



**KUMARİN 120’NİN SIĞIR SERUM ALBUMİN’İ (BSA) İLE
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMİ VE METAL-İYON
SENSÖR ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Esra ÖZTÜRK

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Fizikokimya Bilim Dalı
Prof.Dr.Yavuz ONGANER
2019
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KUMARİN 120'NİN SIĞIR SERUM ALBUMİN'İ (BSA) İLE
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMİ VE METAL-İYON SENSÖR
ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Esra ÖZTÜRK

**KİMYA ANABİLİM DALI
Fizikokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KUMARİN 120'NİN SIĞIR SERUM ALBUMİN'İ (BSA) İLE MOLEKÜLER
ETKİLEŞİMİ VE METAL-İYON SENSÖR ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Yavuz ONGANER danışmanlığında, Esra ÖZTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 26/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı-Fizikokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.3./3..)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yavuz ONGANER

İmza :

Üye : Prof. Dr. Songül DUMAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mustafa ARIK

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 02.05.2019 tarih ve 19./16..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KUMARİN 120'NİN SIĞIR SERUM ALBUMİN'İ (BSA) İLE MOLEKÜLER ETKİLEŞİMİ VE METAL-İYON SENSÖR ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ

Esra ÖZTÜRK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Fizikokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz ONGANER

Kumarin 120 (C120) bileşiğinin sığır serum albümin (BSA) ile olan moleküler etkileşimleri ve bu ikilinin metal iyon sensör özelliği UV-Gör moleküler absorpsiyon ve durgun hal floresans spektroskopi teknikleriyle incelenip, floresans rezonans enerji transfer (FRET) proseslerine uygunluğu tartışılmıştır. Spektroskopik veriler BSA'nın floresans kuençleşmesinin dinamik bir etkileşme ile meydana geldiğini göstermiştir. Bunun için Stern- Volmer metodu kullanılarak floresans kuençleme prosesi analiz edilmiş ve farklı sıcaklıklarda Stern-Volmer kuençleşme sabitleri hesaplanarak, kuençleşme türünün dinamik kuençleşme olduğu tespit edilmiştir. Çift logaritmik denklem kullanılarak moleküllerin bağlanma sabitleri ve bağlanma yeri sayısı hesaplanıp moleküller arasındaki etkileşim türü ve etkileşim bölgesi tartışılmıştır. Sistemdeki etkileşimleri yorumlamak amacıyla termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Van't Hoff denkleminin yorumu kullanılarak termodinamik parametrelerden entalpi değişimi (ΔH), entropi değişimi (ΔS) ve ilave olarak serbest Gibbs enerji değişimi (ΔG) hesaplanmıştır. Negatif değerli ΔG değerleri moleküller arası etkileşimlerin sıcaklıkla istemli gerçekleştiğini, pozitif değerli ΔS ise etkileşimlerde baskın kuvvetin hidrofobik etkileşimler olduğunu göstermiştir. FRET metodu kullanılarak BSA (donör) ve C120 (akseptör) arasındaki mesafe (r), enerji transfer etkinliği (E) ve enerji transfer etkinliğinin %50 olması için gereken kritik mesafe (R_0) değerleri farklı sıcaklıklar için belirlenmiştir. Ayrıca sistemin senkronize floresans spektrumları alınarak floroforun proteinin tirozin veya triptofan bölgelerinin hangisiyle etkileşim gösterdiği incelenmiştir. Son olarak da C120 ve BSA sistemi üzerine on farklı metal iyonu (Na^{+1} , Li^{+1} , Ag^{+1} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , Sn^{+4}) etkisi logaritmik denklem kullanılarak incelenmiş ve C120-BSA ikilisinin metal iyon sensör özelliği tartışılmıştır.

2019, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kumarin 120, Sığır serum albümin (BSA), Floresans kuençleşme modelleri, Floresans rezonans enerji transferi.

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF MOLECULAR INTERACTION OF COUMARIN 120 WITH BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) AND METAL ION SENSOR PROPERTIES

Esra ÖZTÜRK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Physical Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yavuz ONGANER

Molecular interactions of coumarin 120 (C120) with Bovine Serum Albumin (BSA) were also investigated in this study, and the metal ion detection properties of this pair of molecules were also measured using different spectroscopic methods. UV-vis Molecular absorption, fluorescence spectroscopy techniques and their suitability for fluorescence resonance energy transfer (FRET) method and the situations to be experienced in these processes have been investigated. As a result of the studies, spectroscopic data were evaluated; It shows that BSA's fluorescence quenching is involved in a dynamic interaction process. In this context, the technical researches revealed that the fluorescence extinction process should be performed and analyzed using the Stern-Volmer (S-V) method. For this purpose, using the Stern-Volmer method in analysis, S-V constants were calculated at different temperatures. As a result of the calculations, it was determined that the type of quenching is dynamic. Thermodynamic parameters were calculated in order to interpret the interactions in the system. Using the Van't Hoff equation, enthalpy change (ΔH), entropy change (ΔS) were calculated and also free Gibbs energy change (ΔG) were determined. Negative free Gibbs energy change (ΔG) values indicate that the interactions between molecules are spontaneously formed whereas positive entropy change (ΔS) value shows that the dominant force in interactions is hydrophobic interactions. Utilizing the FRET technique, the separation (r) between the BSA and C120, the vitality exchange effectiveness (E) and the basic separation (R_0) required for the vitality exchange proficiency to be half were resolved for various temperatures. In addition, synchronous fluorescence spectra of the system were taken and it was examined whether fluorophore interacted with the tyrosine or tryptophan regions of the protein. Finally, the effect of ten different metal ions (Na^{+1} , Li^{+1} , Ag^{+1} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , Sn^{+4}) on C120 and BSA system was examined by using a logarithmic equation and the metal-ion sensor property of C120-BSA pair was discussed.

2019, 70 pages

Keywords: Coumarin 120, Bovine serum albumin (BSA), Fluorescence quenching models, Fluorescence resonance energy transfer.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alıŐma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Başta tezimin hazırlanmasında, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında rehberlik eden, yardımlarını esirgemeyen, büyük emeği olan, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'a, tezimin yürütülmesi sırasında, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba BAYRAKTUTAN'a, en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

ÇalıŐmalarım sırasında desteklerinden dolayı, Kimya Bölümündeki tüm saygıdeğer hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve Fizikokimya araştırma grubuna,

Tezimin her aşamasında varlıkları ile bana maddi ve manevi destek olan aileme ve yengem Pınar ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Esra ÖZTÜRK

Mart, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Lüminesans.....	1
1.2. Işık ve Madde Etkileşimleri	3
1.3. Absorpsiyon Spektroskopisi.....	9
1.4. Floroforların Bazı Uygulama Alanları	9
1.4.1. Floresans ve fosforesansı etkileyen değişkenler	10
1.4.2. Floresans kuantum verimi	10
1.4.3. Floresans kuantum verimi ve geçiş tipleri.....	11
1.4.4. Floresans ve yapı	11
1.4.5. Yapısal rijitliğin floresansa etkisi.....	12
1.4.6. Floresansa konsantrasyon etkisi	12
1.4.7. Sıcaklık ve çözücü etkileri	14
1.4.8. Floresansa pH'nın etkisi.....	14
1.5. Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET)	15
1.6. Floresans Kuençleşmesi	18
1.7. Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumine=BSA).....	21
1.8. Kumarin.....	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL ve METOD.....	35
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.4. Floresans, Absorpsiyon ve Senkronize Floresans Spektrumlarının Alınması	36

3.5. Floresans Kuençleşmesi Çalışmaları.....	36
3.5.1. Stern-Volmer denklemi	37
3.5.2. Lineweaver-Burk denklemi	37
3.5.3. Çift Logaritmik denklem	38
3.6. Sıcaklık Çalışmaları ve Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi	39
3.7. FRET	39
3.8. İyon Sensör İncelemeleri.....	40
4. ARAşTIRMA BULGULARI ve TARTIşMA.....	42
4.1. Kumarin 120 ve BSA'nın Absorpsiyon ve Floresans Spektrumlarının İncelenmesi.....	42
4.2. Kumarin 120 Bileşiği ile BSA Arasındaki Bağlanma Etkileşiminin İncelenmesi.....	49
4.3. Termodinamik Parametrelerin Hesaplanması	51
4.4. Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET): Kumarin 120 (C120) İle Sığır Serum Albümin (BSA) Arasındaki Mesafenin Belirlenmesi	52
4.5. Senkronize Floresans Spektrumları ile Kumarin 120 (C120) ve Sığır Serum Albümin (BSA) Sistemindeki Konformasyonel Değişiklikleri Belirleme.....	56
4.6. Kumarin 120 Bileşiği ve Sığır Serum Albümin (BSA) Sisteminin Metal İyonları ile Etkileşiminin İncelenmesi	59
5. SONUÇ.....	64
KAYNAKÇA	67
ÖZGEÇMİş	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\bar{\nu}$	Dalgasayısı
Φ	Kuantum verimi
A6C	6-amino kumarin
A7C	4-metil-7-amino kumarin
BSA	Sığır serum albümin
C120	Kumarin 120
C151	Kumarin 151
CdS NPs	Kadmiyum sülfür nanopartükülleri
CV	Trifenil metan–kristal menekşesi
DEA7C	4-metil-7-dietil amino kumarin
DFT	Yoğunluk Fonksiyonel Teori
DLS	Dinamik ışık saçılımı
E	Enerji transfer etkinliği
EPR	Elektro paramagnetik rezonans
ICT	Molekül içi yük transferi
J	Örtüşme integrali
K	Bağlanma sabiti
K	Kelvin
K_b	Bağlanma sabiti
K_D	Ayrışma (dissosiasyon) sabiti
k_f	Floresans hız sabiti
k_{IC}	İç dönüşüm hız sabiti
k_{ISC}	Sistemler arası geçiş hız sabiti
k_{LB}	Statik kuençleşme sabiti
k_{nr}	Radyasyonsuz geçiş hız sabiti
k_p	Fosforesans hız sabiti
k_q	Bimoleküler kuençleşme sabiti
k_r	Radyasyonlu geçiş hız sabiti

k_{ST}	Singlet uyarılmış halden triplet uyarılmış hale olan ışımaz geçiş hız sabiti
k_{SV}	Stern-Volmer kuençleşme sabiti
k_{TS}	Triplet uyarılmış halden singlet temel hale olan ışımaz geçiş hız sabiti
LFP	Picosecond laser flash photolysis
mg	miligram
ml	mililitre
n	Bağlanma yeri sayısı
nm	Nanometre
n_r	Referans çözücünün kırılma indisi
n_s	Nanosaniye
n_s	Numunenin kırılma indisi
PR	Nanosecond pulse radiolysis
r	Donör ile akseptör arasındaki mesafe,
R_0	Donör ile akseptör arasındaki kritik mesafe
S_1	Birinci singlet uyarılmış hal
S_2	İkinci singlet uyarılmış hal
S_0	Singlet temel hal
T	Sıcaklık (Kelvin)
T_1	Birinci triplet uyarılmış hal
TDDFT	Zaman bağımlı yoğunluk fonksiyonel teori
TICT	Bükülmüş molekül içi yük transferi
α	Bağlanma derecesi
κ^2	Dipolün göreceli yönelmesi
τ	Floresans ömrü
ϵ	Molar absorpsiyon katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Işık-madde etkileşimi ve Floresans ile fosforesans	4
Şekil 1.2. Singlet ve triplet hallerin gösterimi	5
Şekil 1.3. Perrin-Jablonski diyagramı	6
Şekil 1.4. FRET'in temsili şematik gösterimi.....	17
Şekil 1.5. Statik ve dinamik kuençleşmenin temsili gösterimi	20
Şekil 1.6. Sığır serum albüminin yapısı	22
Şekil 1.7. Kumarin'in moleküler yapısı.....	23
Şekil 1.8. Kumarin ve kromon bileşiklerinin temel yapısı	25
Şekil 1.9. Kumarin 120 bileşiğinin moleküler yapısı	26
Şekil 4.1.a. 5 µM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlardaki C120 bileşiği varlığında absorpsiyon spektrumları	43
Şekil 4.1.b. 5 µM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlardaki C120 bileşiği varlığında normalize absorpsiyon spektrumları	43
Şekil 4.2. 5 µM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda C120 bileşiği içeren çözeltileri için floresans spektrumları.....	44
Şekil 4.3. Farklı sıcaklıklardaki BSA-C120 sistemine ait Stern-Volmer grafikleri	46
Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklardaki BSA-C120 sistemine ait Lineweaver-Burk grafikleri	48
Şekil 4.5. Farklı sıcaklıklar için BSA-C120 ikili sistemine ait çift-logaritmik grafikler	50
Şekil 4.6. S-V Kuençleşme sabitlerinin sıcaklıkla değişimini gösteren grafik.....	52
Şekil 4.7. C120'nin absorpsiyon ve floresans spektrumları	53
Şekil 4.8. 190 nM C120 bileşiğinin BSA varlığında ve yokluğunda alınan floresans spektrumları.....	54
Şekil 4.9. Farklı sıcaklıklarda BSA'nın floresans spektrumları ile C120'nin absorpsiyon spektrumlarının örtüşme durumu	55
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda C120 içeren 5 µM BSA çözeltisinin a) tirozin ve b) triptofan bölgelerine ait senkronize floresans spektrumları.....	58
Şekil 4.11. BSA-C120- Metal iyonları absorpsiyon ve floresans spektrumları.....	60

Şekil 4.12. Metal iyonlarının bağlanma sabitine olan etkisi.....62



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Lüminesans Olayı ve Uyarılma Şekilleri.....	1
Çizelge 1.2. Deaktivasyon Proseslerinin Zaman Skalaları	8
Çizelge 1.3. Kumarin ve türevlerinin biyolojik etkileri	23
Çizelge 4.1. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklardaki Stern-Volmer kuençleşme sabitleri	46
Çizelge 4.2. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen parametre değerleri.....	48
Çizelge 4.3. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda elde edilen bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yeri sayısı.	50
Çizelge 4.4. Tampon çözelti ortamında BSA-C120 ikili sistemine ait farklı sıcaklıklarda elde edilen termodinamik parametreler	52
Çizelge 4.5. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda hesaplanmış rezonans enerji transfer parametreleri	56
Çizelge 4.6. BSA-C120 sistemine ait farklı metal iyonları için elde edilen bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yerleri sayısı.....	61

1. GİRİŞ

1.1. Lüminesans

Latince'den gelen Lüminesans sözcüğü ilk olarak Eilhardt Wiedemann tarafından 1888'de bilim camiasına kazandırılmıştır. Lüminesans; elektronik olarak uyarılmış bir türden gelen mor ötesi, görünür ve kızıl ötesi fotonların emisyonu durumudur. Lüminesansın başlıca gözlendiği bileşikler arasında aromatik hidrokarbonlar, floresinler, rodaminler, kumarinler, oksazinler, polienler, difenil poliestерler ve aminoasitler gibi organik bileşiklerin yanı sıra kristaller, rutenyum, lantanit ve uranyum iyonlarının kompleksleri gibi inorganik bileşikler ayrıca flüorojenik şelatlama maddelerini içeren organometalik bileşikler de yer almaktadır.

Lüminesans çeşitleri uyarılma şekillerine bağlı olarak aşağıdaki Çizelge 1.1'deki gibi sınıflandırılır.

Çizelge 1.1. Lüminesans Olayı ve Uyarılma Şekilleri (Furetta et al. 1998)

Lüminesans Olayı	Uyarılma Şekilleri
Biyolüminesans	Biyokimyasal reaksiyon kaynaklı
Katodolüminesans	Katot ışınlarına dayalı
Kimyasal Lüminesans	Kimyasal etkileşim kaynaklı
Elektrolüminesans	Elektrokimyasal kaynaklı
Fotolüminesans	UV, görünür ve kızıl ötesi ışık kaynaklı
Piezolüminesans	Basınç (10 ton m ⁻²)
Tribolüminesans	Sürtünme
Sonolüminesans	Ses dalgaları
Floresans Fosforesans	UV ve görünür ışık kaynaklı
Termolüminesans	Sıcaklığa dayalı

Tabloda belirtilen lüminesans olaylarından kısaca bahsedecek olursak;

Biyolüminesans: Canlı bir organizmanın kimyasal yolla ışık üretmesine verilen isimdir. Biyolüminesans, lüminesans yapan canlılarda lusiferin pigmentinin oksijenle tepkimeye girmesi ve luciferaz enziminin de bu reaksiyonu katalizlemesi suretiyle hücre içi ve hücre dışında gerçekleşebilen bir reaksiyondur.

Katodolüminesans: Uyarılar yüksek enerjili elektron bombardımanı ile olur ve bu uyarılar sonucu gözlemlenen ışımaya verilen isimdir. Değişik kullanım alanları vardır.

Kemilüminesans: Uyarılma enerjisinin kaynağını kimyasal bir tepkimeden alan lüminesans çeşididir. Bir başka açıklamayla kimyasal ışıldaama olarak da bilinen kemilüminesans, kimyasal reaksiyon sonucunda çok az miktarda ısı ve ışık ışıması durumudur. Kimyasal reaksiyon sonucunda ortaya çıkan enerji reaksiyonda görev alan ara moleküllerde dâhil olmak üzere her bir molekülün enerji seviyelerinde değişime sebep olur ve bu bahsi geçen moleküllerin karakterlerine uygun olarak belirli bir dalga boyunda foton yayımlarlar.

Elektrolüminesans (elektrokemolüminesans): Uyarılma enerjisinin kaynağı elektrot tepkimesiyse elektrolüminesans veya elektrokemolüminesans adını alır.

Piezolüminesans: Uyarılma şekli basınç olduğu durumlarda ortaya çıkan lüminesans olayına verilen isimdir.

Tribolüminesans: Öğütülen, çizilen veya ovulan bir mineralin ışık yayma özelliğine denir. Tribolüminesans gösteren minerallere örnek olarak florit, sfalerit ve lepidolit mineralleri gösterilebilir.

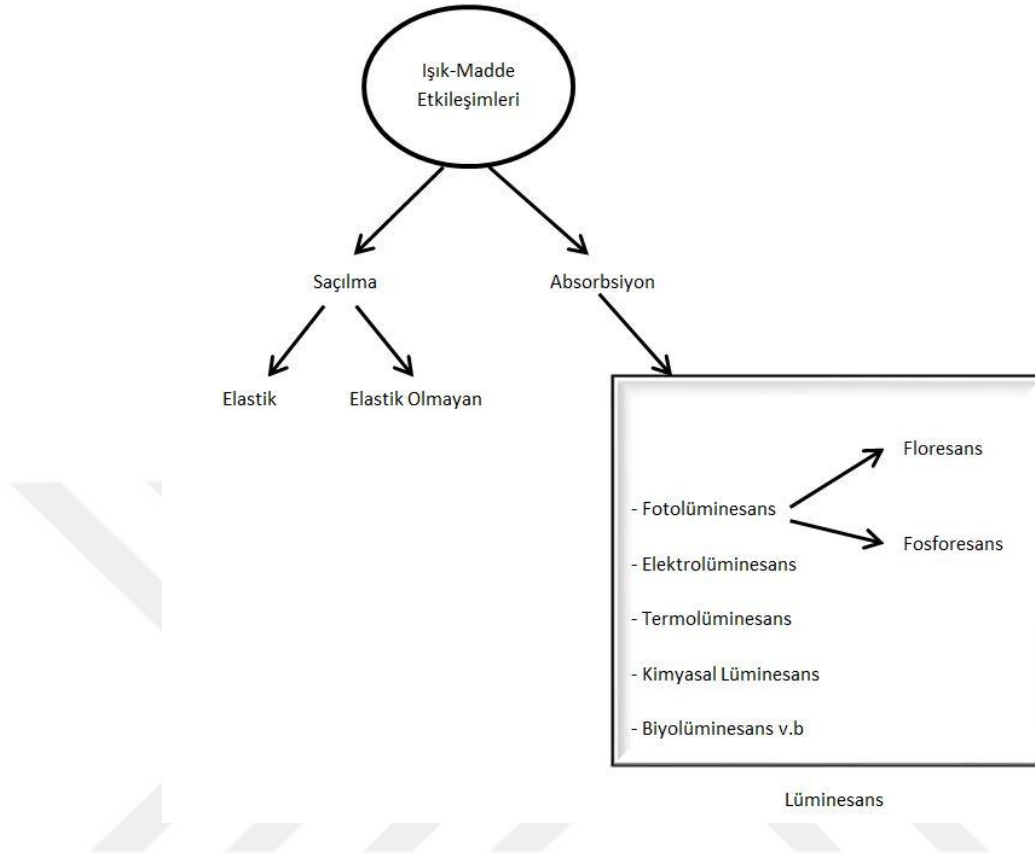
Sonolüminesans: Uyarılma şekli, titreşim frekansı kaynaklı olan lüminesans çeşididir.

