Gogoleva, S. D., Kalganova, E. V., Maskevich, A. A., Lugovski, A. A., Kuzmitsky, V. A., Goswami, M., . . . Stsiapura, V. I. (2018). Neutral derivatives of Thioflavin T do not exhibit viscosity-dependent fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 358, 76-91.
- Gomez, D., Paterski, R., Lemarteleur, T., Shin-ya, K., Mergny, J.-L., & Riou, J.-F. (2004). Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. *Journal of Biological Chemistry*.



- Grabowski, Z. R., Rotkiewicz, K., & Rettig, W. (2003). Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chemical reviews*, 103(10), 3899-4032.
- Grabowski, Z. R., Rotkiewicz, K., & Siemiarczuk, A. (1979). Dual fluorescence of donor-acceptor molecules and the twisted intramolecular charge transfer (TICT) states. *Journal of Luminescence*, 18, 420-424.
- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *Journal of chemical biology*, 3(1), 1-18.
- Guedin, A., Gros, J., Alberti, P., & Mergny, J.-L. (2010). How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic acids research*, 38(21), 7858-7868.
- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., Mahaffey, K. R., & Taylor, A. J. (2001). Dietary intakes of selected elements from longitudinal 6-day duplicate diets for pregnant and nonpregnant subjects and elemental concentrations of breast milk and infant formula. *Environmental research*, 87(3), 160-174.
- Guo, K., Pan, Q., Wang, L., & Fang, S. (2002). Nano-scale copper-coated graphite as anode material for lithium-ion batteries. *Journal of Applied Electrochemistry*, 32(6), 679-685.
- Guo, Y., Yao, W., Xie, Y., Zhou, X., Hu, J., & Pei, R. (2016). Logic gates based on G-quadruplexes: principles and sensor applications. *Microchimica Acta*, 183(1), 21-34.
- Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Timur, S., & Metalurji, İ. T. Ü. (2004). Metallerin çevresel etkileri-III. *Metalurji Dergisi*, 138, 64-71.
- Haidekker, M., Brady, T., Lichlyter, D., & Theodorakis, E. (2005). Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 33(6), 415-425.
- Haidekker, M. A., L'Heureux, N., & Frangos, J. A. (2000). Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278(4), H1401-H1406.
- Haidekker, M. A., & Theodorakis, E. A. (2007). Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(11), 1669-1678.
- Haidekker, M. A., & Theodorakis, E. A. (2010). Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *Journal of Biological Engineering*, 4(1), 11.
- Haidekker, M. A., & Theodorakis, E. A. (2016). Ratiometric mechanosensitive fluorescent dyes: design and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(14), 2707-2718.

- Hardin, C. C., Perry, A. G., & White, K. (2000). Thermodynamic and kinetic characterization of the dissociation and assembly of quadruplex nucleic acids. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 56(3), 147-194.
- Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., & Bailey, C. (1992). Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d (CGCG3GCG). *Biochemistry*, 31(3), 833-841.
- Harkness, J. (1971). The viscosity of human blood plasma; its measurement in health and disease. *Biorheology*, 8(3-4), 171-193.
- Harvey, L. J., & McArdle, H. J. (2008). Biomarkers of copper status: a brief update. *British Journal of Nutrition*, 99(S3), S10-S13.
- Hawe, A., Filipe, V., & Jiskoot, W. (2010). Fluorescent molecular rotors as dyes to characterize polysorbate-containing IgG formulations. *Pharmaceutical research*, 27(2), 314-326.
- Hawkes, S. J. (1997). What is a "heavy metal"? *Journal of Chemical Education*, 74(11), 1374.
- Haynes, W. M. (2014). *CRC handbook of chemistry and physics*: CRC press.
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 125-140.
- Health, U. D. o., & Services, H. (1997). NIOSH pocket guide to chemical hazards. In *Niosh Pocket Guide to Chemical Hazards*: US Department of Health and Human Services.
- Heilkenbrinker, A., Reinemann, C., Stoltenburg, R., Walter, J.-G., Jochums, A., Stahl, F., . . . Scheper, T. (2014). Identification of the target binding site of ethanolamine-binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection. *Analytical Chemistry*, 87(1), 677-685.
- Hiroki, Y., Kadzunori, T., & Tosiharu, U. (1985). Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(6), 785-790.
- Hobbs, J., & Morgan, A. (1963). Fluorescence microscopy with thioflavine-T in the diagnosis of amyloid. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 86(2), 437-442.
- Hosny, N. A., Mohamedi, G., Rademeyer, P., Owen, J., Wu, Y., Tang, M.-X., . . . Kuimova, M. K. (2013). Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9225-9230.
- Howie, A. J., Brewer, D. B., Howell, D., & Jones, A. P. (2008). Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light. *Laboratory Investigation*, 88(3), 232.

- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133(1), 1-16.
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*, 33(9), 2908-2916.
- Hutter, T., Amdursky, N., Gepshtein, R., Elliott, S. R., & Huppert, D. (2011). Study of Thioflavin-T immobilized in porous silicon and the effect of different organic vapors on the fluorescence lifetime. *Langmuir*, 27(12), 7587-7594.
- Jacobs, J. A., & Testa, S. M. (2005). Overview of chromium (VI) in the environment: background and history. *Chromium (VI) Handbook*, 1-21.
- Jameson, D. M. (2014). *Introduction to fluorescence*: CRC press.
- Jin, B., Zhang, X., Zheng, W., Liu, X., Qi, C., Wang, F., & Shanguan, D. (2013). Fluorescence light-up probe for parallel G-quadruplexes. *Analytical Chemistry*, 86(1), 943-952.
- Johnson, D., Callis, J., & Christian, G. (1977). Rapid scanning fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 49(8), 747A-757A.
- Johnson, J., Okyere, R., Joseph, A., Musier-Forsyth, K., & Kankia, B. (2012). Quadruplex formation as a molecular switch to turn on intrinsically fluorescent nucleotide analogs. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 220-228.
- Johnson, M., & Larry, E. (2008). Copper. *Merck manual home health handbook*. Merck Sharp and Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co. In: Inc.
- Karim, N. (2018). *Copper and Human Health-A Review*.
- Keliényi, G. (1967). On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 15(3), 172-180.
- Kerwin, S. M. (2000). G-quadruplex DNA as a target for drug design. *Current Pharmaceutical Design*, 6(4), 441-471.
- Kitts, C. C., Beke-Somfai, T. s., & Nordén, B. (2011). Michler's hydrol blue: a sensitive probe for amyloid fibril detection. *Biochemistry*, 50(17), 3451-3461.
- Klein, W. J., Metz, E. N., & Price, A. R. (1972). Acute copper intoxication: a hazard of hemodialysis. *Archives of Internal Medicine*, 129(4), 578-582.
- Klunk, W. E., Wang, Y., Huang, G.-f., Debnath, M. L., Holt, D. P., & Mathis, C. A. (2001). Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sciences*, 69(13), 1471-1484.
- Klymchenko, A. S., & Mely, Y. (2013). Fluorescent environment-sensitive dyes as reporters of biomolecular interactions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 113, pp. 35-58): Elsevier.