Termolüminesans: Akkor halinden daha düşük sıcaklıklarda ısıtılan bir maddenin görünen ışık yaymasıdır. Bu özellik en iyi, safsızlık olarak aktivatör içeren minerallerde görülür.

Fotolüminesans: Bir foton absorplanması sonucu uyarılmış hal oluşur. Bu uyarılmaya foton emisyonu eşlik ederse bu olay fotolüminesans (fosforesans, floresans ve gecikmiş floresans) adını alır (Valeur 2001). Fosforesans, floresans ve gecikmiş floresans; Işık ve Madde Etkileşimleri başlığı altında şematik olarak detaylı şekilde verilmiştir.

1.2. Işık ve Madde Etkileşimleri

Foton (Işık)-madde (molekül, atom) etkileşimi şematik olarak Şekil 1.1'de verilmektedir. Bu şemada adı geçen proseslerin bir kısmı Çizelge 1.1'de verilmiş olup açıklamaları yapılmıştır. Foton madde etkileşiminde saçılma olayı, çalışma konumuzda söz konusu olmayıp, kolloidal sistemlerin bazılarında gözlenen bir durumdur.



Şekil 1.1. Işık-madde etkileşimi ve floresans ile fosforesans (Valeur 2001)

Foton-molekül (atom) etkileşiminde, molekülde veya atomda bulunan değerlik elektronları soğurma veya emisyon olaylarında görev almaktadırlar. Bu nedenle yapılarıdaki elektron dağılımını bu yönüyle tanımlamada fayda vardır. Buna göre;

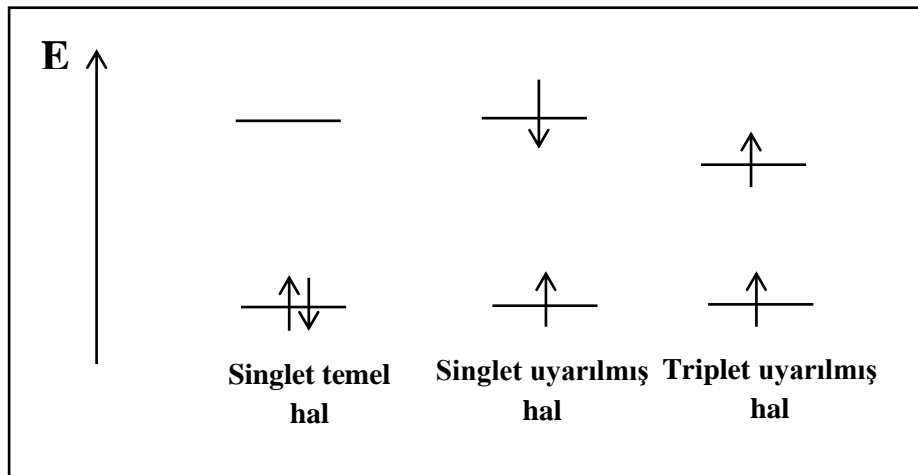
Pauli Prensibi: Pauli Dışarlama prensibine göre; bir atomda bulunan iki elektron için dört kuantum sayısının hepsi birden aynı değildir. Bu prensibe göre bir orbitalde iki elektrondan daha fazla elektron bulunamaz ve bu elektronlar aynı spinli olamaz. Bu şartlar altında Pauli dışarlama prensibine göre spinler eşlenmiş halde bulunur. Spin eşleşmesi nedeniyle moleküllerin çoğu net bir manyetik alan göstermez ve diamanyetik olarak adlandırılırlar. Yani durgun manyetik alan tarafından ne itilir ne de çekilirler. Ama yapılarında eşlenmemiş elektron içeren moleküller manyetik bir momente sahiptirler ve bu moment nedeniyle manyetik alan tarafından çekilirler ve paramanyetik olarak adlandırılırlar. Elektronların orbitallere yerleşimlerinden kaynaklı olarak, bir molekülün singlet hali ve triplet hali birbirinden oldukça farklılık gösterir. Bu

farklılıklardan biri de bir molekülün singlet hali diamagnetik iken triplet halinin paramagnetik oluşudur.

Temel Hal: Herhangi bir atomun ya da molekülün elektronlarının en düşük enerji seviyesindeki orbitallere yerleşmesi durumuna atom ya da molekülün temel hali denir.

Singlet Hal: Pauli Dışarlama İlkesi'ne göre elektronlar orbitallere birbirlerine zıt spinlerde olacak şekilde yerleşirler. Bir başka ifadeyle çiftleşmiş spinler halinde yerleşirler. Mevcut elektronlarının hepsinin spinlerinin çiftleştiği bir moleküler elektronik hale "singlet ya da tekli" hal denir ve spin eşleşmesinden kaynaklı olarak singlet haldeki molekül magnetik alanda tutulursa ve çekirdek spininin etkisi ihmal edilirse spin çiftleşmesinin belirli bir elektron spini olmadığı için enerji seviyesinde ayrılma gözlenmez.

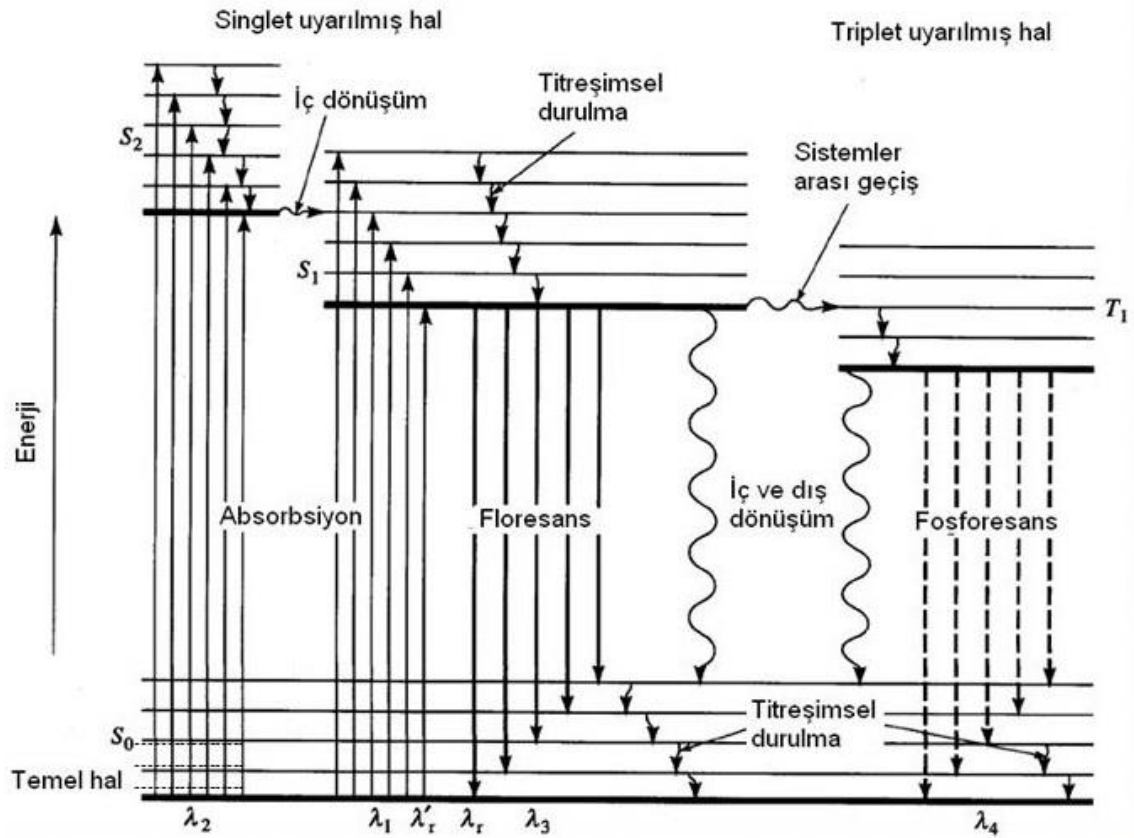
Triplet Hal: Molekülde elektronlar orbitallere yerleşirken iki elektron için paralel spinli bir durum oluşur. Bu yapıya triplet hal denir. Bir molekülün singlet ve triplet halleri Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Singlet ve triplet hallerin gösterimi (Bayraktutan 2015)

Uyarılmış Hal: İki atom arasında oluşan bir bağ temelinde bu bağları oluşturan iki elektronun atomik orbitallerinin birbirinin üzerine gelmesiyle oluşan bir ya da daha

fazla moleküler orbitalle bağlantılıdır. Birbiri üzerine gelen atomik orbitaller bir bağ orbitalini ve birde antibağ orbitalini oluştururlar. Oluşan bu orbitallerden birinin enerjisi diğerinden daha küçüktür. Enerjisinin küçük olması temel haldeki elektronlarının buraya yerleşmesine neden olur (Skoog and West 1980). Fotonla uyarılmış bir molekül floresans emisyonu, iç dönüşüm, sistemler arası geçiş, konformasyonel değişiklikler, elektron transferleri, proton transferleri, enerji transferleri, eksimer ve eksipleks oluşumları ve fotokimyasal değişimler gibi yolları takip edebilir. Foton absorpsiyonu, iç dönüşüm, sistemler arası geçiş, singlet haller, triplet haller, temel hal, floresans, gecikmiş floresans, fosforesans vb. olası durumları görselleştirebilmek için Perrin-Jablonski Diyagramı kullanılır. Perrin-Jablonski Diyagramı Şekil 1.3’de verilmiştir.



Şekil 1.3. Perrin-Jablonski diyagramı (Şen 2018 and Valeur 2001)

Bu Tablodaki deaktivasyon prosesleri kendi içlerinde ışıklı ve ışısız olmak üzere ikiye ayrılır. İç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve titreşimsel durulma olmak üzere 3

çeşit ışımaz deaktivasyon prosesi varken, absorpsiyon, fosforesans ve floresans prosesleri ışımaz proseslerdir.

• **İç Dönüşüm:** Eğer bir molekül fazla enerjisinin tamamını ya da bir kısmını ışın yaymadan çevresine verip daha düşük enerjili elektronik hale geçiyorsa (S_1-S_0) buna iç dönüşüm denir. İç dönüşüm genellikle birbirine yakın iki elektronik hal arasında vuku buluyorsa bu adı alır. İç dönüşüm istisnalar haricinde birbirine yakın iki elektronik seviyenin birbiriyle çakışacak kadar yakın olduğu durumlarda ortaya çıkar. Birbirine yakın bu elektronik seviyeler arasındaki geçişin olma olasılığı floresans olayının gerçekleşmesiyle karşılaştırılırsa daha yüksek olasılıklı olduğu görülür. Bir başka anlatımla titreşim seviyelerinin üst üste düşmesiyle gerçekleşebilecek enerji transferlerinin daha olası olması floresansı engeller.(Skoog and West 1980)

• **Dış Dönüşüm:** Uyarılmış bir elektronik halin deaktivasyonu, uyarılmış molekül ve çözücü (ya da diğer moleküller) arasındaki etkileşim ve enerji transferiyle ilgilidir. Dış dönüşümün detayları bilinmemekle beraber çözücünün floresans olayını etkilemesi dış dönüşümün varlığının kanıtıdır. Ayrıca tanecikler arası çarpışmanın artırılması ve azaltılması floresansın artıp azalmasını etkilemektedir. En düşük uyarılmış triplet halden singlet temel hale ışımaz geçiş bazı kaynaklarda dış dönüşüm olarak adlandırılmaktadır.

• **Sistemler Arası Geçiş:** Singlet uyarılmış haldeki bir molekülün elektronun spin değiştirerek triplet uyarılmış yapıya dönmesi ile gerçekleşen ışımaz bir prostir. Bu geçişin gerçekleşme ihtimali, iki ayrı halin titreşim seviyelerinin üst üste çakışmasıyla, ağır atom bulunduran moleküllerde spin ve orbitaller arasındaki etkileşim artmasıyla spin değişikliğinin olma olasılığı artar. Bu durum floresansın olma ihtimalini azaltır.

• **Floresans:** Moleküldeki elektron hareketi bir foton emisyonuyla S_1 'den S_0 'a gerçekleşiyorsa bu proses floresans adını alır. Aynı zamanda ışımaz bir deaktivasyon olayıdır.

• **Fosforesans:** Eğer elektron hareketi bir foton emisyonuyla T_1 'den S_0 'a geręekleřiorsa bu proses fosforesans adını alır ve ışımalı bir deaktivasyon olayıdır.

Floresans yaşam ömrü (lifetime) 10^{-7} ila 10^{-9} saniye arasında değişirken fosforesans yaşam ömrü 10^{-4} saniyeden dakikalara kadar ulaşabilir. Bu yüzden floresans istatistiksel açıdan fosforesanstan daha fazla geręekleşir. Bahsi geçen olayların zaman skalası aşıağıda izelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Deaktivasyon Proseslerinin Zaman Skalaları

Geçiş	Zaman Skalası	İşınım
İç Dönüşüm	$10^{-14} - 10^{-11}$ s	yok
Titreşimsel Durulma	$10^{-14} - 10^{-11}$ s	yok
Absorpsiyon	10^{-15} s	var
Fosforesans	$10^{-4} - 10^2$ s	var
Sistemler Arası geçiş	$10^{-8} - 10^{-3}$ s	yok
Floresans	$10^{-9} - 10^{-7}$ s	var

• **Titreşimsel Durulma:** şekil 1.3'de görüldüğü üzere bir moleköl uyarma işlemi esnasında aldığı enerjiyle orantılı olarak herhangi bir elektronik enerji seviyesinin titreşim enerji seviyesinde bulunabilir. Bu durum çözeltilerde uyarılmış halde bulunan moleküllerle çözücü molekölleri arasındaki çarpışmalarda önem kazanmaktadır. Çünkü geręekleşen bu çarpışmalar sayesinde titreşim enerji kaybı yaşanırken, bu enerjinin aktarımıyla çözücü molekölünün kinetik enerjilerinde bir artma meydana gelir. Titreşimce uyarılmış halde bulunan molekölün ortalama yaşam süresi 10^{-12} saniye ya da daha az ise relaksasyon işlemi adını alır. Durulma işlemi süresi elektronik uyarılmış bir halin yaşam süresiyle karşılaştırıldığında daha kısa olduğu görölür. Bu da çözeltilerde floresans oluşması için uyarılmış halden en düşük titreşim seviyesine geçişin olmasının zaruriyetini gösterir. Titreşim durulmasının yeterliliği durumunda floresans bandı ve absorpsiyon bandı karşılaştırıldığında floresans bandının daha düşük frekanslara kaydığı görölür. Absorpsiyon bandının üzerine düşen rezonans piki temel haldeki en düşük

titreşim seviyesine uygun uyarılmış hal seviyesi arasındaki geçişlerle oluşan rezonans piki olduğu görülür (Skoog and West 1980). Titreşimsel durulma $<10^{-12}$ saniyeden daha kısa sürede gerçekleştiği için en hızlı prosestir.

1.3. Absorpsiyon Spektroskopisi

Bir çözeltilen belli dalga boyunda elektromanyetik ışık geçirildiğinde çözeltilen çıkan ışığın şiddetinde bir azalma olur. Buna göre; geçirgenlik (transmittans) çözeltilen çıkan ışık şiddetinin çözeltilen giren ışık şiddetine oranına verilen isimdir. Giren ışık şiddetine I_0 çıkan ışık şiddetine I dersek; bu durumda geçirgenlik (T);

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1.1)$$

olarak tanımlanır. Geçirgenlik ölçümleri genellikle çözeltilerin farklı konsantrasyon değerleri için yapıldığında hiperbolik bir eğri çıkar. Hiperbolik bir eğride hesap zorluğunu göz önünde bulundurarak % transmittansın eksi logaritması alınarak absorbans (optik yoğunluk) adını alan lineer bir ifadeye dönüştürülür. Buna göre absorbans (A)

$$A = \epsilon l C \quad (1.2)$$

olarak tanımlanmıştır.

(1.2) denkleminde, A; absorbans (optik yoğunluk), ϵ ; molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.L), l ; ışık yolu (cm) ve C; konsantrasyondur (mol/L).

1.4. Floroforların Bazı Uygulama Alanları

Floresans veya fosforesans yapabilen moleküller genel anlamda florofor olarak adlandırılırlar. Örnek olarak tipik poliaromatik hidrokarbonlar triptofan, tirozin gibi bazı

aminoasitler örnek verilebilir. Bundan başka floroforlar; Ekzojen Florofor (Rhodamine, Akridin, Oraj, Etidium Bromid vb.) ve Endojen Florofor (NADH Otofloresans vb.) olmak üzere iki grubu ayrılabilir. Floroforların bazı uygulamalarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

-İmmünofloresans

- İyon duyarlı boyalar

*(K^+ , Na^+ , Ca^{+2} spesifik işaretleyiciler)

*pH göstergeleri

-Zar potansiyeli

*Hücre içi floresans artışı

-DNA boyaları

-Protein floresan tayini

1.4.1. Floresans ve fosforesansı etkileyen değişkenler

Floresansın ve fosforesansın gerçekleşmesinin başlıca 3 sebebe bağlı olduğu söylenebilir. Bunlar; 1- Moleküler yapı ve moleküler yapıyı değiştirecek etkenler (sıcaklık, pH, ağır atom vb.), 2- Kimyasal çevre, 3- Oluşan emisyonun şiddetidir. Emisyon olayının şiddeti, kuantum verimleri üzerinden tanımlanmaktadır. Örneğin floresans olayı için floresans kuantum verimi, fosforesans olayı için fosforesans kuantum verimi.

1.4.2. Floresans kuantum verimi

Floresans için kuantum verimi hesaplanırken temel olarak ışığa yayan moleküllerin sayısı toplamda uyarılmış moleküllerin sayısına oranlanır. Bu oranın 1'e yaklaşması floresans kuantum veriminin oldukça yüksek olduğunu gösterirken 0'a yaklaşması kuantum veriminin çok düşük olduğuna işaret eder.

$$\Phi = \frac{\text{Salınan foton sayısı}}{\text{Absorplanan fotonların sayısı}} \quad (1.3)$$

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ISC} + k_{IC}} \quad (1.4)$$

Bu denklemde k_f ; floresans hız sabiti, k_{ISC} ; sistemler arası geçiş hız sabiti, k_{IC} ; iç dönüşüm hız sabitidir (Valeur 2001).

Floresans olayı 250 nm'den küçük dalga boylarında nadir olarak gerçekleşir. Çünkü, organik moleküller bu ışınların sebep olduğu miktardaki enerjiyle koparılabilecek bağlara sahip oldukları için $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi nedeniyle olan floresans nadiren görülür; bu geçiştense daha az enerji gerektiren $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri gözlenir.

1.4.3. Floresans kuantum verimi ve geçiş tipleri

$\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin molar absorbtivitesi $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin $10^2 - 10^3$ katıdır. Yine $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinden daha kısa sürelidir. Bu da $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin kuantum veriminin daha fazla olduğunu kanıtlar. Ayrıca singlet – triplet halleri arasındaki geçişlerdeki enerji farkının büyük olması, sistemler arası geçiş hızı sabiti k_{ISC} 'nin, π, π^* uyarılmış halinden daha küçük olmasına neden olur. Yani π, π^* uyarılmış halinin elektron çiftlerini ayırmak için daha fazla enerjiye gereksinimi vardır. Bu nedenle singlet uyarılmış hal ile triplet uyarılmış halin titreşim enerji seviyelerinin çakışması ve sistemler arası geçiş ihtimali daha az olasıdır (Skoog and West 1980).

1.4.4. Floresans ve yapı

Floresans özellik taşıyan moleküller incelendiğinde, moleküler yapının içerdiği gruplara bağlı olduğu görülmüştür. Bu gruplar içerisinde düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip olan aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerin daha fazla floresans özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Aromatik bileşiklerin yanı sıra alifatik, alisiklik ve karbonil grubu

içeren yapıları bünyesinde bulunduran bileşikler, çok yüksek konjuge çift bağ içeren yapılar da floresans özelliği göstermesi ihtimal dâhilindedir. Ancak aromatik bileşiklere oranla daha azdırlar. Tüm bu yapıların yanı sıra süstitüsyonda floresans verimini etkiler (Skoog and West 1980). Halojenik süstitüsyonda; halojenin atom numarasındaki artış ağır atom etkisi nedeniyle floresansı azaltır. Aromatik halkaya karboksilik asit veya karbonil grubunun süstitüsyonu floresansı engeller çünkü bu tip bileşiklerde n, π^* sisteminin enerjisi π, π^* sisteminden daha azdır ve floresans verimleri 0'a yakındır.

1.4.5. Yapısal rijitliğin floresansa etkisi

Eğer molekülün yapısı rijit yapılı ise bu moleküllerin floresansı daha fazla olur. Floresans özellik gösteren boyar maddeler katı bir yüzey üzerinde adsorlandığında emisyonu artar. Bazı organik maddeler bir metal iyonuyla kompleks oluşturması sonucunda molekül rijitliğinde bir artış görülebilir. Böyle durumlarda da floresansta bir artış gözlenebilir.

1.4.6. Floresansa konsantrasyon etkisi

Floresans şiddeti konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Floresans ışımının gücü F , sistem tarafından absorplanan uyarıcı ışık (I_0) gücüyle orantılıdır. Yani

$$F = k(I_0 - I) \quad (1.5)$$

Bu denklemde I_0 ; Uyarıcı ışın şiddeti, I ; Geçen ışın şiddeti k ; Kuantum verimidir.

Lambert-Beer yasasından faydalanarak;

$$I = I_0 10^{-\epsilon \cdot l \cdot C} \quad (1.6)$$

değeri denklem (1.5)'de yerine koyup düzenleme yaparsak;

$$F = k I_0 (1 - 10^{-\varepsilon l C}) \quad (1.7)$$

eşitliği elde edilir. Eşitlikte ε ; molar absorpsiyon katsayısı (L / mol.cm), l ; örnek kabının kalınlığı veya ışığın çözelti içinde kat ettiği yol (cm), C ; çözeltinin molar konsantrasyonudur (mol / L). Bu denklemi, denklem (1.2)'de verilen absorbans denkleminde yararlanarak Mac Lauren serisi ile açtığımızda;

$$F = k I_0 (2.303 A - (2.303 A)^2/2! + (2.303 A)^3/3! - (2.303 A)^4/4! + \dots) \quad (1.8)$$

eşitliği elde edilir. Düşük konsantrasyonlarda bu eşitliğin yalnızca ilk terimi kullanılabileceği için denklem;

$$F = k I_0 (2.303 A) \quad (1.9)$$

olarak yazılabilir. Burada Denklem (1.2)'deki eşitlik kullanılır ve sabitlere K denirse, Denklem (1.9)'daki eşitlik;

$$F = K I_0 \varepsilon l C \quad (1.10)$$

haline dönüşür. Denklemde; floresans şiddetinin konsantrasyon ile doğru orantılı olduğunu söyleyebiliriz. Aynen Lambert-Beer yasasında olduğu gibi burada da floresans şiddeti ile konsantrasyon artışı değerleri belirli limitlerde lineerliği korumaktadır. Floresans şiddeti – Derişim eğrisinin doğrusallıktan sapmasının iki nedeni vardır. Bunlar özsoğurma (Tekrardan soğurma = reabsorption) ve öz söndürme (Kuençleşme = Quenching) olaylarıdır. Bu olaylar sebebiyle negatif yönde sapmalar görülür.

Özsoğurma; Moleküllerin yayımladığı floresans ışının dedektöre gelinceye kadar aldığı yolda diğer moleküllerle karşılaşması suretiyle enerjisinin bir kısmını bu karşılaştığı moleküllerce soğurulması olayıdır. Yüksek konsantrasyonlu veya derişik çözeltilerde karşılaşılacak molekül sayısı çok olacağı için floresans şiddeti düşer.

Özsöndürme: Uyarılmış moleküllerin birbirleriyle ve çözücünün molekülleriyle etkileşerek kendi bünyelerindeki enerjiyi ışımasız olarak diğer moleküllere aktarmak suretiyle dış dönüşüm gerçekleştirirler bu olaya özsöndürme (kuençleşme) denir ve derişim artışıyla etkileşimin artmasına bağılı olarak floresans şiddetinde azalma gözlemlenir. Ayrıca absorbans değerinin yüksek olması durumunda da (örneğin 1,0 veya yukarı değerler gibi) floresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki doğrusallıktan sapmalar görölmektedir.

1.4.7. Sıcaklık ve çözücü etkileri

Birçok molekül için sıcaklığın artması, çarpışma frekansını arttırıp ışımasız deaktivasyon olasılığını yükselttiğı için floresans kuantum verimini azaltır. Çözücü viskozitesinin azalması ve sıcaklığın artması aynı etkiyi yaparak ışımasız geçiş olaylarının olasılığını arttırıcı etki yapar. Çözücü polaritesine bağılı olarak, $n \rightarrow \pi^*$ geçiş enerjilerinin polar çözücülerde artması, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş enerjisinin azalması sonucunda $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş olayının floresansı artar. Ağır atom içeren çözücüler ve/veya yapısında ağır atom bulunduran bileşikler için floresans şiddeti azalacak yönde bir davranış sergiler. Bunun sebebi orbital-spin etkileşimine bağılı olarak triplet yapıya geçiş durumu hızının artmasına bağlanmaktadır.

1.4.8. Floresansa pH'nın etkisi

Asidik veya bazik ana halkaya bağılı fonksiyonel grupları bulunan bir aromatik bileşimin floresansı, çoğunlukla pH'ya bağılıdır. Uyarılmış molekülün asit dissosiasyon sabiti aynı molekülün temel haldeki değerlerinden farklıdır. Yapılan çeşitli çalışmalarda uyarılma ile asit, baz dissosiasyon sabitlerinin değışebildiğı gözlemlenmiştir (Valeur 2001).

1.4.9. Floresansa çözünmüş oksijen etkisi

Floresans özellik gösteren bir çözeltilinin şiddeti; ortamda çözünmüş oksijen bulunması durumunda azalır. Floresans şiddetinin azalmasının nedenlerinden birisi, molekül-oksijen ikilisinin fotokimyasal tesirle oksidasyonu kaynaklı olabilir. Bir diğeri ise moleküler oksijen paramagnetik özelliktedir. Bu yüzden sistemler arası geçişi hızlandırır ve uyarılmış moleküllerin triplet hale geçmesini hızlandırarak sonuçta floresans şiddeti azalmasına neden olurlar.

1.4.10. Floresans yaşam ömrü (Lifetime)

Floresans ömrü, floroforun uyarılmış halde geçirdiği karakteristik zamandır. Uyarılmış halde florofor çevreyle bir takım etkileşimler geçirir. Bunlar:

- Çarpışmayla kuençleşmeler
- Floresans enerji transferleri
- Sistemler arası geçişler
- Dönme hareketleri'dir.

Homojen sistemler prensip olarak tek bir floresans yaşam ömrü değeri gösterirken heterojen sistemler ise tipik olarak birden fazla floresans yaşam ömrü değerine sahiptirler.

1.5. Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET)

FRET uzun menzilli dipol-dipol etkileşimleri ile donör-akseptör arası elektromanyetik enerji transferidir. Floresans rezonans enerji transferi mekanizması Förster tarafından (1946) ilk olarak açıklığa kavuşturulmuştur. Floresans rezonans enerji transferinde floresans özellikli uyarılmış ilk molekülün (donör) sahip olduğu uyarılmış durum enerjisini başka bir moleküle (akseptör) aktarmasının söz konusu olduğu fiziksel bir

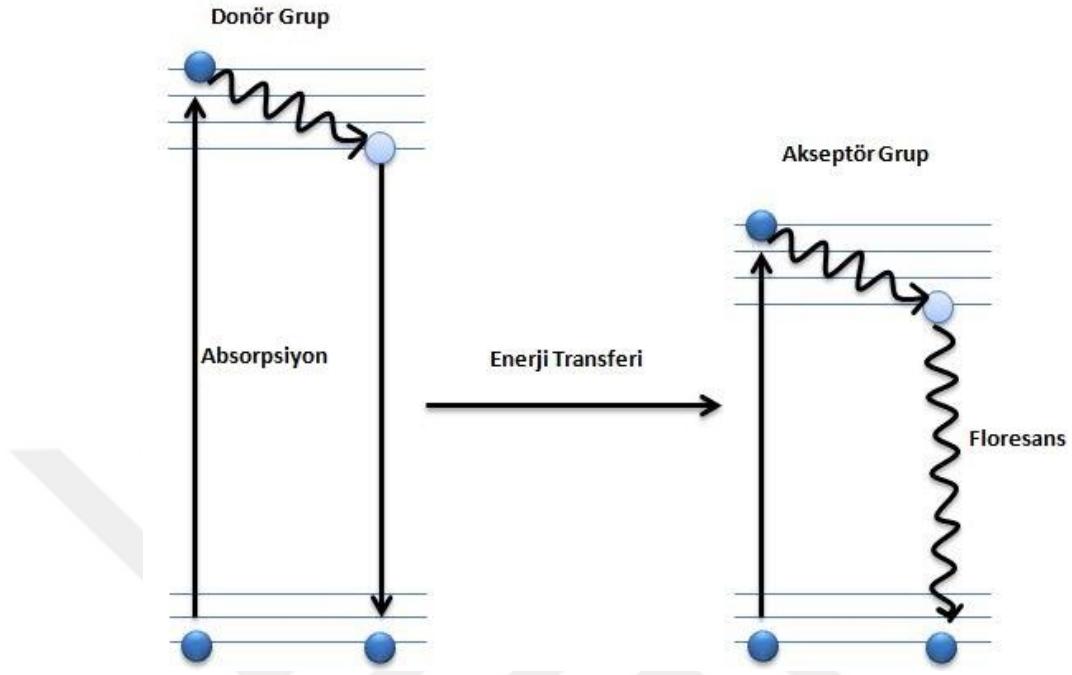
süreçtir ve transfer verimi donör ile akseptör arasındaki mesafeye bağlıdır (Valeur 2001).

FRET'in potansiyel olarak kullanımının önemli hale gelmesi 1970'lerin ortalarından sonra gerçekleşmiştir. Floresans ömrü enstürmantosyonda meydana gelen gelişmeler ve oryantasyon faktörlerindeki belirsizliği minimize hale getirmek için yapılan önermelerden sonra daha doğru hesaplanmaya başlanmıştır ve bu sayede enerji transferi temelli moleküler uzaklıklar üzerine literatür artışı gözlemlenmiştir.

Bir çok çalışma kompleks intermoleküler yapıların karakteristik özelliklerini incelemek ve protein, lipit, nükleik asitler gibi çeşitli moleküler bileşenlerden oluşan multi komponent yapıların geometrik karakteristiklerini saptamak için kullanılan bir teknik olarak belirtilmiştir. Bu yöntem yüksek hassaslıkta, spesifiklikte, hızlilikta ve rölatif basitlikte ölçüm imkânı sağlamasından dolayı ilgi çekmiştir.

FRET, uyarılma enerjisinin moleküler-arası uzun menzilli dipol-dipol etkileşime bağlı olarak, bir uyarılmış florofordan (donör) başka bir moleküle (akseptör) aktarıldığı mesafeye bağlı bir fiziksel işlemdir. FRET, moleküller arası mesafenin genellikle 10-100 Å olduğu durumlarda doğru sonuçlar veren bir yöntemdir. Eğer donör ve akseptör arasındaki mesafe yeterince yakınsa diğer bir ifadeyle donörün yarıçapına yakın bir mesafede konumlanmışsa oldukça etkili bir yöntemdir (Şekil 1.4) (Sekar and Periasamy 2003).

Enerji transferinin söz konusu olduğu bu teoride enerji transferi yapabilecek bir titreşimli dipole sahip uyarılmış elektronik durumdaki florofor grubunun benzer bir rezonans frekansına sahip ikinci bir dipol ile etkileşmesi mantığına dayanmaktadır (Meer et al. 1994).



Şekil 1.4. FRET'in temsili şematik gösterimi.

FRET mekanizmasında, ilk olarak donör fotonla uyarılarak bir miktar enerji absorbe eder ve uyarılma enerjisi yakınında bulunan akseptör bir moleküle transfer eder. Enerji transferi, donör grubun floresans şiddetinin azalması yoluyla ya da spektrumunun düşük enerjili bölgeye kayması ile gerçekleşmektedir. Bu durum donör grubun floresansının azalması uyarılmış hal ömrünün azalması, akseptör grubun floresans şiddetinin artmasıyla beraber gerçekleşir (Özçeşmeci 2010).

FRET olayı; transfer olunan enerjinin büyüklüğü veya verimliliğinin tespiti, iki florofor arasındaki mesafenin tespitinde, moleküler etkileşimlerin anlaşılmasında, moleküllerin konformasyonel yapıları ve biyokimyasal olayların aydınlatılması için verimli bir yöntemdir.

1.6. Floresans Kuençleşmesi

Floresans kuençleşmesi, bir floresans özellik gösteren maddenin floresans şiddetini azaltan herhangi bir işleme verilen isimdir. Literatürdeki bazı çalışmalarda, bazı floroforların farklı işlemler sonucunda floresans kuençleşmesine maruz kaldıkları bahsedilmiştir. Bu işlemlerden bazılarını örnek verecek olursak; uyarılmış hal reaksiyonları, enerji transferleri, kompleks oluşumları, çarpışmaya bağlı (dinamik) kuençleşme başta gelir.

Kuençleşmenin anlaşılması için öncelikle florofor ve kuençır (kueçleşmeye neden olan ikinci bir tür; molekül veya atom) arasındaki ilişki bilinmelidir. Florofor ve kuençır arasındaki etkileşime bağlı olarak statik ve dinamik kuençleşmeden bahsedilmektedir (Valeur 2001). Statik kuençleşmede temel hal kompleks oluşumu esas teşkil ederken, dinamik kuençleşmede florofor ve kuençır arasındaki çarpışmalar belirleyicidir. Statik kuençleşme dinamik kuençleşmeye oranla daha komplike bir prosestir.

Floresans kuençleşmesi, hem temel bir olay olarak hem de floresansın biyokimyasal problemlere uygulanmasında kapsamlı olarak incelenmiştir. Bu uygulamalar kuençleşme prosesinin olumlu özelliklerinden kaynaklı olarak ortaya çıkmıştır. Hem statik kuençleşme hem de dinamik kuençleşme florofor ve kuençır arasında moleküler teması gerektirir.

Dinamik kuençleşmede, kuençırın uyarılmış florofora diffüze olması önemlidir. Kuençır ile temasla florofor bir foton emisyonu olmadan temel durumuna döner. Statik kuençleşmede ise florofor ve söndürücü (kuençır) arasında bir kompleks oluşur ve bu kompleks floresans özellikte değildir. Her iki durumda da florofor ve kuençırın arasında bir temasın bulunmasına ihtiyaç vardır. Örneğin kuençleşme ölçümlerinde, kuençırın florofor molekülüne ulaşılabilirliği belirleyici olmaktadır. Eğer çözücü fazla viskoz yapıdaysa bu difüzyonun yavaş olmasına neden olur ve kuençleşmeyi engeller. Dolayısıyla kuençleşme, kuençır molekülerinin difüzyon oranının belirlenmesini sağlamış olur. Bunun yanı sıra membranda ya da bir proteine bağlı florofor varlığında,

protein veya membran, kuençir (söndürücü) için geçirimsizse ve florofor makro molekülün iç kısmında bulunduğu bir durumdaysa dinamik ve statik kuençleşmenin ikisi de meydana gelmez. Çünkü yukarıda anlatılanlar sebebiyle proteindeki ve membrandaki florofor lokalizasyonunu anlamak ve kuençir geçirgenliklerini ortaya çıkarmak için kuençleşme çalışmaları yapılabilir. Dinamik kuençleşmenin bir diğer önemli özelliği ise, deneyde gözlenebilirliği etkileyen floresans yoğunluğu ve floresans yaşam ömrü gibi parametrelere bağlı olarak, çözelti içerisindeki diffüzyon mesafesinin ve hacminin artabilmesidir.

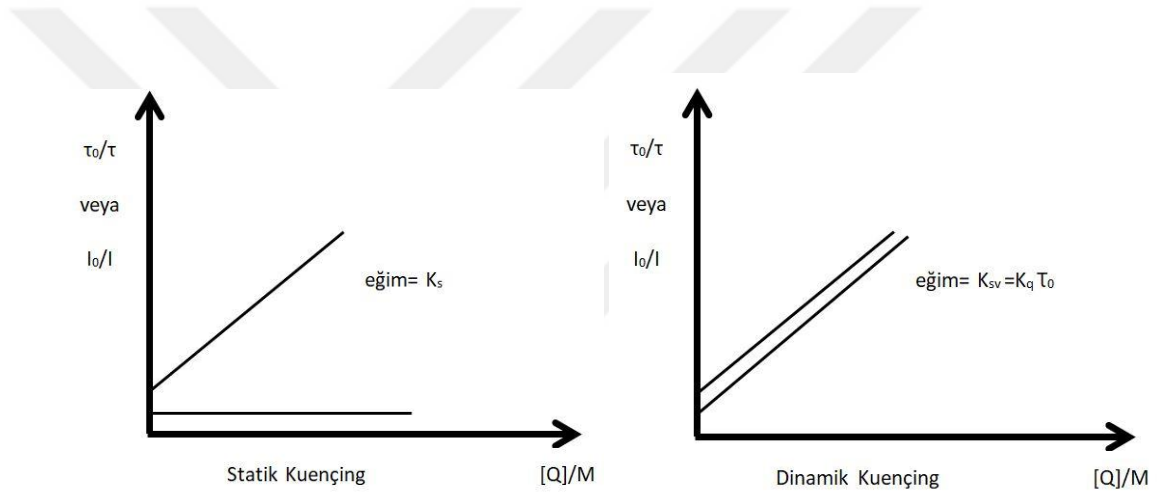
Çoğu florofor kuençleşmesi için oksijen ile çarpışmaları karşılaştırılır bu yüzden floresans kuençleşme ölçümleri ortalama olarak kuençir diffüzyonlarını ortaya çıkarır. 25°C'eki suda bulunan oksijen molekülünün diffüzyon katsayısı $2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sn}$ 'dir. Floresans yaşam ömrü boyunca tipik bir oksijen molekülü 44 Å'a kadar difüze olabilir. Yaşam süresine bağlı olarak difüzyon mesafesi de değişir. Oksijenin 20 ns ve 100 ns ömürleri için oksijenin difüzyonu için ortalama mesafeler yaklaşık 100 Å ve 224 Å aralığındadır. Yukarıda bahsedilen durum çözücü relaksasyonu ile karıştırılabilir. Çözücü moleküllerin yöneliminden kaynaklanan spektral kaymalar, öncelikle floroforun hemen yanında bulunan çözücü kabuğundan kaynaklanmaktadır (Lakowicz 1983).

Deaktivasyon prosesleri incelendiğinde ortamda tek bir tür molekül varsa monomoleküler, ilgilenilen türün dışında başka bir tür varsa bimoleküler terimleri kullanılmaktadır. Uyarılmış haldeki florofor ortamdaki bir diğer molekül olan kuençir ile temas ederek deaktive olursa çarpışmalı (dinamik) kuençleşme meydana gelirken, kuençir ile florofor temel halde bir kompleks oluşturarak deaktive olursa statik kuençleşme meydana gelir.

Kuenleşme olayları temel olarak Stern-Volmer (S-V) denklemiyle incelenmektedir (Lakowicz 1983). S-V denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1.11)$$

Eşitlikte I_0 , kuençır yokluğunda floroforun floresans şiddetini, I , kuençır varlığında floroforun floresans şiddetini, K_{SV} , S-V sabitini ve $[Q]$, kuençır konsantrasyonunu temsil eder. Statik ve dinamik kuençleşmeyi birbirinden ayırt etmek amacıyla sistemin farklı sıcaklık, viskozite ve floresans yaşam ömrü ölçümlerinden yararlanılabilir. Dinamik kuençleşmede sıcaklık arttıkça difüzyon katsayısındaki artışa bağlı olarak bimoleküler kuençleşme sabitinin değeri artar. Statik kuençleşmede dinamik kuençleşmenin aksine sıcaklık artışıyla kompleks stabilitesinde azalma olacağı için statik kuençleşme sabitinde azalma gözlenir (Munkholm et al. 1990). Temsili Stern-Volmer grafiği Şekil 1.5’de verilmiştir.