- Knobeloch, L., Schubert, C., Hayes, J., Clark, J., Fitzgerald, C., & Fraundorff, A. (1998). Gastrointestinal upsets and new copper plumbing--is there a connection? *WMJ: Official Publication of the State Medical Society of Wisconsin*, 97(1), 49-53.
- Kong, L., Xu, J., Xu, Y., Xiang, Y., Yuan, R., & Chai, Y. (2013). A universal and label-free aptasensor for fluorescent detection of ATP and thrombin based on SYBR Green Idye. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 193-197.
- Kosower, E. M., & Dodiuk, H. (1976). Multiple fluorescences. II. A new scheme for 4-(N, N-dimethylamino) benzonitrile including proton transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 98(4), 924-929.
- Kotani, R., Sotome, H., Okajima, H., Yokoyama, S., Nakaike, Y., Kashiwagi, A., . . . Osuka, A. (2017). Flapping viscosity probe that shows polarity-independent ratiometric fluorescence. *Journal of Materials Chemistry C*, 5(21), 5248-5256.
- Kowada, T., Maeda, H., & Kikuchi, K. (2015). BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chemical Society Reviews*, 44(14), 4953-4972.
- Kozin, L. F., & Hansen, S. C. (2013). *Mercury Handbook: chemistry, applications and environmental impact*: Royal Society of Chemistry.
- Köhler, G., Wolschann, P., & Rotkiewicz, K. (1992). Solvent Effects on Intramolecular Charge Separation. Paper presented at the Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences.
- Kuimova, M. K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(37), 12671-12686.
- Kumar, S., Singh, A. K., Krishnamoorthy, G., & Swaminathan, R. (2008). Thioflavin T displays enhanced fluorescence selectively inside anionic micelles and mammalian cells. *Journal of Fluorescence*, 18(6), 1199-1205.
- Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*: Springer Science & Business Media.
- Lee, S.-C., Heo, J., Ryu, J.-W., Lee, C.-L., Kim, S., Tae, J.-S., . . . Kwon, O.-P. (2016). Pyrrolic molecular rotors acting as viscosity sensors with high fluorescence contrast. *Chemical Communications*, 52(94), 13695-13698.
- Lee, S. C., Heo, J., Woo, H. C., Lee, J. A., Seo, Y. H., Lee, C. L., . . . Kwon, O. P. (2018). Fluorescent molecular rotors for viscosity sensors. *Chemistry—A European Journal*, 24(52), 13706-13718.
- Lee, W.-E., Lee, C.-L., Sakaguchi, T., Fujiki, M., & Kwak, G. (2011). Fluorescent viscosity sensor film of molecular-scale porous polymer with intramolecular  $\pi$ -stack structure. *Macromolecules*, 44(3), 432-436.

- Leinhos, U., Kuehnle, W., & Zachariasse, K. A. (1991). Intramolecular charge transfer and thermal exciplex dissociation with p-aminobenzonitriles in toluene. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(5), 2013-2021.
- Lenntech, W. (2009). Chemical Properties, Health and Environmental Effects of Copper. Lenntech Water Treatment and Purification Holding BV [www.lenntech.com/periodic/elements/cu.htm](http://www.lenntech.com/periodic/elements/cu.htm).
- Letcher, R. L., Chien, S., Pickering, T. G., Sealey, J. E., & Laragh, J. H. (1981). Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects: role of fibrinogen and concentration. *The American Journal of Medicine*, 70(6), 1195-1202.
- Letelier, M. E., Lepe, A. M., Faúndez, M., Salazar, J., Marín, R., Aracena, P., & Speisky, H. (2005). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 151(2), 71-82.
- Leung, K.-H., He, H.-Z., Ma, V. P.-Y., Yang, H., Chan, D. S.-H., Leung, C.-H., & Ma, D.-L. (2013). A G-quadruplex-selective luminescent switch-on probe for the detection of sub-nanomolar human neutrophil elastase. *RSC Advances*, 3(6), 1656-1659.
- LeVine III, H. (1999). [18] Quantification of  $\beta$ -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. In *Methods in Enzymology* (Vol. 309, pp. 274-284): Elsevier.
- Li, P., Duan, X., Chen, Z., Liu, Y., Xie, T., Fang, L., ... & Tang, B. (2011). A near-infrared fluorescent probe for detecting copper (II) with high selectivity and sensitivity and its biological imaging applications. *Chemical Communications*, 47(27), 7755-7757.
- Lichlyter, D. J., & Haidekker, M. A. (2009). Immobilization techniques for molecular rotors—Towards a solid-state viscosity sensor platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139(2), 648-656.
- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., & Lomeli, N. (1998). Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 965S-971S.
- Lindgren, M., Sörgjerd, K., & Hammarström, P. (2005). Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 88(6), 4200-4212.
- Lippert, E., Lüder, W., Moll, F., Nägele, W., Boos, H., Prigge, H., & Seibold-Blankenstein, I. (1961). Umwandlung von elektronenanregungsenergie. *Angewandte Chemie*, 73(21), 695-706.
- Liu, G., Li, X., Qin, B., Xing, D., Guo, Y., & Fan, R. (2004). Investigation of the mending effect and mechanism of copper nano-particles on a tribologically stressed surface. *Tribology Letters*, 17(4), 961-966.