Şekil 1.5. Statik ve dinamik kuençleşmenin temsili gösterimi

Statik ve dinamik kuençleşmeyi birbirinden ayırt etmek için kullanabileceğimiz bir yol olarak florofor absorpsiyon spektrumundaki değişimin incelenmesidir. Dinamik kuençleşmede sadece floroforun uyarılmış halleri etkilenirken, floroforun absorpsiyon bandında değişme gözlenmez. Bunun aksine statik kuençleşmede temel halde kompleks oluşumu sebebiyle floroforun absorpsiyon spektrumunda değişim gözlenebilir.

Statik ve dinamik kuençleşmeyi ayırt etmede bir diğer ve en etkili metot floresans ömrü ölçümleridir. Kompleks oluşturan florofor, floresans özelliğinde değildir ve gözlemlenen floresans sadece kompleks oluşturmamış florofordan kaynaklanır. Statik kuençleşmede floresans ömrü sabit iken başlangıç emisyon şiddeti azalır. Dinamik

kuençleşmede kuençir konsantrasyonunun artışı ile başlangıç emisyon şiddeti sabit kalırken floresans yaşam ömürleri azalır.

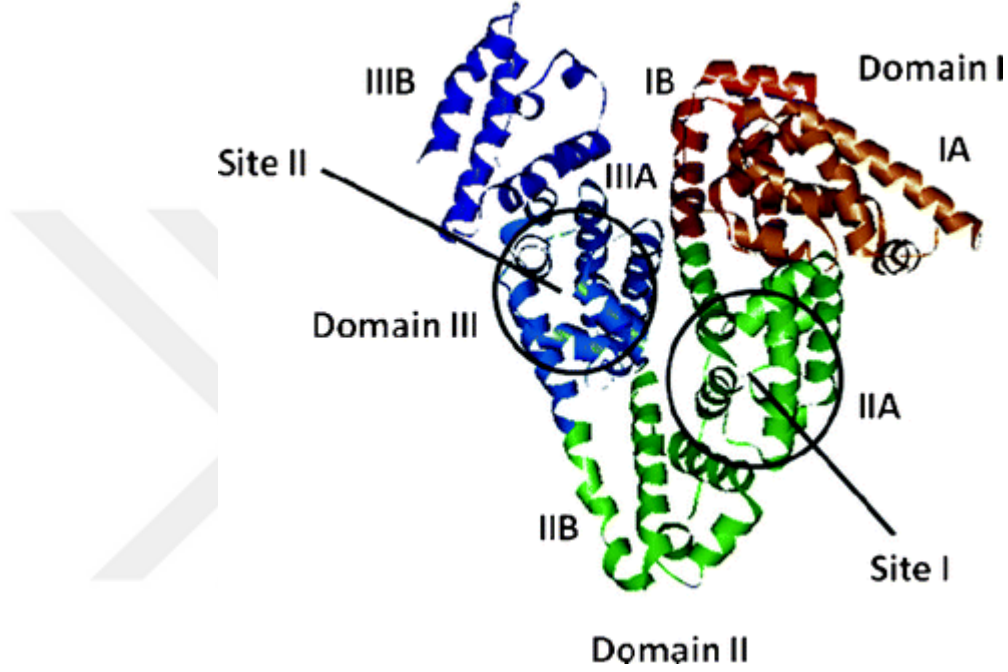
1.7. Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumine=BSA)

BSA, sığır serum albümin, genellikle standart protein olarak kullanılan bir proteindir. BSA proteini 607 aminoasitten oluşur. Ancak proteinin N terminal ucunda 18 aminoasitten oluşan sinyal peptit dizisi, salgılanma sırasında öncü proteinden çıkarılır. Ayrıca olgun BSA proteininin oluşması için bu proteinin N terminal ucundan 4 aminoasit çıkarılması gerekir. Bu işlemler sonucu BSA proteini 585 aminoasit içeren bir protein haline gelir. BSA proteininin moleküler ağırlığı 66,463 Da, erime sıcaklığı 60°C'dir.

Sığır serum albümini biyolojik reaksiyonlarda kararlı olup çok sayıda biyokimyasal uygulamada kullanılan globüler bir proteindir. Çözünür monomerik bir protein olan albümin proteini serum proteinlerinin yaklaşık olarak yarısını oluşturur. Albümin steroidler, yağ asitleri, tiroit hormonları gibi moleküller için bir taşıyıcıdır ve ekstraselüler sıvı hacmini dengeler. Albümin küresel bir gliksilatlanmış serum proteindir ve karaciğerde preproalbümin olarak sentezlenir. Bir peptit çıkarıldıktan sonra ilkel endoplazmik retikulumdan proalbümin salınır daha sonra salgılanan albümini üretmek için golgi veziküllerinde parçalanır.

BSA serum proteinlerinden albümin alt sınıfına dahil olup plazmadaki toplam proteinin yaklaşık yarısını albüminler oluşturmaktadır. Bu da albüminlerin plazmadaki en kararlı ve en yüksek çözünürlükteki protein olduğunu göstermektedir. Albümin yapısı öncelikle yapılan hidrodinamik deneyler (Hughes 1954; Squire et al. 1968; Wright and Thompson 1975) ve düşük açılı X-Işını saçılması deneylerine (Bloomfield 1966) dayalı sonuçlara bağlı olarak 140x40 Å boyutlarında bir elips olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaları takip eden daha sonraki çalışmalarda albümin yapısının puro şeklinde olduğu ortaya konmuştur. Ama ¹H NMR ile yapılan çalışmalarda yapının elips şeklinde değil, daha doğru tasvirinin kalp şeklinde olduğunu göstermiştir (Akkılıç 2006).

Sığır Serum Albümin 3 domain (ünite) ve bu üç domain'in her birinde ikişer tane olmak üzere toplamda 6 tane alt üiteden (subdomain'den) meydana gelmiştir. BSA molekülünün primer yapısında düzenli bir yük dağılımı görülmez. Sığır serum albumin'in tahmini yapısı Şekil 1.6'da olduğu gibidir.



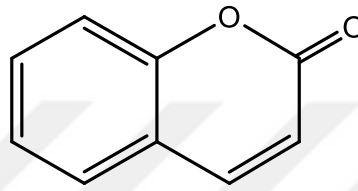
Şekil 1.6. Sığır serum albüminin yapısı (Patra et al. 2012)

BSA yapısında bulundurduğu aspartik asit ve glutamik asit sebebiyle asidik özellik gösterirken; yapısında bulundurduğu arjinin, histidin, lisin aminoasitleri sebebiyle bazik özellik gösterir. Bu sebeple amfoter özelliğe sahip olan BSA kolayca proton alma ya da proton verme özelliğine sahip olmaktadır. pH'ın düşük olduğu asidik ortamlarda BSA ortamdaki proton aldığı için pozitif olarak yüklenirken, pH'ın yüksek olduğu bazik ortamlarda ise molekül proton vererek negatif olarak yüklenmektedir (Acar 2006).

1.8. Kumarin

Kumarin bitkilerde sık rastlanan kimyasal bileşiklerden biridir. Özellikle; orkideler, baklagiller, maydanozgiller ve aromalı bitkiler gibi bitki türleri doğal olarak oluşan

kumarin bileşiklerinin başlıca kaynağıdır. Benzo- α -piron grubunun ana bileşiği olan kumarinin izole edilmesi ilk olarak tonka baklası (*Dipteryx Odorata*) ağacının tohumlarından Vogel (1820) tarafından gerçekleştirilmiştir. Kumarinin yapısı hakkında çeşitli kimyasal yapılar önerilmiş olup ilk doğru yapı Strecker (1867) ve Fitting (1868) tarafından ortaya konulmuştur (Sethna ve Shah 1945). Kumarin bileşiğinin moleküler yapısı Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7. Kumarin’in moleküler yapısı

Kumarin ve türevleri; analjezik, antifungisit, antihelmitik, anti HIV, antienflamatuar, antikoagülant, antikanser, antioksidan, diüretik, hipotermal, lipit düşürücü, vazodilatör, bakteriyostatik vb. etkilere sahip olmaları nedeniyle özellikle biyoloji ve tıp alanında yapılan araştırmalara konu olmuştur. Aşağıdaki Çizelge 1.3’de kumarinin biyolojik etkileri ve bu etkilerini araştıran bilim adamları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Kumarin ve türevlerinin biyolojik etkileri (Koçak 2011)

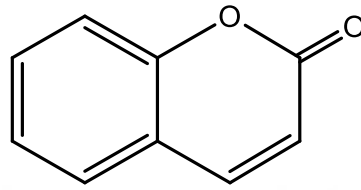
Biyolojik etki	Etkiyi bulan bilim insanı
Analjezik (Ağrı kesici)	(O’Kenedy and Thornes 1997)
Antibakteriyel	(Soine 1964; Inoue et al. 1994; Kayser and Kolodziej 1997)
Anti-fungisit	(O’Kenedy and Thornes 1997)
Anti-helminitik (Solucan düşürücü ilaç)	(Soine 1964)
Anti-HIV	(O’Kenedy and Thornes 1997; Spino et al. 1998; Ivezic and Trkovnik 2003)

Çizelge 1.3. (devam)

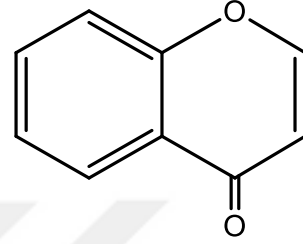
Anti-inflamasyon (iltihaplanma kesici)	(O'Kenedy and Thornes 1997)
Antikanserojen	(Sener ve Mutlugil 1987; Wang et al. 2002; Kempen et al. 2003; Reddy et al. 2004)
Antikoagülan (Kan sulandırıcı)	(Soine 1964; Singer and Kong 1966; Murray 1982; Wolfbeis et al. 1983; Sener ve Mutlugil 1987; Takadate et al. 1997)
Antioksidan	(Kontogiorgis and Hadjipavlou 2003)
Diüretik (idrar arttıran ilaç)	(O'Kenedy and Thornes 1997)
Hipotermal (Ateş düşürücü)	(Soine 1964)
iltihaplanmayı azaltmak	(Khan and Sharma 1993)
Koloretik (Karaciğerden safra salgılanmasını uyaran madde)	(Soine 1964)
Lipit düşürücü ajanlar	(Madhavan et al. 2003)
Östrojenik	(Soine 1964)
Solunum stimülasyonu	(Soine 1964)
Steroid 5 α -redüktaz'ın inhibesi	(Fan et al. 2001)
Vazodilatör (Damar genişletici)	(Soine 1964; Hoult and Paya 1996; O'Kenedy and Thornes 1997)

Kumarinler, doğal olarak elde edilebilir veya sentetik olarak sentezlenebilirler. Piron halkasının benzen halkası ile kondense olması sonucu benzopiranlar olarak bilinen bir heterosiklik bileşik sınıfı oluşur. Heterosiklik halkadaki karbonil grubunun konumuna göre iki tür benzopiron bileşiğinden söz etmek mümkün olur. Bunlardan ilki α -piron halkasının benzen halkasına kondense olmasıyla oluşan kumarindir. Diğeri, γ -piron halkasının benzen halkasına kondense olmasıyla oluşan kromondur (Şekil 1.8). Günümüzde farklı sentez yöntemleri kullanılarak sentezlenen kumarin türevlerini içeren materyaller elektro-optik materyallerde, organik-inorganik hibrit materyallerde, sıvı kristal materyallerde, ışık depolama/enerji transfer materyallerinde ve biyokimyasal

malzeme gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılır. Yine organik kimyada önemli bir yere sahip olan kumarinler, gıda, parfüm katkı maddesi, boya, serbest radikal yok edici gibi birçok uygulama alanında mevcut olup gelişen teknolojiye artarak yer almaktadır.



Kumarin



Kromon

Şekil 1.8. Kumarin ve kromon bileşiklerinin temel yapısı

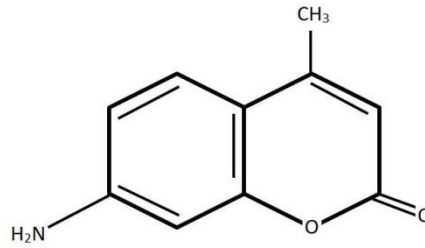
Kumarinler ve türevleri Pechmann, Knovengel, Witting ve Perkin gibi farklı yöntemlerle sentezlenebilen türevleri ilk defa 1868 yılında Perkin yöntemiyle sentezlenmiştir. Bitkiler, kumarinlerin en önemli doğal kaynağıdır, ancak bitkilerden izole edilmeleri zaman alıcıdır ve gelişmiş aletler gerektirir.

Kumarinler renksiz bileşiklerdir. Ancak kumarin halkasına takılan sübstitüentlere göre renkli olabilmektedirler. Ayrıca takılan sübstitüentlerin konumu kazanacakları özellikler açısından önemlidir. Örneğin 7 konumunda elektron verici gruplar bulunduran yapılar floresans özelliği, 6 konumunda hidroksit yapılı olanlar anti fungal özelliği gösterir. Kumarin bileşikleri gösterdikleri floresans özelliklerinden dolayı son yıllarda özellikle ilgi çekmektedir. Sübstitüe olmayan kumarin türevi çok az floresans özellik gösterirken, özellikle 7-konumuna çeşitli sübstitüe grupların yapıya dahil edilmesiyle bileşiğin floresans özellik gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle; kumarin bileşiğinin 7- konumuna bir elektron verici grubun olduğu ve 3- ve/veya 4- konumunda bir sübstitüentin (genellikle 3-konumunda heterosiklik halka olan) olduğu kumarin bileşiklerinin gösterdiği önemli fotofiziksel davranışın incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 7-konumunda bir elektron verici grup bulunan kumarin bileşiklerin floresans özellik göstermesi yapıdaki dipol–dipol rezonans etkileşimleri ile açıklanmaktadır ve yapıdaki

benzen halkasının bir elektron verici, piron halkasının ise elektron çekici grup olarak davrandığı belirlenmiştir (Yanar 2014).

Kumarin halkası içeren polimerler, kumarin türevleri, kumarinlerin dye lazerlerde ve organik ışık yayan diotlarda (LED) kullanımı üzerine yapılan çalışmalarda görünür bölgede etkili floresans özellik gösterdiği tespit edilmiştir. 1940'dan sonra kumarin bileşiklerinin kısmen absorpsiyon ve floresansının ayarlanabilirliğinden fotofiziksel özellikleri çalışılmaya başlanmıştır. 1950'lerin sonlarında ise Wheelock, kumarin yapıları üzerindeki süstitüentlerin floresans bandında kaymaya sebep olduğunu göstermiştir.

Kumarinlerin güçlü absorpsiyon ve yüksek ışınım verimleri onları iyi bir dye lazer boyası yapmaktadır. Kumarinlerin kısmi rijitlik ve solvatokromik özellikleri yoğun faz ortamlarının floresans problemleri olarak, özellikle floresans depolarizasyonu yoluyla çözücü-çözünen etkileşimi ve zamana bağımlı çözücü yeniden düzenlemesiyle Stokes kayması floresans çalışmaları için geniş bir kullanım alanı oluşturmaktadır.



Şekil 1.9. Kumarin 120 bileşiğinin moleküler yapısı

Bizim tez çalışmamızda kullandığımız kumarin ailesinin üyesi olan ve Şekil 1.9'da gösterilen kumarin 120 bileşiği diğer adıyla 7-amino-4-metil-kromen-2-on olarak da bilinir. Kumarin ailesinin bilinen temel moleküllerinden biridir. Bu molekül 7 pozisyonunda bir elektron sağlayıcı amin grubu içermekte olup molekülün floresans özelliğini arttırdığı bilinmektedir. Kumarin bileşiklerinin 7-konumunda elektron verici süstitüent bulduran türevleri güçlü floresans gösterirler. Kumarin türevlerinde olduğu

gibi kumarin 120'de non-lineer optik kromofor ve homojen çözeltilerdeki çözünürlük dinamiği çalışmaları için uygun prob olarak kullanılabilir. Moleküler ağırlığı 175,187g/mol olan kumarin 120; aseton, kloroform, N,N-dimetil formamid, dimetil sülfoksit, etanol, metanol gibi çözücülerde çözünür. pH 7'de tampon solüsyonu içerisinde hazırlanan çözeltilerinde absorpsiyon ve emisyon pikleri sırasıyla 342 nm ve 441 nm'dedir. Kumarin 120, amiloid β peptitlerin, bakterilerin, karbonhidrat/şeker gibi yapıların, nanokristallerin, metal iyonlarının, nükleotitlerin, proteinlerin, slika nanopartiküllerin işaretlenmesinde kullanılmaktadır. Biyolojik ve medikal uygulamalarda; etkili bir antitüberküler ajan olmaları sebebiyle bakterilerin sınıflandırılması, üriner kallikrein seviyesinin ölçülmesi, kanser hücrelerinin platin IV indirgenmesi ve platin II reaksiyonlarının görüntülenmesi, aromatik aminoasit dekarboksilaz aktivitesi, histon deasetilaz aktivitesi, hidrolaz/esteraz aktivitesi, mikrobiyal nitroredüktaz aktivitesi, proteaz/proteinaz/peptidaz aktivitesi vb. çalışmalarda yararlanılmaktadır. Endüstriyel olarak renk görüntüleme cihazlarında, mürekkeplerde, kaplanmış alüminyum korozyonunun görüntülenmesinde, boya duyarlı güneş pillerine (DSCs), gözenekli slika fiberlerde vb. kullanım alanlarında rastlanmaktadır (Sabnis 2015).

Bu tez çalışmamızda kumarin 120 bileşiğinin BSA proteini ile olan etkileşimi floresans ve absorpsiyon spektroskopisi teknikleriyle incelenmiş, elde edilen veriler çeşitli modellerle yorumlanmış ve sonuçta bu ikilinin sıvı ortam iyon sensör olma özelliği irdelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Siyanin boyar maddelerinin, kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinden yola çıkılarak; asitlik sabiti spektrometrik ve kemometrik metotlara bağlı olarak hesaplanabilen yeni bir merosiyanin boyar madde sentezlenmiştir. Sentezlenen bu yeni katyonik merosiyanin boyar maddenin fizyolojik tampon çözeltisi (pH 7,4) içerisinde Sığır Serum Albumin (BSA) ile etkileşimleri UV-Gör absorpsiyon ve floresans spektroskopisi yöntemleriyle incelenmiştir. Artan boyar madde konsantrasyonuna karşın BSA'ya ait band maksimumlarında kuvvetli bir maviye kayma ve bu kaymaya eşlik eden kuvvetli bir floresans kuençleşmesi gözlenmiştir. Kuençleşme mekanizmasının aydınlatılmasında 3 farklı sıcaklık (290 K, 300 K, 308 K) kullanılmış ve kuençleşme sabitleri Stern-Volmer eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Modifiye Stern-Volmer denklemine göre BSA ve boyar madde arasındaki kuençleşmenin statik kuençleşme mekanizması üzerinden yürüdüğü tespit edilmiştir. Hesaplanan termodinamik parametreler etkileşmelerin esas olarak entropi temelli olduğunu gösterirken; entropinin pozitif, entalpinin negatif olmasına dayanarak elektrostatik etkileşimlerin önemli bir rolünün olduğu gösterilmiştir. Yerinden çıkarma deneyleri, boyar maddenin albüminin alt bölgesi II A'ya (Site I) bağlandığını doğrulamıştır. Ayrıca senkronize floresans spektroskopisi çalışmaları, boyar maddenin BSA'da bazı bölgesel konformasyonel değişiklikleri indüklediğini ortaya koymuştur. Donör (BSA) ile akseptör (boyar madde) arasındaki bağlanma mesafesi r , Förster teorisine göre elde edilmiş ve serbest BSA'nın floresans spektrumu ile UV-Gör absorpsiyon spektrumu arasında 1/1 oranında spektral örtüşmeye dayanarak yüksek enerji transfer mekanizmasının var olduğu belirlenmiştir. BSA'nın moleküler çevresi hakkında bilgi almak için yapılan senkronize floresans spektroskopisi çalışmalarında 15 nm ve 60 nm'deki ölçümler sonucu tirozin çevresindeki polaritenin azalmasına hidrofobikliğin eşlik ettiği bulunmuştur. Bu yüzden bu rezidünün boyar madde ilavesiyle daha az çözücüye maruz kaldığını ancak triptofan bölgesi için bu durumun tersinin söz konusu olduğu gözlemlenmiştir. Emisyon maksimumunun kırmızıya kayması ise boyar madde bağlanmasından sonra etrafındaki polariteyi arttırdığını ve hidrofobikliğini azalttığını göstermiştir (Samari et al. 2016).

Kumarin 120 (C120) ve kumarin 151'in (C151) temel hal ve uyarılmış halinin özelliklerinin hesaplanmasının amaçlandığı çalışmada CASSCI, CASPT2 (hem tek hem de çok aşamalı sürümleri), CIS ve ZINDO'ya karşı Zaman Bağımlı Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (TDDFT) hesaplamaları yapılmıştır. TDDFT kullanılarak yapılan hesaplamalar, deneysel S_1 , S_0 uyarılma enerjileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu çalışmaya dayanarak bazı sonuçlara varılmıştır. (1) C151'in gaz fazı için TICT oluşumu fotoeksetasyon üzerinde etkili olmadığına; (2) S_1 halinin, düzlemsel bir amin grubu oluşturmaya, temel halden daha fazla eğilim gösterdiğine; (3) gaz fazı ve temel hal dipol momentleri ile deneysel değerleri arasında önemli farklılıkların olduğuna; (4) Su-C151 kompleksleri için TDDFT sonuçları, Topp ve çalışma arkadaşlarının deney sonuçları ile uyum içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Hibrit fonksiyonelleri kullanan TDDFT'nin sonuçları, deneysel verilerle yüksek oranda uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. ZINDO S/CI'nin (Zerner's Intermediate Neglect of differential overlap-spectroscopic version with configuration Interactions) uyarılma enerjilerini kullanan bütün elektron metotlarıyla uyumlu sonuçlara sahip olduğu bulunmuştur. Ancak C120'nin S_1 durumu için hesaplanan dipol momentleri, diğer yöntemlerle hesaplananlarla kıyaslandığında daha küçük bir değerde olduğu görülmüştür. C120'nin dipol momentinin C151'in dipol momentinden daha büyük olmasıyla birlikte bu iki molekül içinde benzer temel hal dipol moment değerleri bulunmuştur. Bununla birlikte C151'in ve C120'nin temel hal dipol momentleri için tüm yapılan hesaplamalar deneysel hesaplamalardan en az 0,5 D daha büyük olduğu görülmüştür. Kullanılan çeşitli metotlara dayanarak deneysel hesaplamaların çok daha küçük olabileceği veya amin halka bağında rotasyonla denge geometrisine göre önemli derecede dip durum dipol momentlerine yol açtığı ortalama termal geometriyi temsil edebileceği önerilmiştir. C151 için temel hal ve S_1 hali arasındaki dipol moment farkının gaz fazında yaklaşık 3-4 D olduğunu ve bu çözünürlük etkisi için düzenlendiğinde Samanta ve arkadaşlarının hesaplamalarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca Topp ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi üç su-C120 kompleksi incelenmiş ve deneylerde gözlemlenen sonuçlara bu çalışmada da ulaşılmıştır. Ulaşılan sonuçlar DFT (Yoğunluk Fonksiyonel Teori) ve TDDFT'nin,

kumarinlerin ve benzer organik kromoforların spektroskopisini ve özelliklerini arařtırmak için yararlı ve oldukça dođru olacađını dűşündürműřtür (Cave et al. 2002).

Yapılan bir çalıřmada; endűstriyel bir boyar madde olan trifenil metan–kristal menekřesi (CV) ve sıđır serum albűmin (BSA) arasındaki etkileřim incelenmiřtir. Bu etkileřimin incelenmesinde spektroskopik yűntemler ve molekűler kenetlenme (molecular docking) hesaplamalarından yararlanılmıřtır. UV-Gűr spektrofotometre ile alınan absorpsiyon spektrumlarında temel halde var olan bir kompleks gűzlemlenirken, floresans ۆlűmleriyle CV-BSA arasında statik kuençleřme űzerinden yűrűyen bir kuençleřme olduđu gűzlenmiřtir. Molekűler kenetlenme ile birlikte site markerlarının bađlanma rekabeti deneyleri, CV molekűlűnűn BSA alt domainleri olan II A’da spesifik olarak bađlı olduđu gűzlemlenmiřtir. Termodinamik olarak yapılan denemelerle ve molekűler kenetlenme çalıřmalarının bu denemeleri desteklemesiyle hidrofobik etkileřimlerin hűkim olduđu ve CV molekűlűnűn hidrofobik aminoasit kalıntılarıyla çevrili olduđu kanıtlanmıřtır. Bađlanma sűrecindeki BSA’nın konformasyonel deđiřikliđini tespit etmek için dairesel dikroizm spektrumu ve FTIR spektrumundan yararlanılırken; dinamik ıřık saçılımı (DLS) ile yapılan ۆlűmlerle de BSA’nın boyutunun deđiřimi tespit edilmiřtir (Qin et al. 2016).

6-amino kumarin (A6C) bileřiđine ait floresans ۆlűmleri ile yapılan çalıřmada, A6C bileřiđinin 7-sűbstitűe analogları olan 4-metil-7-amino kumarin (A7C) ve 4-metil-7-dietil amino kumarin (DEA7C)’in spektrum karřılařtırılmaları yapılmıř ve A6C ‘ye ait emisyon band maksimumlarında çok kuvvetli bir kırmızıya kayma gűzlemlenmiřtir. Homolog alkollerdeki solvatokromik kırmızıya kayma, A6C için çok daha gűclű olduđu gűzlemlenmiř ve bu durumun artmıř bir dipol momente de iřaret edebileceđi dűřűnűlműřtür. Bu emisyonlardan sorumlu durumlardan birinin de bűkűlműř molekűl içi yűk transferi (Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT) durumu olduđu tespit edilmiřtir. Yalnızca 7 konumunda bir elektron donor gruba sahip olan kumarin boyaları oldukça yűksek ve ayarlanabilir bir laser etkinliđi gűsterirken, 6 konumunda bir elektron donor grubun olması floresans kuantum verimini kuvvetle dűřűrdűđu gűzlemlenmiřtir. Sűbstitűe grup ve űzűcűye bađımlı olarak, amin ve kumarin

kısımlarının verici (donor) ve alıcı (akseptör) özellikleriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Dialkil iskelet düzlemine dikey olarak bükülmüş dialkil amino grubu ile bükülmüş molekül içi yük transferi (TICT) durumu olarak belirlenmiştir. Rijit haldeki rodamin boyar maddeleri oda sıcaklığında rijit olmayan yapılarına (rhodamine B'ye karşı rhodamine 101 [9-11]) kıyasla, arttırılmış bir floresans kuantum verimi göstermiştir. Tüm bu bahsedilen durumlarda TICT halinin floresan özellikte olmadığı bulunmuştur. TICT halinde emisyon çok istisnaidir ancak bununla beraber TICT emisyonunun gerçekleştiği örnekler genellikle ikili floresansla [8,14-19] birlikte gerçekleşir ve TICT halinde emisyonla ilgili bilgi edinmek için ikili floresans ile gerçekleşen emisyonun önemli bilgiler verebileceği kanaatine varılmıştır. Salvatokromik ölçümler TICT durumunun simetrik bileşikler için bile tam bir yük ayrımı içerdiğini göstermektedir. Bu çalışmadaki fotofiziksel veriler TICT durumundaki emisyonun tutarlı olduğunu göstermiştir (Retting and Klock 1985).

İki yeni C-glikozid-kumarin boyar maddesi sentezlenmiş ve bu maddelerin sığır serum albümin (BSA) ile etkileşimleri UV-Gör ve floresans spektroskopisi ile incelenmiştir. Boyar maddelerin floresans emisyonunda çözücü polaritesinin artmasıyla kırmızıya kaymalar ve kuençleşmeler görülmüştür. Ayrıca boyar maddelerin floresans şiddetlerinde, pH 7,4 ve fosfat tampon solüsyonunda BSA eklenmesiyle bir artış gözlenmiştir. BSA'nın miktarının belirlenmesinde floresans ayırıcı olarak görülen bazı proteinlerden ve aminoasitlerden daha seçici ve daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. BSA için hazırlanan floresans prob, kumarin floroforuna β -C-Furil Glikosid eklenerek hazırlanmıştır ve sentezlenen bu bileşikte floresans şiddeti ve BSA konsantrasyonu arasında lineer bir ilişki gözlemlenmiştir. İyi seçicilik, doğrusal konsantrasyon-sinyal ilişkisi (0-2,0 mg/ml), prob'un biyolojik örneklerde BSA algılaması için potansiyel bir aday olabileceği düşünülmüştür (Gu et al. 2017).

Sığır serum albümin (BSA) ve kumarin 35 (C35) arasındaki bağlanma mekanizması ve protein floresans prob etkileşimleri UV-Gör absorpsiyon ve floresans spektroskopileri kullanılarak araştırılmıştır. Spektroskopik veriler BSA-C35 sistemi için temel hal kompleksinin oluşturduğu varsayılan statik kuençleşme gözlemlenmiştir. Bu floresans

kuençleşme işlemleri Stern-Volmer kuençleşme sabitleri ve bağlanma sabitleri farklı sıcaklıklarda hesaplanarak Stern-Volmer yöntemiyle analiz edilmiştir. Senkronize floresans spektroskopisi yöntemi konformasyonel değişiklikleri incelemek için kullanılmıştır. Senkronize floresans çalışmaları sonucunda C35 moleküllerinin BSA'ya tirozin bölgesi tarafından yaklaştığı sonucuna varılmıştır. Sistemin etkileşimleri ve yapısal değişikliklerinin anlaşılması için termodinamik parametreler kullanılmıştır. Hesaplanan termodinamik parametreler, BSA-C35 çiftinin absorpsiyon ve floresans verileri ile birlikte, hidrofobik etkileşimlerin BSA'nın C35 ile olan etkileşiminde önemli rol oynadığını doğrulamıştır. BSA (donör) ile C35 (akseptör) arasındaki mesafe r , FRET yöntemi kullanılarak 2,75 nm olarak hesaplanmıştır (Bayraktutan and Onganer 2017).

Kumarin 120'nin fotofiziksel özellikleri üzerine çözücü polaritesi, sıcaklık etkisi, uyarılan boyar maddesi için farklı deeksitasyon yollarını ortaya çıkarmak ve böylece polar olmayan çözücülerde alışılmadık davranışlarını anlamak üzere yapılan çalışmada kumarin 120'nin fotofiziksel özellikleri farklı çözücü polaritesine göre değişimi LFP (picosecond laser flash photolysis) ve PR (nanosecond pulse radiolysis) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemler kullanılarak yapılan çalışmada çözücüler içerisindeki mevcut boyar madde için sistemler arası geçiş prosesinin ihmal edilebilirliği ortaya konmuştur. Orta ve yüksek polariteli çözücülerde boyar maddenin 7-NH₂ grubu ve 1,2 benzopiran kısmı arasındaki bağın önemli çift bağ karakteri elde ettiği ve intramoleküler bir yük transferi yapısında olduğu belirtilmiş ve bu yapıda 7-NH₂ grubunun flip-flop hareketi oldukça kısıtlı halde olduğu vurgulanmıştır. C120 orta ve yüksek polaritedeki çözücülere kıyasla polar olmayan çözücülerde beklenmedik sonuçlar göstermiştir. Orta ve yüksek polaritedeki çözücülerde Stokes kayması durumunda; floresans kuantum verimleri ve floresans ömürleri, çözücü polaritesi ile daha az lineer korelasyon göstermiştir. Nonpolar çözücülerde tüm bu değerlerde alışılmadık derecede sapmalar gözlemlenmiştir. Floresans kuantum verimleri ve floresans ömürleri polar olmayan çözücülerde, diğer çözücülerden farklı olarak yüksek oranda sıcaklığa bağımlıdır. C120'nin uyarılmış S₁ durumunun, diğer çözücülerde bulunmayan hızlı aktivasyon kontrollü radyasyonsuz deaktivasyon işlemine uğradığı gösterilmiştir (Pal et al. 2003).

Yapılan bir çalışmada sürekli akış elektroforezi yöntemiyle kumarin antikoagulan ilacı olan varfarin sodyumun yalnızca plazma proteinlerinin albümin fraksiyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. İnsan plazma albümini kristali ve varfarin sodyum solüsyonlarının etkileşimleri denge diyaliziyle incelenmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre albümin varfarin içerisinde 30°C'de 154.000'lik bir birleşme sabitine sahiptir ve güçlü bir bağlanma bölgesi vardır. Ayrıca daha küçük afiniteli birkaç sitenin sekonder sınıflarına da sahip olduğu görülmüştür. İlk anyonun 3°C ve 370°C'de belirlenen sabit bağlanma enerjisi, sırasıyla mol başına -6,54 ve -7,01 Kkal'dir. Standart entalpi değişimi söz konusu etkileşim için mol başına -3,48 Kkal ve entropi değişimi +11,2 U olarak hesaplanmıştır. Negatif entalpi değişimi beklenmedik şekilde büyük iken pozitif entropinin anyon-albümin etkileşimi için küçük olması noniyonik bağlanmanın söz konusu olabileceğini düşündürmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda varfarin kullanıldığında, albümin bağlanma bölgelerinin doyurulma yetersizliği, bağlanma işlemi sırasında albümin molekülünün tersine çevrilebilir bir konfügurasyon değişimiyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Termodinamik veriler incelendiğinde varfarin sodyum için albümin bağlanma bölgelerinin antijen antikör reaksiyonları sırasında oluşmasındansa, bağlanma işlemi sırasında oluştuğunun daha olası olduğunu göstermiştir. Bağlanma işleminin gücüne bakarak, insandaki varfarin sodyumun farmakodinamik niteliklerinin çoğunda, plazma albümin ile güçlü bir etkileşim içinde olduğunu göstermiştir (O'Reilly and Kowitz 1967).

Kumarin 120 (C120)'nin sulu çözeltideki kadmiyum sülfür nanopartükülleri (CdS NPs) ile etkileşimleri, UV-Gör absorpsiyon, zaman bağımlı floresans ve elektro paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. C120'nin floresans şiddeti, çözeltideki Cds NPs miktarının artırılmasıyla kuençleşmenin etkili bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Sulu çözeltide, C120 moleküllerinin floresans kuençleşmesi, floresans özellik taşımayan C120/CdS NPs kompleksinin oluşumuna atfedilmiştir. C120 floresans durulmaları sulu çözeltideki CdS NPs'leri varlığında iki üstel (bi-exponential) olurken, C120'nin floresans bozulmaları deiyonize suda tek üstel (single-exponential) olması, CdS NPs'lerin yüzeylerine adsorbe olmuş bazı C120 moleküllerine karşılık gelirken, sulu çözeltide C120 moleküllerinin bazılarının ise

serbest olduğunu göstermiştir. Ayrıca spektroskopik veriler C120 molekülleriyle CdS NPs arasında elektrostatik etkileşimlerin olduğunu göstermiştir. Gözlenen etkileşim sabiti K_{app} ve C120/CdS NPs'ler için bağlanma derecesi (α) sırasıyla 4 nm CdS NPs için $130,03 \text{ M}^{-1}$ ve 0,51 iken 8 nm CdS NPs için $624,3 \text{ M}^{-1}$ ve 0,71 olarak hesaplanmıştır. Işık etkili EPR çalışmaları CdS nanoparçacıkları ve C120 arasında herhangi bir elektron transferinin söz konusu olmadığını göstermiştir (Acar et al. 2015).



3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kumarin 120 (7-amino-4-metil-kromen-2-on), sığır serum albümin (BSA) (%98 \leq), tampon çözeltiyi hazırlamada kullanılan tris (%99,5 \leq) ve sodyum klorür (NaCl) (%99,5 \leq) bileşikleri sigma firmasından temin edilmiştir. Etanol Merck firmasından (%99,8 \leq), metal iyonlarının klorürlü bileşikleri (KCl, BaCl vb.) Fluka firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Spektrofotometre: Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

Spektroflorofotometre: Shimadzu RF-5301 PC Spectrofluorophotometer

Saf su cihazı: Jencons Autostill 4000X

Ultrasonik karıştırıcı: Bandelin Sonorex

Otomatik Pipetler: Socorex

pH metre: Mettler-Toledo S220 SevenCompact pH meter

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Kumarin 120 (C120) bileşiğinin $1,0 \times 10^{-6}$ M'lık stok çözeltisi etanol içerisinde hazırlandı. Belirlenen konsantrasyonlardaki BSA çözeltisini hazırlamak için, 0,05 mol/L Tris, 0,15 mol/L NaCl ve HCl kullanılarak hazırlanan pH'sı 7,4 olan tampon çözelti çözücü olarak kullanıldı. Tampon ortamında BSA miktarı sabit tutularak, C120 miktarının artırılmasıyla oluşturulan çözeltilerin (C120-BSA çözeltileri) numuneleri kullanılarak spektroskopik ölçümler yapıldı. Ayrıca 100 μ l'lik 100 μ M konsantrasyonunda 10 farklı metal iyonu, BSA ve değişen miktarlarda C120 içeren (metal iyonu-BSA-C120) numuneler kullanılarak metal iyon sensör çalışmaları için de ölçümler yapıldı.

3.4. Floresans, Absorpsiyon ve Senkronize Floresans Spektrumlarının Alınması

BSA, metal iyonları ve farklı derişimlerde Kumarin 120 boyar maddesi kullanılarak hazırlanan numunelerin dört farklı sıcaklıkta (288 K, 296 K, 303 K, 310 K) absorpsiyon ve floresans spektrumları alındı.

Senkronize floresans spektrumları, proteinlerle ligand bağlanması sonucu meydana gelen konformasyonel değişiklikleri belirlemek amacıyla uyarılma dalga boyu (265 nm) ile emisyon dalga boyu(280 nm) arasındaki fark $\Delta\lambda=15$ nm ve uyarılma dalga boyu (250 nm) ile emisyon dalga boyu (310 nm) arasındaki fark $\Delta\lambda=60$ nm olacak şekilde 5 μ M BSA ile 5 nM'den 500 nM'e kadar C120'nin farklı derişimleriyle hazırlanan BSA-C120 sisteminin senkronize floresans spektrumları alındı. Spektrumların incelenmesi sonucunda, $\Delta\lambda=15$ nm iken alınan spektrumlar BSA'nın tirozin bölgesindeki değişimlerin yorumlanmasında veri oluştururken; $\Delta\lambda=60$ nm iken alınan spektrumlar BSA'nın triptofan bölgesindeki değişimleri yorumlamada veri oluşturdu.

Elde edilen tüm spektral verilere bağlı olarak C120 bileşiği ile BSA ve metal iyonları arasındaki etkileşimler yorumlandı.

3.5. Floresans Kuençleşmesi Çalışmaları

BSA-C120 sisteminde moleküler etkileşimler ile kuençleşmenin türünü belirlemek ve elde edilen verilerle çalışmamızı desteklemek amacıyla 4 farklı sıcaklıkta (288 K, 296 K, 303 K, 310 K) Stern-Volmer ve modifiye Stern-Volmer denklemi olarak bilinen Lineaveawer-Burk eşitliklerinden yararlandı. Moleküller arasındaki etkileşimlerin ve kuençleşmenin etkinliğini belirlemek amacıyla belirtilen sıcaklıklarda moleküllerin bağlanma sabitleri ve bağlanma bölge sayısını tespit etmek amacıyla çift logaritmik denklem kullanıldı.

3.5.1. Stern-Volmer denklemi

Sistemde bulunan sönümleyici molekülün uyarılmış haldeki floroforla etkileşimi sonucunda temel hale geçişi ışımsız olarak meydana gelen dinamik kuençleşmeyi incelerken Stern-Volmer eşitliğinden yararlanıldı. Bu eşitlik denklem (3.1)'de verilmiştir.

$$F_0 / F = 1 + kq \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, F_0 ; kuençer yokluğunda floroforun floresans şiddeti, F ; kuençer varlığında floroforun floresans şiddeti, kq ; Bimoleküler kuençleşme hız sabiti, τ_0 ; kuençer yokluğunda uyarılmış hal ömrü, K_{SV} ; Stern-Volmer kuençleşme sabiti, $[Q]$; kuençer derişimini ifade etmektedir.

Stern-Volmer kuençleşme sabiti (K_{SV}) değerini bulmak için; $[Q] - F_0 / F$ grafiği çizilir. Bu grafikte kesim değeri 1'e eşit olmalıdır. Grafiğin eğimi K_{SV} değerini verir. K_{SV} değerinin büyük veya küçük oluşu floroforun makromolekülle etkileşimine bağlıdır. Floroforun kuençıra ulaşabilmesi zor olduğu durumlarda K_{SV} değeri küçük olurken, floroforun biyomolekülün yüzeyinde veya serbest halde bulunması gibi durumlarda floroforun kuençıra ulaşımının kolay olması K_{SV} değerinin büyük olmasına sebep olur (Lakowicz 2006).