- Liu, H., Ma, C., Ning, F., Chen, H., He, H., Wang, K., & Wang, J. (2017). A facile label-free G-quadruplex based fluorescent aptasensor method for rapid detection of ATP. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 175, 164-167.
- Liu, X., Hua, X., Fan, Q., Chao, J., Su, S., Huang, Y.-Q., . . . Huang, W. (2015). Thioflavin T as an efficient G-quadruplex inducer for the highly sensitive detection of thrombin using a new foster resonance energy transfer system. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(30), 16458-16465.
- Locquet, N., Aït-Kaddour, A., & Cordella, C. B. (2006) 3D Fluorescence Spectroscopy and Its Applications. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1-39.
- Lopes, J., Piazza, A., Bermejo, R., Kriegsmann, B., Colosio, A., Teulade-Fichou, M. P., . . . Nicolas, A. (2011). G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *The EMBO Journal*, 30(19), 4033-4046.
- Lopez, J. M., & Lee, G. F. (1977). Environmental chemistry of copper in Torch Lake, Michigan. *Water, Air, and Soil Pollution*, 8(4), 373-385.
- Loutfy, R. O., & Law, K. Y. (1980). Electrochemistry and spectroscopy of intramolecular charge-transfer complexes. pN, N-dialkylaminobenzylidenemalononitriles. *The Journal of Physical Chemistry*, 84(21), 2803-2808.
- Loutfy, R. O., & Teegarden, D. M. (1983). Effect of polymer chain tacticity on the fluorescence of molecular rotors. *Macromolecules*, 16(3), 452-456.
- Lubitz, I., Zikich, D., & Kotlyar, A. (2010). Specific high-affinity binding of thiazole orange to triplex and G-quadruplex DNA. *Biochemistry*, 49(17), 3567-3574.
- Ma, C., Liu, H., Wang, J., Jin, S., & Wang, K. (2016). Label-free molecular beacon for real-time monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(12), 3275-3280.
- Ma, D. L., Ma, V. P. Y., Leung, K. H., Zhong, H. J., He, H. Z., Chan, D. S. H., & Leung, C. H. (2013). Structure-based approaches targeting oncogene promoter G-quadruplexes. *Oncogene and Cancer-From Bench to Clinic*, 131.
- Man, B. Y.-W., Chan, D. S.-H., Yang, H., Ang, S.-W., Yang, F., Yan, S.-C., . . . Leung, C.-H. (2010). A selective G-quadruplex-based luminescent switch-on probe for the detection of nanomolar silver (i) ions in aqueous solution. *Chemical Communications*, 46(45), 8534-8536.
- McHenry, R. (1992). *The New Encyclopaedia Britannica*, Chicago, Encyclopaedia Britannica. Inc, 1150pp.
- McIntosh, A., & Kevern, N. (1974). Toxicity of Copper to Zooplankton 1. *Journal of Environmental Quality*, 3(2), 166-170.

- McMillan, D. E. (1982). Further observations on serum viscosity changes in diabetes mellitus. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 31(3), 274-278.
- Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W. A., De Bièvre, P., Gröning, M., . . . Walczyk, T. (2016). Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 88(3), 265-291.
- Mergny, J.-L., Lacroix, L., Han, X., Leroy, J.-L., & Helene, C. (1995). Intramolecular folding of pyrimidine oligodeoxynucleotides into an i-DNA motif. *Journal of the American Chemical Society*, 117(35), 8887-8898.
- Mergny, J.-L., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S., & Chaires, J. B. (2005). Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research*, 33(16), e138-e138.
- Mergny, J. L., & Lacroix, L. (2009). UV Melting of G-Quadruplexes. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 17.11. 11-17.11. 15.
- Miannay, F.-A., Gustavsson, T., Banyasz, A., & Markovitsi, D. (2010). Excited-state dynamics of dGMP measured by steady-state and femtosecond fluorescence spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(9), 3256-3263.
- Millevoi, S., Moine, H., & Vagner, S. (2012). G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), 495-507.
- Mohanty, J., Barooah, N., Dhamodharan, V., Harikrishna, S., Pradeepkumar, P., & Bhasikuttan, A. C. (2012). Thioflavin T as an efficient inducer and selective fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1), 367-376.
- Mora, A. K., Singh, P. K., Patro, B. S., & Nath, S. (2016). PicoGreen: a better amyloid probe than Thioflavin-T. *Chemical Communications*, 52(82), 12163-12166.
- Moyer, R. H., & Everett, S. A. (2014). Why the Statue of Liberty is green: Coatings, corrosion, and patina. *Science Scope*, 38(1), 12.
- Multhaup, G. (1997). Amyloid precursor protein, copper and Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(3), 105-111.
- Murat, P., & Balasubramanian, S. (2014). Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA. *Current Opinion in Genetics & Development*, 25, 22-29.
- Müller, S., Kumari, S., Rodriguez, R., & Balasubramanian, S. (2010). Small-molecule-mediated G-quadruplex isolation from human cells. *Nature Chemistry*, 2(12), 1095.
- Nagesh, N., & Chatterji, D. (1995). Ammonium ion at low concentration stabilizes the G-quadruplex formation by telomeric sequence. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 30(1), 1-8.