3.5.2. Lineweaver-Burk denklemi

Bazı durumlarda florofor kuençir moleküllü ile kompleks oluşturabildiği gibi dinamik kuençleşme de gösterebilir. Böyle bir durum, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenen Stern-Volmer denkleminin modifiye hali olarak da bilinen Lineweaver Burk denklemiyle anlaşılır. Lineweaver-Burk Denklemi aşağıdaki gibidir.

$$F_0 / (F_0 - F) = 1/f + 1/f K_{LB} [Q] \quad (3.2)$$

Bu denklemde, F_0 ; kuençırın olmadığı durumdaki floresans şiddeti, F ; kuençırın olduğu durumdaki floresans şiddeti, f ; erişilen floresans yapma kesri, $[Q]$; kuençır konsantrasyonunu, K_{LB} ; statik kuençleşme sabitini ifade etmektedir.

Söz konusu denklemden yararlanarak farklı sıcaklıklarda K_{LB} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca ayrışma (dissosiasyon) sabitleri de (K_D), statik kuençleşme sabiti kullanılarak ($1/K_{LB}$) hesaplandı. K_{LB} ve K_{SV} sabitlerinin sıcaklık artışına bağlı olarak değişimi incelenerek kuençleşmenin türüne karar verildi.

3.5.3. Çift Logaritmik denklem

BSA-C120 arasındaki moleküler etkileşimlerin etkinliğinin (kuençleşmenin etkinliği) ve bağlanma yerlerinin sayısının belirlenmesi amacıyla aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\log(F_0 - F) / F = \log K_A + n \log [Q] \quad (3.3)$$

Bu denklemde; F_0 ; kuençırın olmadığı durumdaki floresans şiddeti, F ; kuençırın olduğu durumdaki floresans şiddeti, $[Q]$; kuençır konsantrasyonunu, K_A ; bağlanma sabitini ve n ; bağlanma yeri sayısını ifade etmektedir. Burada $\log [Q]$ 'ya karşı $\log(F_0 - F) / F$ 'nin grafiği çizilerek eğimden n değeri, kesim noktasından ise K_A belirlenir.

Burada da çalışmalar dört farklı sıcaklık (288 K, 296 K, 303 K, 310 K) için gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık değişimine bağlı olarak bağlanma yerlerinin sayısı ve bağlanma sabitlerinin değerleri çizilen grafikler üzerinden hesaplandı ve yorumları bir sonraki bölümde tartışıldı.

3.6. Sıcaklık Çalışmaları ve Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi

Stern-Volmer (S-V) denkleminde yararlanılarak elde edilen S-V kuençleşme sabitlerinin, van't Hoff denkleminde kullanılmasıyla; ΔG (Gibbs Serbest Enerji değişimi), ΔH (Entalpi değişimi) ve ΔS (Entropi değişimi) değerleri hesaplandı.

Termodinamik veriler hesaplanırken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır.

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3.4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3.5)$$

Burada K ; S-V kuençleşme sabitini, R ; ideal gaz sabitini, T ; mutlak sıcaklığı, ΔH ; entalpi değişimini, ΔS ; entropi değişimini ve ΔG ise Gibbs enerji değişimini ifade etmektedir.

Dört farklı sıcaklık (288 K, 296 K, 303 K, 310 K) için $1/T$ karşı $\ln K$ grafiği çizildi. Bu grafikte ΔH değeri doğrunun eğiminden yararlanılarak hesaplanırken, ΔS değeri için kesim noktasından yararlanıldı. ΔG değeri için denklem (3.5) kullanıldı.

3.7. FRET

Sığır serum albümin (BSA) ile C120 arasındaki mesafenin belirlenmesi amacıyla FRET metodu kullanıldı. BSA (donör molekülü) 298 nm'de uyarılarak floresans spektrumu alındı. Daha sonra C120 bileşiğinin (akseptör) absorpsiyon spektrumu alındı. Donör molekülü ile akseptör molekülü arasındaki enerji transferi etkinliği için donör molekülümüz BSA'nın floresans spektrumu ile akseptör molekülümüz C120'nin absorpsiyon spektrumunun örtüşme alanı denklem (3.6) yardımıyla ve enerji transfer etkinliği ise denklem (3.7) yardımıyla her bir sıcaklık için belirlenmiştir.

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_d(\lambda) d\lambda} \quad (3.6)$$

Eşitlikte $F_d(\lambda)$, donörün her bir dalgaboyundaki (λ) floresans şiddetini, $\varepsilon_a(\lambda)$, akseptörün her bir dalgaboyundaki (λ) molar absorpsiyon katsayısını temsil etmektedir.

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3.7)$$

Burada R_0^6 aşağıdaki eşitlik yardımıyla belirlenmiştir.

$$R_0^6 = 8,8 \cdot 10^{-25} \kappa^2 n^{-4} \Phi J \quad (3.8)$$

Bu eşitliklerde, r ; donör ve akseptör arasındaki mesafeyi, R_0 ; enerji transfer etkinliğinin %50 olması için gereken kritik mesafeyi, E ; enerji transfer etkinliğini veya verimini, F ; akseptör varlığında donör molekülünün floresans şiddetini, F_0 ; akseptör yokluğunda donör molekülünün floresans şiddetini, J ; akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumu ile donör molekülünün floresans spektrumunun örtüşme integralini ifade eder.

Çalışmalarımızda ortamın kırılma indisi $n=1,3361$ olarak belirlenmiştir. BSA'ya ait floresans kuantum verimi $\Phi=0,15$ ve dipolün yönelme faktörü $\kappa^2=2/3$ olarak alınmıştır (Ashoka *et al.* 2006).

3.8. İyon Sensör İncelemeleri

BSA-C120 ikili sistemi kullanılarak, metal iyon etkisini sensör amaçlı çalışmalar için 10 farklı metal iyonunun (Na^{+1} , Li^{+1} , Ag^{+1} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , Sn^{+4}) her biri için tampon çözelti içerisinde numuneleri hazırlandı. Numuneler, 4000 μM Tris-HCl, 5 μM BSA, 190 nM C120 ve 100 μM metal iyonu içerecek şekilde hazırlandı. Bir numune metal iyonu içermeyecek şekilde hazırlanarak 11 numunenin 240 nm - 440 nm

arasındaki dalga boylarında absorpsiyon spektrumu ve 330 nm - 540 nm arasındaki dalga boylarında floresans spektrum ölçümleri yapıldı.

Denklem (3.3)'teki logaritmik denklemden yararlanılarak BSA-C120 ikili sistemi için bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yerlerinin sayısı (n) hesaplandı.



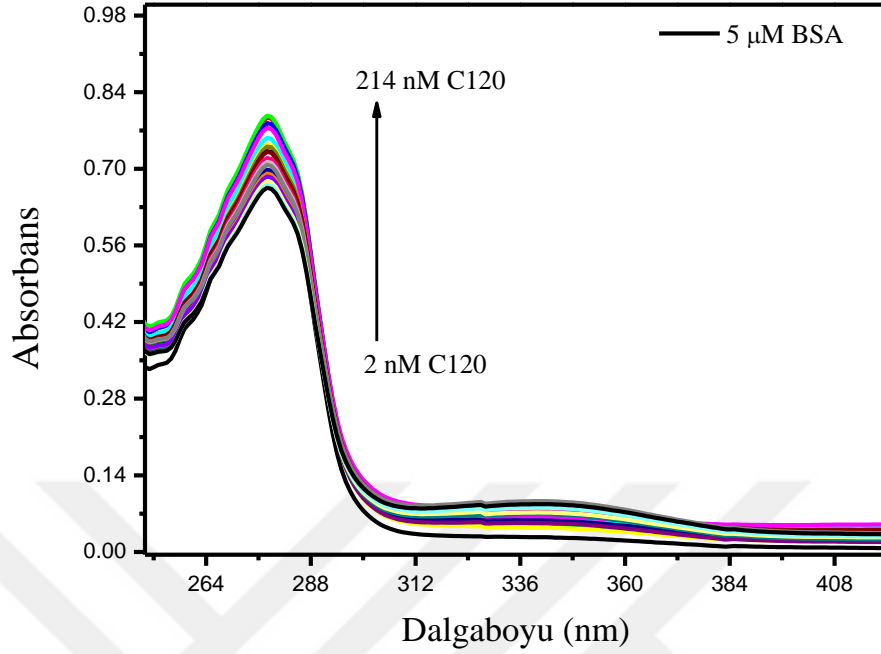
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŐMA

4.1. Kumarin 120 ve BSA'nın Absorpsiyon ve Floresans Spektrumlarının İncelenmesi

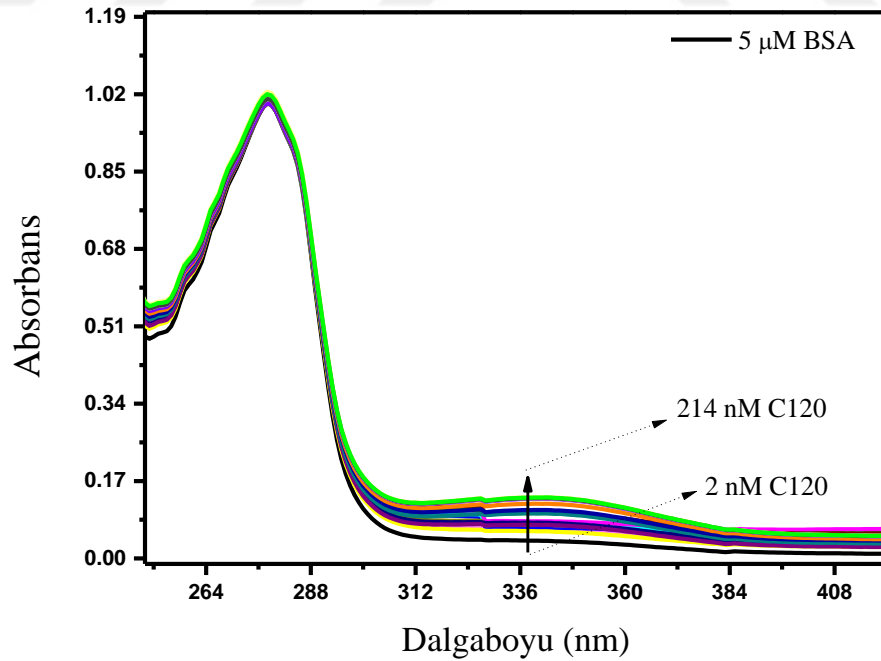
Moleküler yapının aydınlatılması yanında moleküler etkileşimlerin aydınlatılmasında da sıklıkla spektroskopik yöntemler kullanılır. Örneğın moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların etkisini anlamada bize yardımcı olmaktadır. Ultraviyole/Görünür moleküler absorpsiyon spektroskopisinin başlıca kullanım alanları;

- *Kalitatif analizler
- *Kantitatif analizler
- *Spektroskopik titrasyonlar
- *Denge sabitlerinin tayini, vs.

Çalışmalarımızda BSA konsantrasyonu 5 μM 'da sabit tutulurken, C120'nin 2 nM'den 214 nM'ye kadar farklı konsantrasyonları için tampon çözelti içerisinde (pH 7,4) absorpsiyon ölçümleri yapılmıŐ ve Şekil 4.1.a ve Şekil 4.1.b'de absorpsiyon ve normalize absorpsiyon spektrumları verilmiştir.



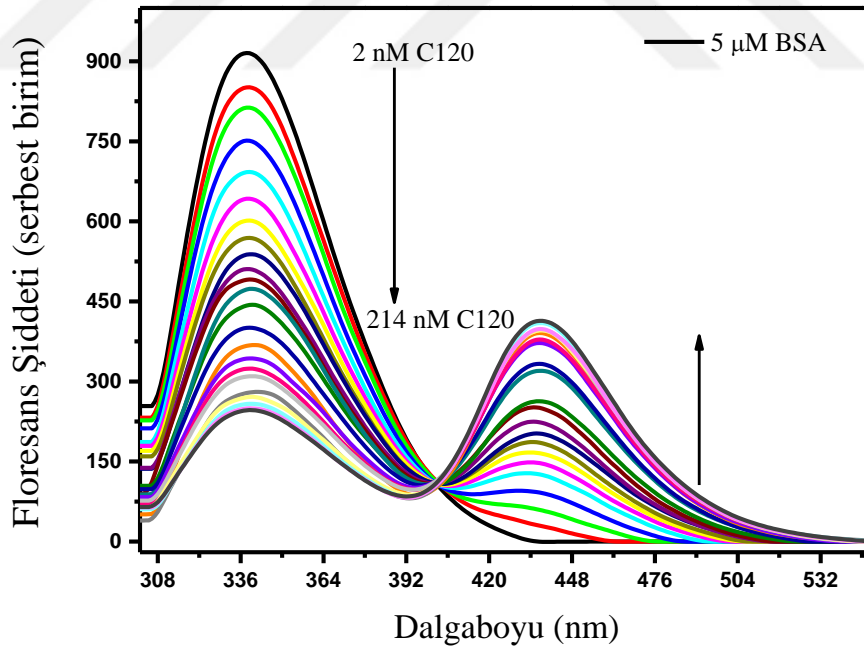
Şekil 4.1.a. 5 μM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlardaki C120 bileşiği varlığında absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.1.b. 5 μM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlardaki C120 bileşiği varlığında normalize absorpsiyon spektrumları

5 μM BSA'ya karşılık C120'nin çözelti içerisindeki molaritesi artırılarak elde edilen absorpsiyon spektrumlarında, yaklaşık 346 nm'de pik maksimumunun C120 konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışların incelenmesi C120 ve BSA arasındaki moleküler etkileşimlerin incelenmesi açısından önemli bulgulardır. BSA'nın absorpsiyon spektrumu incelendiğinde yaklaşık olarak 278 nm dalga boyunda absorpsiyon maksimumu verdiği görülmüştür.

Aynı örnekler için durgun-hal floresans spektroskopisi tekniği kullanılarak floresans spektrum ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de 5 μM BSA bileşiği ile 2 nM'dan 214 nM'a kadar farklı derişimlere sahip C120 ile oluşturulan çözelti sistemleri için 298 nm dalga boyunda uyarılarak oluşturulan floresans spektrumları verilmiştir. Albümin proteininin yapısındaki triptofan ve tirozin bölgelerinin C120 ile etkileşimlerinin incelenebilmesi için uyarılma dalga boyu olarak 298 nm seçilmiştir.



Şekil 4.2. 5 μM BSA bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda C120 bileşiği içeren çözeltileri için floresans spektrumları (λ_{ex} : 298 nm)

C120'nin 2 nM'dan 214 nM'ye kadar belirli aralıklarda artan konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan absorpsiyon ve floresans maksimumları incelendiğinde C120

konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak absorpsiyon bant şiddetinde artmalar görülürken, C120 konsantrasyonundaki artmalara bağlı olarak BSA'nın floresans spektrumlarında floresans şiddetlerinde azalmalar gözlemlenmiştir. Bu durum Şekil 4.2'de yaklaşık 336 nm'de floresans bandı için grlmektedir.

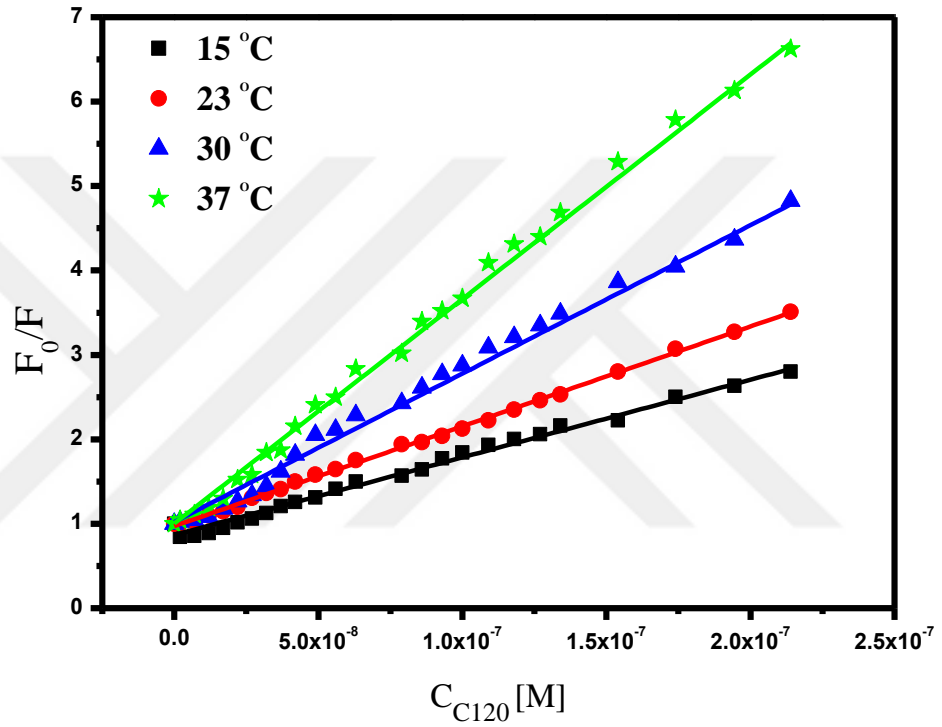
BSA'nın moleküler yapısı incelendiğinde yapının bir kısmının triptofan bölgelerinden oluştuğu bilinmektedir. Triptofan, floresans özellik gösteren bir yapıya sahiptir. Bu sebeple triptofan bölgelerinin emisyonu, bu bölgelerin yakın çevresinde meydana gelen değişikliklerden direkt olarak etkilenecektir. Bundan başka, triptofan bölgelerindeki etkileşimlere bağlı olarak protein zincirinde konformasyonel değişimler de meydana gelmektedir (Bayraktutan 2015). Buna göre Şekil 4.2'de C120'nin konsantrasyonundaki değişimlere bağlı olarak elde edilen floresans spektrumlarında, BSA'nın floresans band şiddetlerindeki azalmalar; BSA ile C120 arasında moleküler etkileşimin olduğunu göstermektedir.

Buna göre Şekil 4.2'ye göre BSA'nın floresans şiddetindeki bir azalma (kuençleşme) gözlemlenirken, bu azalmaya eşlik eden düşük miktarda da maviye kaymalar gözlemlenmiştir. Floresans şiddetindeki azalmaya eşlik eden bant maksimumlarındaki maviye kaymalar, C120 eklenmesiyle triptofan bölgelerindeki mikro çevrenin değiştiğini ve daha hidrofobik bir hal aldığını göstermektedir (Tian *et al.* 2010). Yine C120 ilavesiyle proteinin emisyon maksimumlarındaki kaymalar proteinin açıldığını ve konformasyonunda bir miktar değişimlerin olduğunu belirtmektedir (Sun *et al.* 2005).