- Nahar, M. N.-E.-N. (2017). Role of Proline in Tobacco Cultured Cells Under Arsenate Stress.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analytical Biochemistry*, 177(2), 244-249.
- Ndou, T. T., & Warner, I. M. (1991). Applications of multidimensional absorption and luminescence spectroscopies in analytical chemistry. *Chemical Reviews*, 91(4), 493-507.
- Neidle, S., & Balasubramanian, S. (2006). *Quadruplex Nucleic Acids*, Royal Society of Chemistry.
- Nriagu, J. O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338(6210), 47.
- Ono, M., Watanabe, H., Kimura, H., & Saji, H. (2012). BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral  $\beta$ -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(4), 319-324.
- Otto, C., Ritter, M. M., Richter, W. O., Minkenberg, R., & Schwandt, P. (2001). Hemorrhagic abnormalities in defined primary dyslipoproteinemias with both high and low atherosclerotic risks. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 50(2), 166-170.
- Palumbo, S. L., Memmott, R. M., Uribe, D. J., Krotova-Khan, Y., Hurley, L. H., & Ebbinghaus, S. W. (2008). A novel G-quadruplex-forming GGA repeat region in the c-myc promoter is a critical regulator of promoter activity. *Nucleic Acids Research*, 36(6), 1755-1769.
- Parkinson, G. N., Lee, M. P., & Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, 417(6891), 876.
- Pennington, J., Young, B., Wilson, D., Johnson, R., & Vanderveen, J. (1986). Mineral content of foods and total diets: the Selected Minerals in Foods Survey, 1982 to 1984. *Journal of the American Dietetic Association*, 86(7), 876-891.
- Pettersson, R., Rasmussen, F., & Oskarsson, A. (2003). Copper in drinking water: not a strong risk factor for diarrhoea among young children. A population-based study from Sweden. *Acta Pædiatrica*, 92(4), 473-480.
- Phan, A. T., & Patel, D. J. (2003). Two-repeat human telomeric d (TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, 125(49), 15021-15027.
- Pizarro, F., Olivares, M., Uauy, R., Contreras, P., Rebelo, A., & Gidi, V. (1999). Acute gastrointestinal effects of graded levels of copper in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 107(2), 117-121.



- Pourkhabbaz, A., & Pourkhabbaz, H. (2012). Investigation of toxic metals in the tobacco of different Iranian cigarette brands and related health issues. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(1), 636.
- Powell, C., & Stillman, H. (2009). *Corrosion Behaviour of Copper Alloys Used in Marine Aquaculture*. International Copper Association, Ltd., New York, 1-3.
- Puig, S., & Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 171-180.
- Rachwal, P. A., Findlow, I. S., Werner, J. M., Brown, T., & Fox, K. R. (2007). Intramolecular DNA quadruplexes with different arrangements of short and long loops. *Nucleic Acids Research*, 35(12), 4214-4222.
- Raj, C. R., & Ramaraj, R. (1999). Influence of cyclodextrin complexation on the emission of thioflavin T and its off-on control. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 122(1), 39-46.
- Raj, C. R., & Ramaraj, R. (2001). Emission of Thioflavin T and its Off-On Control in Polymer Membranes. *Photochemistry and Photobiology*, 74(6), 752-759.
- Ralph, A., & McArdle, H. (2001). Copper metabolism and copper requirements in the pregnant mother, her fetus, and children. *Copper in the Environment and Health*.
- Rayssiguier, Y., Gueux, E., Bussiere, L., & Mazur, A. (1993). Copper deficiency increases the susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *The Journal of nutrition*, 123(8), 1343-1348.
- Renaud de la Faverie, A., Guedin, A., Bedrat, A., Yatsunyk, L. A., & Mergny, J.-L. (2014). Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation. *Nucleic Acids Research*, 42(8), e65-e65.
- Rhodes, D., & Giraldo, R. (1995). Telomere structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3), 311-322.
- Rickett, B., & Payer, J. (1995). Composition of copper tarnish products formed in moist air with trace levels of pollutant gas: sulfur dioxide and sulfur dioxide/nitrogen dioxide. *Journal of The Electrochemical Society*, 142(11), 3713-3722.
- Rotkiewicz, K., Grellmann, K., & Grabowski, Z. (1973). Reinterpretation of the anomalous fluorescence of pn, n-dimethylamino-benzonitrile. *Chemical Physics Letters*, 19(3), 315-318.
- Rusyniak, D. E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., & Furbee, B. (2010). Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (pp. 365-396): Springer.
- Saravanan, C., Ashwin, B. C. M. A., Senthilkumaran, M., & Mareeswaran, P. M. (2018). Supramolecular Complexation of Biologically Important Thioflavin-T with p-Sulfonatocalix [4] arene. *ChemistrySelect*, 3(9), 2528-2535.

- Sayre, L. M., Perry, G., Harris, P. L., Liu, Y., Schubert, K. A., & Smith, M. A. (2000). In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 270-279.
- Schuddeboom, W., Jonker, S. A., Warman, J. M., Leinhos, U., Kuehnle, W., & Zachariasse, K. A. (1992). Excited-state dipole moments of dual fluorescent 4-(dialkylamino) benzonitriles: influence of alkyl chain length and effective solvent polarity. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(26), 10809-10819.
- Schwen, D., 2008 Statue of Liberty. Wikipedia, the free encyclopedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Statue\\_of\\_Liberty](https://en.wikipedia.org/wiki/Statue_of_Liberty) (Erişim Tarihi: 15.05.2019)
- Scully, N. M., Maie, N., Dailey, S. K., Boyer, J. N., Jones, R. D., & Jaffé, R. (2004). Early diagenesis of plant-derived dissolved organic matter along a wetland, mangrove, estuary ecotone. *Limnology and Oceanography*, 49(5), 1667-1678.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., & Morel, J. (1998). Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the Total Environment*, 209(2-3), 133-142.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11593-11598.
- Siemiarczuk, A., Grabowski, Z. R., Krówczynski, A., Asher, M., & Ottolenghi, M. (1977). Two emitting states of excited p-(9-anthryl)-n, n-dimethylaniline derivatives in polar solvents. *Chemical Physics Letters*, 51(2), 315-320.
- Smargiasso, N., Gabelica, V., Damblon, C., Rosu, F., De Pauw, E., Teulade-Fichou, M.-P., . . . Claessens, A. (2009). Putative DNA G-quadruplex formation within the promoters of *Plasmodium falciparum* var genes. *BMC Genomics*, 10(1), 362.
- Smith, F. W., & Feigon, J. (1992). Quadruplex structure of *Oxytricha* telomeric DNA oligonucleotides. *Nature*, 356(6365), 164.
- Soltzberg, L. J., Lor, S., Okey-Igwe, N., & Newman, R. (2012). 3D fluorescence characterization of synthetic organic dyes. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(09), 622.
- Sorensen, E. M. (1991). *Metal poisoning in fish*: CRC press.
- Souli, M., Antoniadou, A., Katsarolis, I., Mavrou, I., Paramythiotou, E., Papadomichelakis, E., . . . Petrikkos, G. (2017). Reduction of environmental contamination with multidrug-resistant bacteria by copper-alloy coating of surfaces in a highly endemic setting. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 38(7), 765-771.
- Srivastava, A., Singh, P. K., Kumbhakar, M., Mukherjee, T., Chattopadhyay, S., Pal, H., & Nath, S. (2010). Identifying the bond responsible for the fluorescence