C120 konsantrasyonunun artmasıyla elde edilen spektral veriler incelendiğinde, BSA'nın C120 varlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak kuenleştiği grlmştir. C120 konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak BSA'nın kuençleşmesi Stern-Volmer metodu kullanılarak aşağıdaki Şekilde incelenmiş ve Stern-Volmer eğrileri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Bu alışmamızda kuençir molekülü C120 olup, uyarılmış haldeki florofor (BSA) ile etkileşerek BSA'nın ışımasız yolla temel hale geişimini sağlamaktadır. Bu

incelememizde her bir sıcaklık için (3.1) denklemini kullanılmış ve elde edilen veriler yardımı ile $[Q] - F_0 / F$ grafiği çizilmiştir. Grafiklerin eğimlerinden K_{SV} değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.1’de BSA-C120 sistemi için dört farklı sıcaklıkta fizyolojik pH’da elde edilen spektral verilerden faydalanarak Stern-Volmer metodu üzerinden belirlenen kuençleşme sabitleri (K_{SV}) verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı sıcaklıklardaki BSA-C120 sistemine ait Stern-Volmer grafikleri

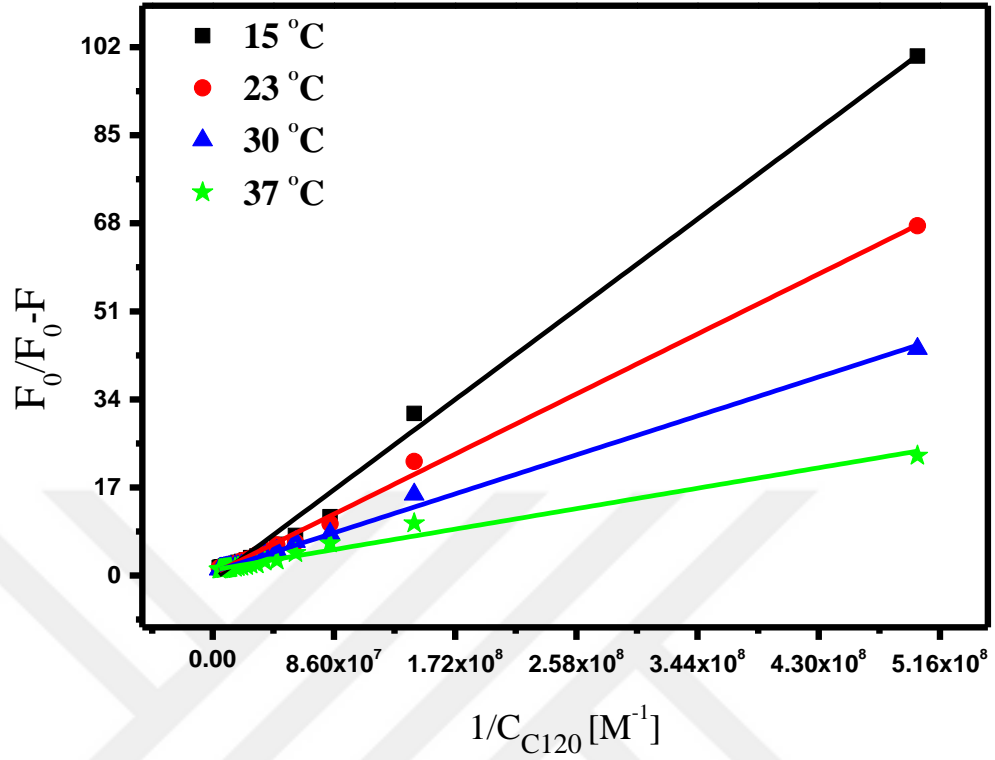
Çizelge 4.1. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklardaki Stern-Volmer kuençleşme sabitleri (K_{SV})

°C	R^2	$K_{SV} \times 10^6 (M^{-1})$
15	0,979	$9,190 \pm 0,026$
23	0,998	$11,822 \pm 0,008$
30	0,975	$17,578 \pm 0,057$
37	0,991	$26,580 \pm 0,052$

İncelediğimiz ikili sistem için statik ve dinamik kuençleşmeyi birbirlerinden ayırt etmede başlıca sıcaklığa dayalı ölçümler, viskoziteye bağlı deneysel bulgular veya floresans ömür ölçümleri kullanılabilir. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi sıcaklık çalışması bu yönüyle de moleküler etkileşimin niteliğini anlamamızda yardımcı olmaktadır. Sıcaklık artışı difüzyon hızını arttıracığı için moleküllerin çarpışmalarını da arttıracaktır. Bu nedenle dinamik kuençleşme söz konusu olduğu zaman S-V metodunda elde edilecek grafiklerin eğimlerinde de artış olacaktır (Lakowicz 2006). Buna göre Şekil 4.3’teki grafikler incelendiğinde $[Q] - F_0 / F$ grafiklerinin eğimlerinin sıcaklık arttıkça arttığı ve yine Çizelge 4.1 incelendiğinde K_{SV} sabitlerinin değerlerinin sıcaklık arttıkça arttığı göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda dinamik kuençleşmenin gerçekleştiği görülmektedir.

Bazı durumlarda florofor aynı zaman aralığında hem statik hem de dinamik kuençleşmeye maruz kaldığı gözlemlenebilir. Böyle durumlarda Stern-Volmer grafiğinin doğrusallığı, artan kuençir konsantrasyonu ile bir sapma göstererek yukarıya doğru yani pozitif bir sapma gösterebilir. Her ne kadar da bunu bizim incelediğimiz sistem için görmesek de, ihtimal dâhilinde olsa statik kuençleşme mekanizmasını analiz etmek için Lineweaver-Burk metodu kullanılmıştır (Liu et al. 2010).

Denklem (3.2) kullanılarak her bir sıcaklık için elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.4’de, bu grafiklerden elde edilen parametreler ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklardaki BSA-C120 sistemine ait Lineweaver-Burk grafikleri

Çizelge 4.2. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen parametre değerleri (pH 7,4).

°C	R ²	<i>f</i>	K _{LB} x 10 ⁶ (M ⁻¹)	K _D x 10 ⁻⁸ (M)
15	0,990	0,864	5,716 ± 0,044	17,50
23	0,996	0,275	15,921± 0,012	6,281
30	0,995	0,718	23,216± 0,013	4,307
37	0,980	0,939	27,008 ± 0,016	3,703

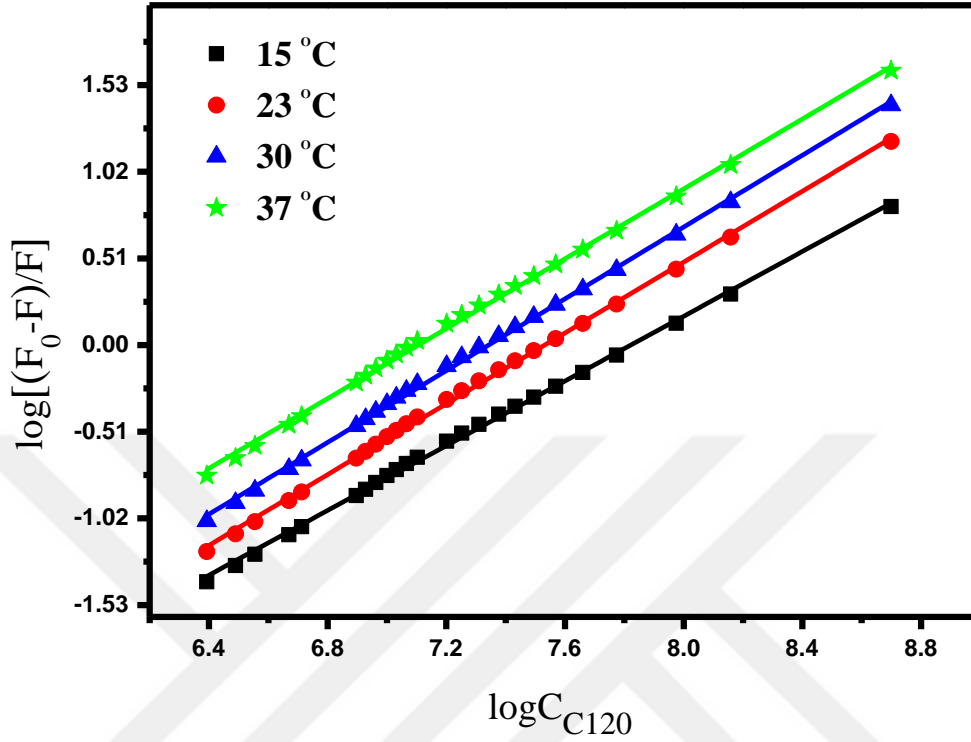
BSA-C120 ikili sistemine ait Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla elde edilen parametreler, statik kuenleşme sabitlerini (K_{LB}), floresans yapma kesri (f) ve ayrışma sabitleri (K_D) Çizelge 4.2’de görülmektedir. Ayrışma sabiti, statik kuenleşme sabiti kullanılarak ($1/K_{LB}$) hesaplanmıştır.

Yukarıdaki verilerden yararlanarak, Lineweaver-Burk statik kuenleşme sabitlerinin (K_{LB}) sıcaklık artışıyla artarken, ayrışma sabitlerinin sıcaklık artışıyla azalması BSA-C120 ikili sisteminin kuenleşmesinin dinamik kuenleşme üzerinden yürüdüğü göstermektedir. Bu durum Stern-Volmer modeli ile elde edilen sonuçlarla da uyum göstermektedir. Eğer statik bir kuenleşme söz konusu olsaydı, K_{LB} değerlerinin artan sıcaklıkla artması değil azalması gerekirdi. Çünkü statik kuenleşmede esas, ikili yapının temel halde bir kompleks oluşturduklarını kabul etmektedir. Yine benzer şekilde statik kuenleşmede K_D değerlerinin artan sıcaklıkla artması gerekirken burada bir azalma görülmektedir.

4.2. Kumarin 120 Bileşiği ile BSA Arasındaki Bağlanma Etkileşiminin İncelenmesi

Yukarıdaki moleküler absorpsiyon ve durgun hal floresans spektroskopisi teknikleriyle elde edilen deneysel verilere dayanarak, Stern-Volmer ve Lineweaver-Burk denklemlerinden yararlanarak BSA ve C120 arasındaki moleküler etkileşimler ve kuenleşmenin türü belirlenmiştir. Bu kısımda ise moleküller arasındaki etkileşimler esnasında gerçekleşen moleküler kilitlenme için, moleküllerin bağlanma sabitleri ve bu etkileşimin gerçekleştiği bölge için de bağlanma yeri sayısı denklem (3.3)'de verilen çift logaritmik denklem yardımıyla hesaplanmıştır. Şekil 4.5'de BSA-C120 ikili sisteminin farklı sıcaklıklarda çift logaritmik denkleme göre çizilmiş grafikleri görülmektedir. Grafiklerin eğim ve kesim noktalarından her bir sıcaklık için hesaplanan bağlanma yeri

sayısı (n) ve bağlanma sabitleri (K_A) Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı sıcaklıklar için BSA-C120 ikili sistemine ait çift-logaritmik grafikler

Çizelge 4. 3. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda elde edilen bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yeri sayısı (n).

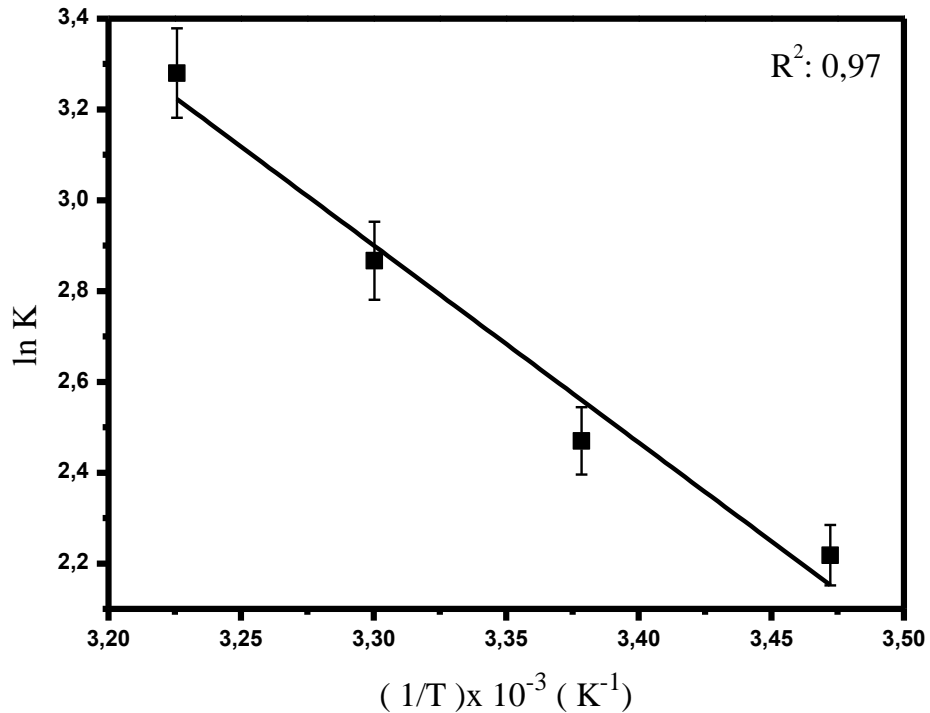
°C	R^2	$K_A \times 10^6$ (M^{-1})	n
15	0,996	3,39	0,93471
23	0,990	7,15	0,95634
30	0,998	15,58	1,02001
37	0,997	114,24	1,06515

Çizelge 4.3'de hesaplanan veriler eşliğinde sıcaklık artışıyla beraber bağlanma sabiti değerlerinde bir artış görülmektedir. Bu da dinamik olarak bir etkileşimin

gerçekleştiğinin yani çarpışmaların artışıyla bağlanma etkileşiminin de arttığını göstermektedir. Bağlanma yeri sayısının ortalama olarak 1 (bir) olması, etkileşimlerin sadece bir merkezde olduğunu ifade etmektedir. Sonuç olarak; Çizelge 4.1 ve 4.2'deki verileri de dikkatte alırsak, sıcaklık artışıyla K_{SV} ve K_{LB} değerlerinin de aynı eğilimde olması, etkileşimlerin proteine ait bir merkezde veya bir bölgede ve sadece dinamik etkileşimler üzerinden yürüdüğü fikrinin geçerli olduğunu kanıtlamıştır.

4.3. Termodinamik Parametrelerin Hesaplanması

BSA ve C120 molekülleri arasındaki etkileşimler termodinamik parametreler kullanılarak da incelendi. Termodinamik parametreler hesaplanırken denklem (3.4) ve (3.5) kullanıldı. Termodinamik parametreler 288 K, 296 K, 303 K, 310 K olmak üzere dört farklı sıcaklık esas alınarak hesaplanmıştır. Denklem (3.4)'ü kullanarak; $1/T$ 'ye karşı $\ln K$ grafiği çizilmiş ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Grafikteki doğrunun eğiminden ΔH değeri hesaplanırken; kesim noktasından da ΔS değeri belirlenmiştir. Denklem (3.5) kullanılarak Serbest Gibbs fonksiyonundaki (ΔG) değişim her bir sıcaklık için hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. S-V Kuenleşme sabitlerinin sıcaklıkla değişimini gösteren grafik

Şekil 4.6 yardımıyla hesaplanan termodinamik parametrelerin ve denklem (3.5) yardımıyla hesaplanan ΔG değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tampon çözelti ortamında BSA-C120 ikili sistemine ait farklı sıcaklıklarda elde edilen termodinamik parametreler

T (K)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)
288	-41241,11	36,12	143,32
296	-42387,70		
303	-43389,96		
310	-44392,22		

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi ΔG değeri negatif bir değer alırken, ΔH ve ΔS fonksiyonları ise pozitif değer almıştır. Serbest Gibbs enerji değişiminin negatif olması, prosesin sıcaklıkla istemli olarak gerçekleştiğini göstermektedir. $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ olması hidrofobik etkileşimlerin baskın olarak varlığını göstermektedir (Qin *et al.* 2010).

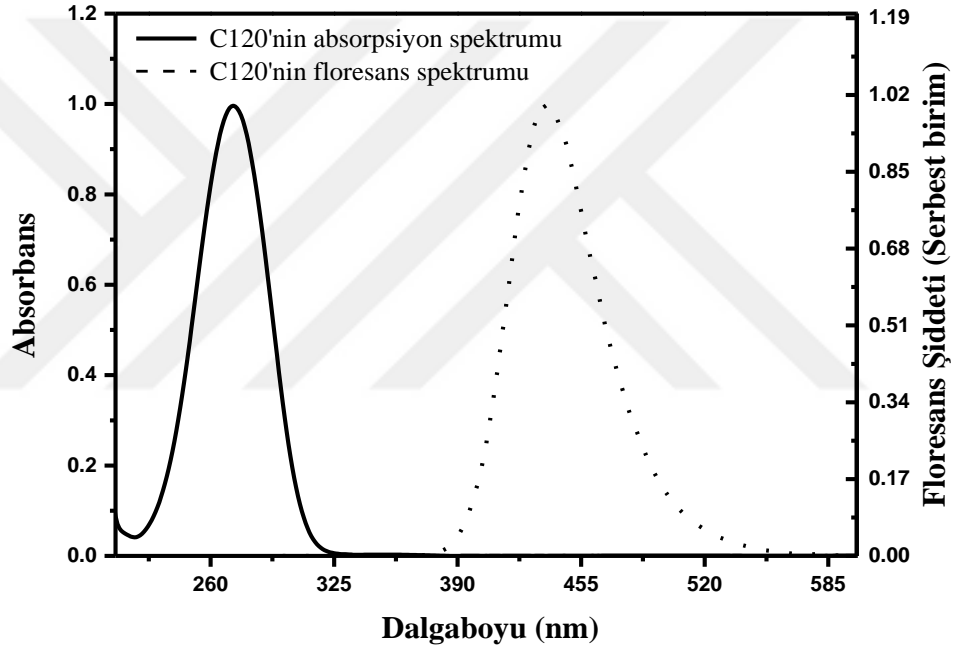
4.4. Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET): Kumarin 120 (C120) İle Sığır Serum Albümin (BSA) Arasındaki Mesafenin Belirlenmesi

Floresans rezonans enerji transferi (FRET), moleküller arası uzun menzilli dipol-dipol etkileşime bağlı olarak, bir uyarılmış molekül olan florofordan (donor) başka bir florofora (akseptör) uyarılma enerjisinin aktarıldığı moleküller arası mesafeye bağlı fiziksel bir olaydır (Sekai and Perisamy 2003).

İki molekül arasında gerçekleşen floresans enerji transferi;

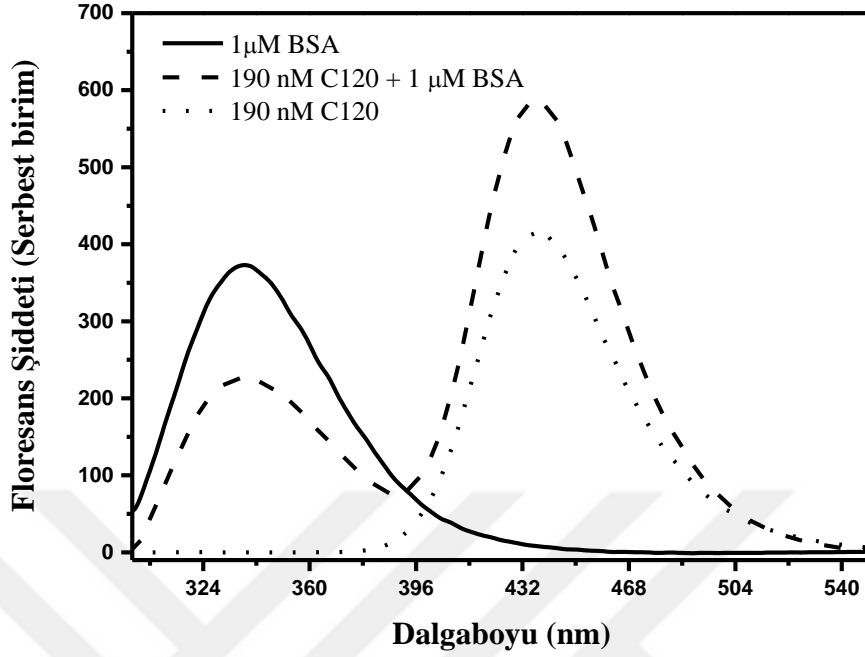
- Donör molekülün floresans spektrumu ile akseptör molekülün UV-Gör absorpsiyon spektrumundaki örtüşme alanlarının derecesine
- Donör ile akseptör arasındaki mesafeye
- Donör ile akseptörün geçiş dipollerinin yönelimine bağlıdır (Bayraktutan T. 2015).