- modulation in an amyloid fibril sensor. *Chemistry–A European Journal*, 16(30), 9257-9263.
- Stauber, J., & Florence, T. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*, 94(4), 511-519.
- Stern, B. R. (2010). Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73(2-3), 114-127.
- Strausak, D., Mercer, J. F., Dieter, H. H., Stremmel, W., & Multhaup, G. (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain research bulletin*, 55(2), 175-185.
- Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Uversky, V. N., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2008). Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(49), 15893-15902.
- Su, D., Teoh, C. L., Wang, L., Liu, X., & Chang, Y.-T. (2017). Motion-induced change in emission (MICE) for developing fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4833-4844.
- Sugimoto, S., Arita-Morioka, K.-i., Mizunoe, Y., Yamanaka, K., & Ogura, T. (2015). Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. *Nucleic Acids Research*, 43(14), e92-e92.
- Sugiyama, J., Fujita, K., Yoshimura, M., Tsuta, M., Shibata, M., & Kokawa, M. (2013). Detection of food hazards using fluorescence fingerprint. *IFAC Proceedings Volumes*, 46(18), 70-74.
- Sulatskaya, A. I., Maskevich, A. A., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N., & Turoverov, K. K. (2010). Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS One*, 5(10), e15385.
- Sun, C., Su, R., Bie, J., Sun, H., Qiao, S., Ma, X., . . . Zhang, T. (2018). Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline. *Dyes and Pigments*, 149, 867-875.
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., Van Benthem, J., Wester, P., & Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(2), 613-628.
- Tan, X., Wang, Y., Armitage, B. A., & Bruchez, M. P. (2014). Label-free molecular beacons for biomolecular detection. *Analytical Chemistry*, 86(21), 10864-10869.
- Tanner, M., Portmann, B., Mowat, A., Williams, R., Pandit, A., Mills, C., & Bremner, I. (1979). Increased hepatic copper concentration in Indian childhood cirrhosis. *The Lancet*, 313(8128), 1203-1205.

- Tanner, M. S. (1998). Role of copper in Indian childhood cirrhosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 1074S-1081S.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (pp. 133-164): Springer.
- Tong, L.-l., Li, L., Chen, Z., Wang, Q., & Tang, B. (2013). Stable label-free fluorescent sensing of biothiols based on ThT direct inducing conformation-specific G-quadruplex. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 420-425.
- Torigoe, H., Kamiya, M., Shindo, H., & Sarai, A. (1995). Structural polymorphism and thermal stability of telomere DNAs (T2G4) n and (T4G4) n. *Nucleic acids symposium series*.
- Town, R. M., & Filella, M. (2000). A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquatic Sciences*, 62(3), 252-295.
- Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., & Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 101(3), 294.
- Tyler, L. D., & McBRIDE, M. B. (1982). Mobility and extractability of cadmium, copper, nickel, and zinc in organic and mineral soil columns. *Soil Science*, 134(3), 198-205.
- Ueyama, H., Takagi, M., & Takenaka, S. (2002). A novel potassium sensing in aqueous media with a synthetic oligonucleotide derivative. Fluorescence resonance energy transfer associated with guanine quartet–potassium ion complex formation. *Journal of the American Chemical Society*, 124(48), 14286-14287.
- Valeur, B. (2004). *Invitation à la fluorescence moléculaire: De Boeck Supérieur*.
- Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications: John Wiley & Sons*.
- Valkovic, V. (1990). Origin of Trace Element Requirements by Living Matter. In *Symmetries in Science IV* (pp. 213-242): Springer.
- Van Grieken, R., & Janssens, K. (2014). *Cultural heritage conservation and environmental impact assessment by non-destructive testing and micro-analysis: CRC Press*.
- Vassar, P. S., & Culling, C. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Archives of Pathology*, 68, 487-498.
- Vorlíčková, M., Kejnovská, I., Sagi, J., Renčiuk, D., Bednářová, K., Motlová, J., & Kypr, J. (2012). Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, 57(1), 64-75.

- Vummidi, B. R., Alzeer, J., & Luedtke, N. W. (2013). Fluorescent probes for G-quadruplex structures. *ChemBioChem*, 14(5), 540-558.
- Wang, H., Wang, J., Xu, L., Zhang, Y., Chen, Y., Chen, H., & Pei, R. (2016). Selection and characterization of thioflavin T aptamers for the development of light-up probes. *Analytical Methods*, 8(48), 8461-8465.
- Wang, F., Gu, Z., Lei, W., Wang, W., Xia, X., & Hao, Q. (2014). Graphene quantum dots as a fluorescent sensing platform for highly efficient detection of copper (II) ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190, 516-522.
- Wang, Z., & Rossman, T. (1996). *The Toxicology of Metals*. Cheng, LW, editor. Vol. 1. In: Boca Raton, FL: CRC Press.
- Weitzmann, M. N., Woodford, K. J., & Usdin, K. (1996). The development and use of a DNA polymerase arrest assay for the evaluation of parameters affecting intrastrand tetraplex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20958-20964.
- Winge, D. R., & Mehra, R. K. (1990). Host defenses against copper toxicity. In *International Review of Experimental Pathology* (Vol. 31, pp. 47-83): Elsevier.
- Wolfe, L. S., Calabrese, M. F., Nath, A., Blaho, D. V., Miranker, A. D., & Xiong, Y. (2010). Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16863-16868.
- Wu, K., Ma, C., Zhao, H., He, H., & Chen, H. (2018). Label-free G-quadruplex aptamer fluorescence assay for Ochratoxin A using a thioflavin T probe. *Toxins*, 10(5), 198.
- Yan, J.-W., Ye, W.-J., Chen, S.-B., Wu, W.-B., Hou, J.-Q., Ou, T.-M., . . . Huang, Z.-S. (2012). Development of a universal colorimetric indicator for G-quadruplex structures by the fusion of thiazole orange and isaindigotone skeleton. *Analytical chemistry*, 84(15), 6288-6292.
- Yan, J., & Cheng, J. (2005). Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same. In: Google Patents.
- Yang, P., De Cian, A., Teulade-Fichou, M. P., Mergny, J. L., & Monchaud, D. (2009). Engineering bisquinolinium/thiazole orange conjugates for fluorescent sensing of G-quadruplex DNA. *Angewandte Chemie*, 121(12), 2222-2225.
- Zeng, L., Miller, E. W., Pralle, A., Isacoff, E. Y., & Chang, C. J. (2006). A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 10-11.
- Zhang, L., Zhu, J., Ai, J., Zhou, Z., Jia, X., & Wang, E. (2013). Label-free G-quadruplex-specific fluorescent probe for sensitive detection of copper (II) ion. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1), 268-273.

- Zhao, D., Dong, X., Jiang, N., Zhang, D., & Liu, C. (2014). Selective recognition of parallel and anti-parallel thrombin-binding aptamer G-quadruplexes by different fluorescent dyes. *Nucleic Acids Research*, 42(18), 11612-11621.
- Zhou, Y., Wang, S., Zhang, K., & Jiang, X. (2008). Visual detection of copper (II) by azide-and alkyne-functionalized gold nanoparticles using click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(39), 7454-7456.
- Zietz, B. P., Dieter, H. H., Lakomek, M., Schneider, H., Keßler-Gaedtke, B., & Dunkelberg, H. (2003). Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. *Science of the Total Environment*, 302(1-3), 127-144.



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kimlik Bilgileri:**

Adı Soyadı: Yasemin ACAR

E-posta: acaryasemin20@gmail.com

Adresi: 2567 sok. No:44 Acar Apt. Millet mah. Gültepe Konak-İZMİR

### **Eğitim:**

Lise: İzmir Anadolu Ticaret Lisesi

Lisans: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı

### **Yabancı Dil ve Düzeyi:**

**İngilizce:** Çok İyi

### **İş Deneyimi:**

2015-Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Süperkritik Akışkanlar Laboratuvarı; Stajyer

2016-Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Rejeneratif Tıp Laboratuvarı; Stajyer

2016-Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları; Kısmi Zamanlı Çalışan