Şekil 4.7’de tampon ortamında ve BSA yokluğunda C120’nin absorpsiyon ve floresans spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.7. C120’nin absorpsiyon ve floresans spektrumları (λ_{ex} :298 nm; pH 7,4; T:296 K)

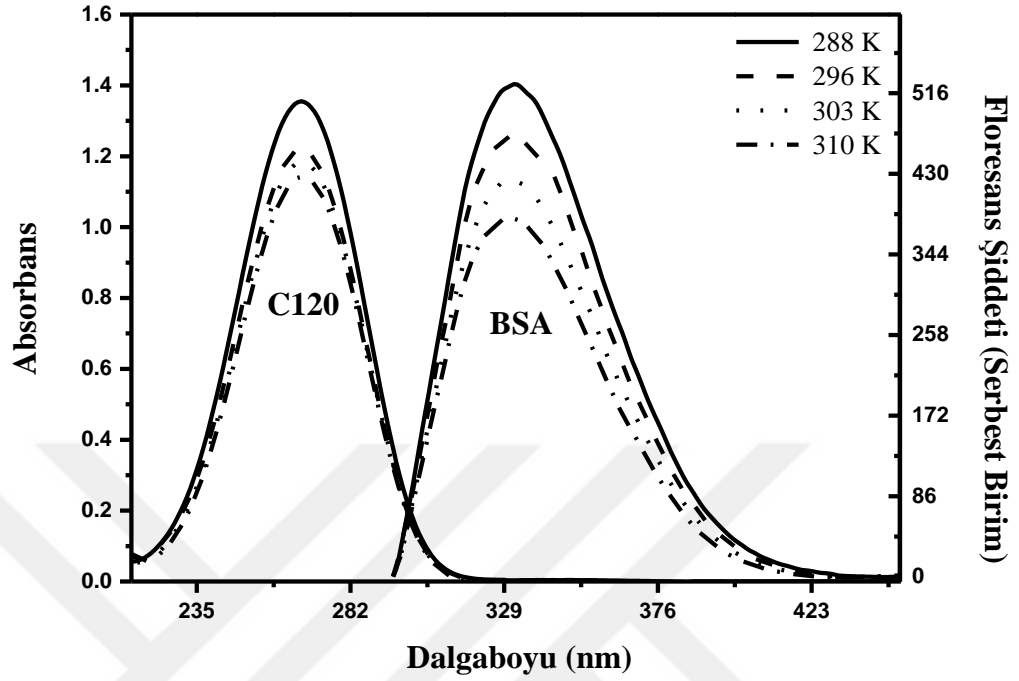
Şekil 4.8’de ise BSA varlığında ve yokluğunda alınan floresans spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.8. 190 nM C120 bileşiğinin BSA varlığında ve yokluğunda alınan floresans spektrumları (λ_{ex} :298 nm; pH 7,4; T:296 K)

Kumarin 120 bileşiğinin kuençleşmesi incelenirken Şekil 4.2.'de farklı konsantrasyonlarda C120 içeren (2 nM - 214 nM) ortamlardaki BSA bileşiğinin floresans spektrumları verilmiş ve bu spektrumlarda artan C120 konsantrasyonuyla BSA'nın floresans şiddetinde bir azalmanın olduğu ve bant maksimumunda maviye kaymaların olduğu gösterilmiştir.

Burada sığır serum albümin (BSA) ile C120 arasındaki mesafeyi belirlemek amacıyla FRET metodu kullanılmıştır. Bu amaçla BSA içeren örnekler 298 nm'de uyarılarak floresans spektrumu alınırken, C120 bileşiğinin de absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Donör molekülün floresans spektrumları ile akseptör molekülün absorpsiyon spektrumları arasındaki örtüşme alanı, enerji transferi etkinliği hakkında fikir vereceği için sıcaklıklara göre bu spektrumlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı sıcaklıklarda BSA'nın floresans spektrumları ile C120'nin absorpsiyon spektrumlarının örtüşme durumu

Bu çalışmada ortamın kırılma indisi $n=1,3361$ olarak belirlenmiştir. BSA'ya ait floresans kuantum verimi $\Phi=0,15$; dipolün yönelme faktörü $\kappa^2=2/3$ olarak alınmıştır (Ashoka *et al.* 2006).

BSA'nın floresans spektrumu ile C120'nin absorpsiyon spektrumlarının örtüşme alanı için örtüşme integrali belirlenerek (J), donör ile akseptör arasındaki mesafe (r), kritik mesafe (R_0) ve enerji transfer etkinliği (E) değerleri denklemler (3.6), (3.7) ve (3.8) kullanılarak farklı sıcaklıklar için hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. BSA-C120 sistemine ait farklı sıcaklıklarda hesaplanmış rezonans enerji transfer parametreleri

T (K)	ϵ (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹)	E	J (cm ³ L mol ⁻¹)	R ₀ (nm)	r (nm)
288	1,90 x10 ⁶	0,60	1,50 x10 ¹⁷	2,94	2,75
296	1,67 x10 ⁶	0,70	1,32 x10 ¹⁷	2,88	2,50
303	1,67 x10 ⁶	0,77	1,32 x10 ¹⁷	2,88	2,35
310	1,62 x10 ⁶	0,84	1,28 x10 ¹⁷	2,86	2,17

r için dört farklı sıcaklıkta hesaplanan değerlerin $r < 8$ şartını sağlaması her bir sıcaklıkta iki molekül arasında yüksek olasılıkla enerji transferinin gerçekleştiğini göstermektedir (Lakowicz 2006). Ayrıca

0,5 R₀ < r < 1,5 R₀ tanımına göre 288 K için 1,47 < 2,75 < 4,41

296 K için 1,44 < 2,50 < 4,32

303 K için 1,44 < 2,35 < 4,32

310 K için 1,43 < 2,17 < 4,29

aralıklarında olması BSA'dan C120'ye yüksek olasılıkla vuku bulan bir enerji transferinin olduğunu göstermiştir (Lakowicz 2006).

4.5. Senkronize Floresans Spektrumları ile Kumarin 120 (C120) ve Sığır Serum Albümin (BSA) Sistemindeki Konformasyonel Değişiklikleri Belirleme

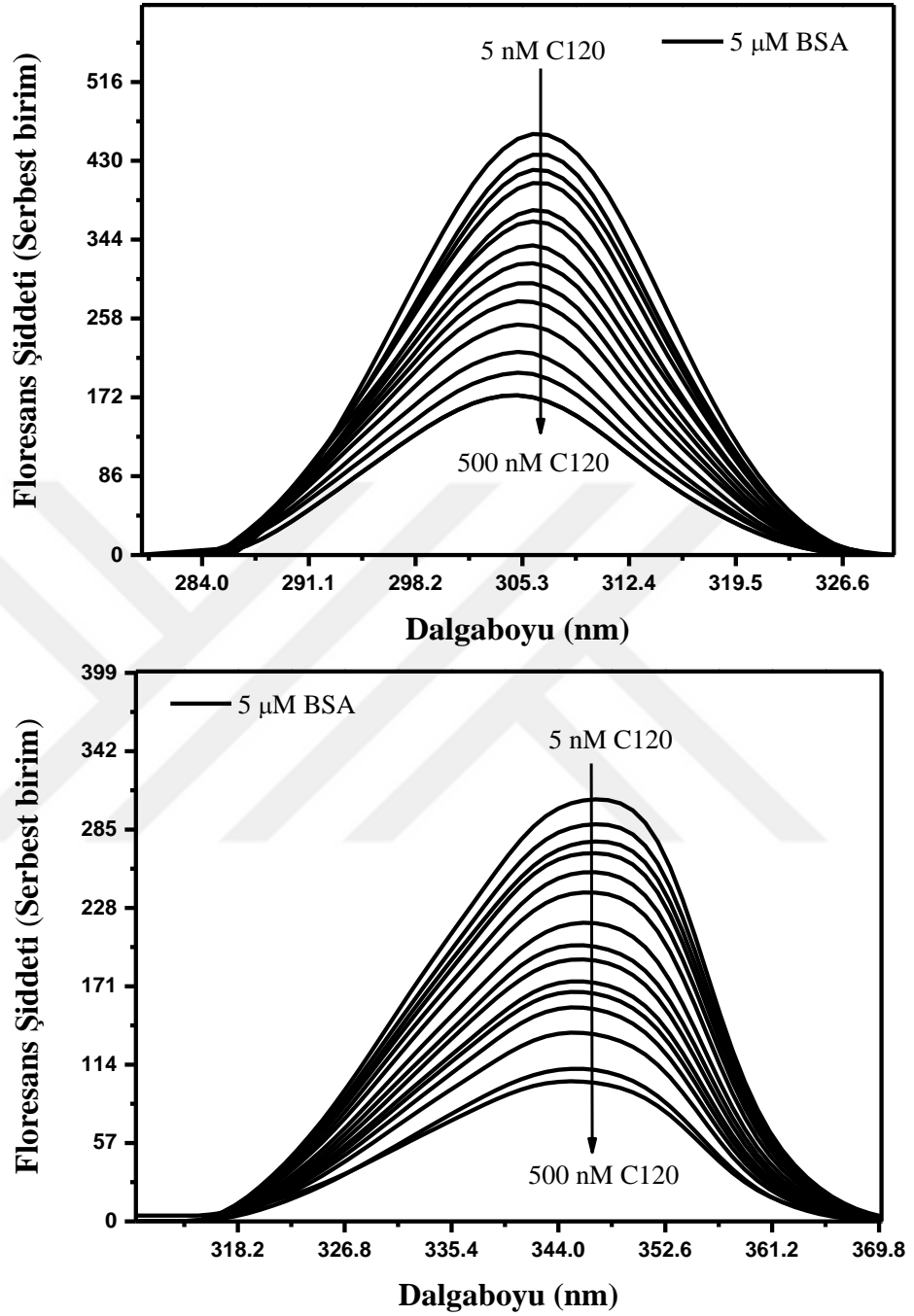
Floresansın ölçüldüğü dalga boyu sabit tutulup uyarma dalga boyunun taranmasıyla elde edilen spektruma uyarma spektrumu; uyarma dalga boyu sabit tutulup emisyon dalga boyunun tarandığı spektruma emisyon spektrumu denir (Skoog and West 1980). Senkronize floresans spektrumu ile klasik floresans spektrumu yöntemleri birbirleriyle

karşılaştırıldıklarında; klasik floresans spektrumu yönteminde numune tek bir uyarılma dalga boyunda uyarılır ve emisyon dalga boyu taranarak bir emisyon spektrumu oluşturulurken; senkronize floresans spektrumunda uyarılma dalga boyunu λ_{ex} ve emisyon dalga boyunu λ_{em} 'i eş zamanlı (senkronize) olarak değişimi söz konusudur. Senkronize floresans yönteminin başlıca 3 tipi vardır. Bunlar;

- 1- İki monokromotör arasındaki ($\lambda_{ex}-\lambda_{em}=\Delta\lambda$) dalga boyunun sabit tutularak taramanın bu şekilde sabit dalga boyu aralıklarıyla yapıldığı senkronize floresans spektrometrisi
- 2- İki monokromotör arasındaki fark dalga boyu yerine enerji cinsinden sabit tutularak ölçümün yapıldığı sabit enerji aralıklı olarak yapılan senkronize floresans spektroskopisi
- 3- Diğer iki yöntemden farklı olarak monokromotörler arasındaki ne enerji ne de dalga boyunun sabit olmadığı yaklaşım olan ve uyarılma ve emisyon dalga boyları eş zamanlı olarak birbirinden bağımsız olacak şekilde farklı hızlarda değiştirilebilen açı değişken senkronize taramadır.

Proteinlerde ligand bağlanmasıyla meydana gelen konformasyonel değişiklikleri belirlemede kullanılan senkronize floresans spektrumu çeşitlerinden sabit dalga boyu aralıklı senkronize floresans spektrometri yaklaşımını kullanarak $\Delta\lambda=15$ nm ve $\Delta\lambda=60$ nm'de taramalar yapılmıştır. Elde edilen spektrumlardaki kaymalara bakarak BSA'nın tirozin ve triptofan bölgelerindeki etkileşimleri açıklığa kavuşturulmuştur. Çünkü $\Delta\lambda=15$ nm olduğunda elde edilen senkronize floresans spektrumu tirozin bölgesindeki değişimleri yansıtırken, $\Delta\lambda=60$ nm de alınan spektrumlar BSA'nın triptofan bölgesindeki etkileşimleri yansıtmaktadır (Bayraktutan 2015). Bu nedenle $\Delta\lambda=15$ nm iken yapılan taramalarda BSA'nın tirozin bölgesine $\Delta\lambda=60$ nm olduğunda ise triptofan bölgelerine bağlanmaları göstermektedir.

Şekil 4.10'da farklı miktarlarda C120 ve 5 μ M BSA içeren çözeltilerin $\Delta\lambda=15$ nm ve $\Delta\lambda=60$ nm iken senkronize floresans spektrumları verilmiştir.



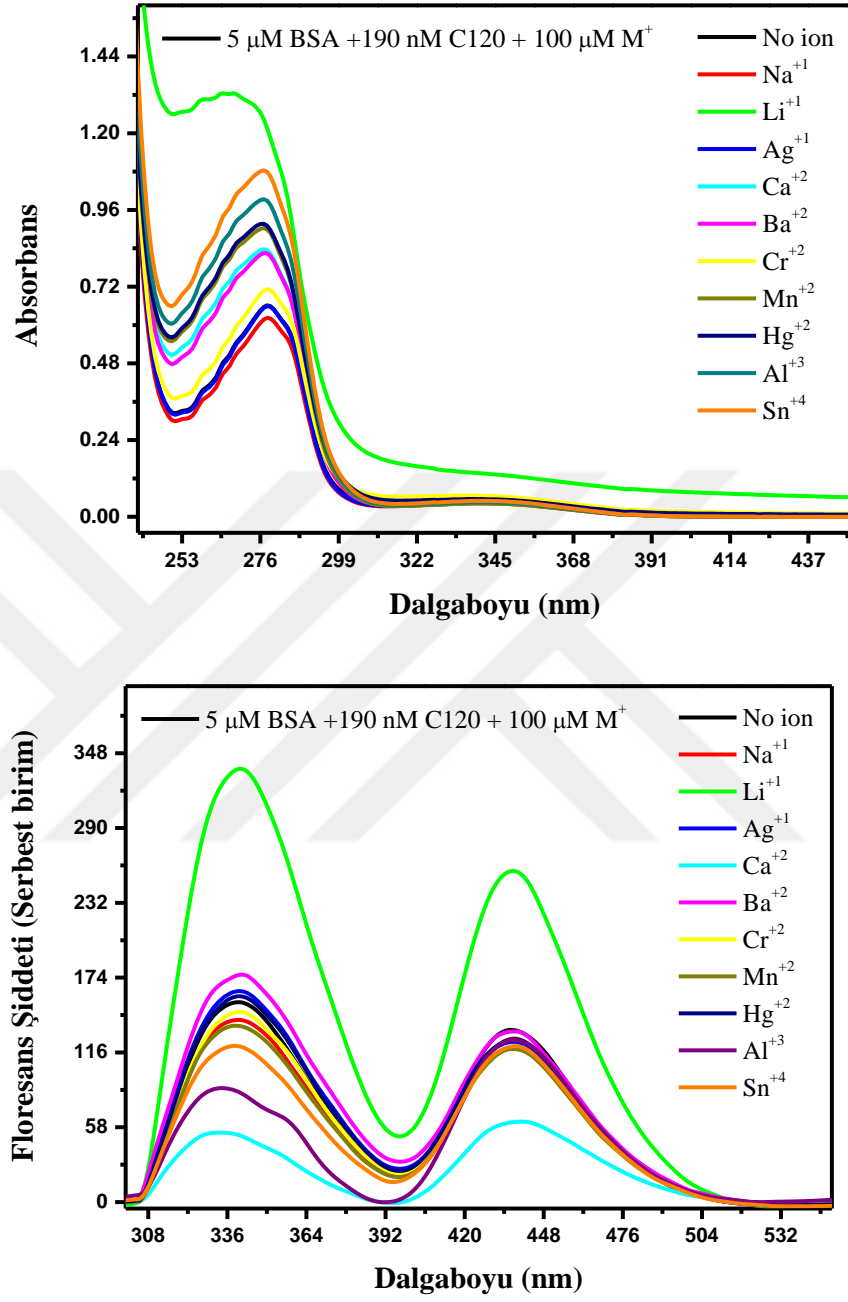
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda C120 içeren 5 μM BSA çözeltisinin a) tirozin ve b) triptofan bölgelerine ait senkronize floresans spektrumları

Senkronize floresans spektrumları karşılaştırıldığında C120'nin çözelti içerisindeki miktarının artışına bağlı olarak BSA'ya ait senkronize spektrumların şiddetinde azalmalar gözlemlenmiştir. $\Delta\lambda=15$ nm ve $\Delta\lambda=60$ nm için senkronize floresans

spektrumları incelendiğinde, $\Delta\lambda = 15$ nm şartlarında elde edilen spektrumlarda kısa olan dalga boyuna doğru kaymaların daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da BSA'nın tirozin içeren bölgelerinin triptofan bölgelerinden daha çok etkileşime maruz kaldığını göstermektedir. C120'nin BSA'nın triptofan bölgeleriyle olan etkileşimi tirozin bölgesine göre çok daha sınırlı olduğu spektrum kaymalarından anlaşılmaktadır. Aynı zamanda her iki mikro çevrede de gözlemlenen maviye kaymalar hidrofobikliğin de arttığının göstergesidir.

4.6. Kumarin 120 Bileşiği ve Sığır Serum Albümin (BSA) Sisteminin Metal İyonları ile Etkileşiminin İncelenmesi

Tez çalışmamızın daha önceki kısmında çift logaritmik denklem (denklem (3.3)) kullanılarak moleküller arası etkileşimleri açıklamak amacıyla moleküllerin bağlanma sabitleri ve bağlanma yeri sayıları hesaplanmıştır. Bu kısımda ise çift logaritmik denklem kullanılarak C120-BSA sistemine metal iyonlarının eklenmesiyle gerçekleşen değişimler spektroskopik veriler kullanılarak incelenmiştir. BSA-C120 sistemine metal iyonlarının etkisi incelenirken 5 μM BSA, 190 nM C120, 100 μM metal iyonu (Na^{+1} , Li^{+1} , Ag^{+1} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , Sn^{+4}) varlığında, bir tanesi metal iyon içermeyen olmak üzere 10 tanesi metal iyonu içeren 11 numunede absorpsiyon ve floresans spektrumu ölçümleri yapılmıştır. Absorpsiyon ölçümleri yapılırken tampon çözelti içerisinde hazırlanan çözeltilerin, 240 nm ve 440 nm arasındaki dalga boylarındaki spektrum bandları incelenirken, floresans spektrumları için yine tampon çözelti içerisinde hazırlanan örnekler 298 nm dalga boyunda uyarılarak, 300 nm ve 540 nm arasındaki dalga boyundaki floresans spektrumları incelenmiştir. Bu bilgiler eşliğinde her bir metal iyonu numunesi ve metal iyonu bulundurmeyen boş numune için ölçümü yapılan absorpsiyon ve floresans spektrumları Şekil 4.11'de verilmiştir.



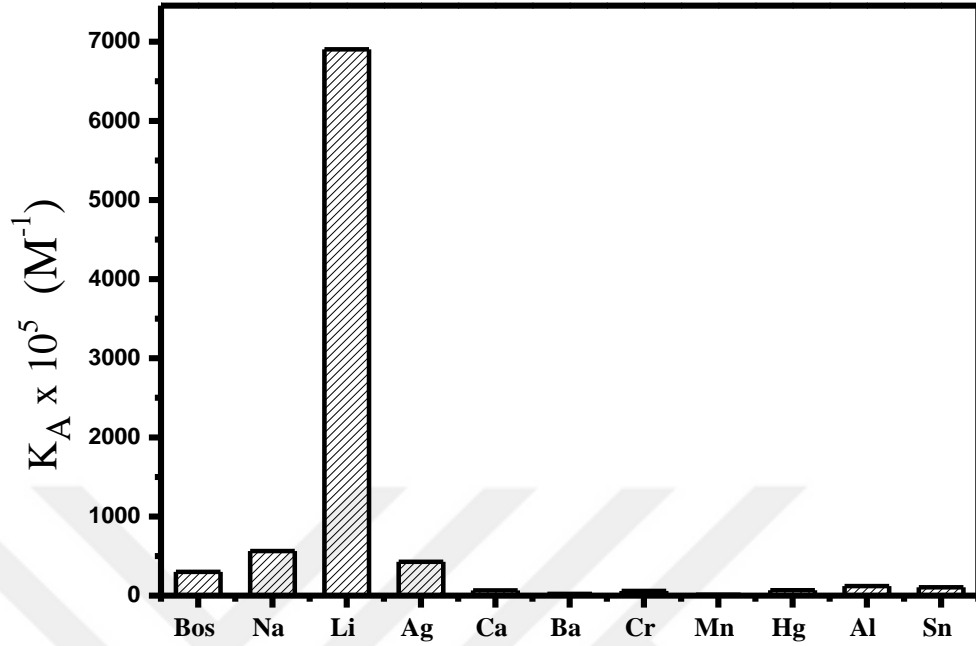
Şekil 4.11. BSA-C120- Metal iyonları absorpsiyon ve floresans spektrumları

Denklem (3.3)'ten yararlanılarak hesaplanan bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yerleri sayısı (n) aşağıdaki Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. BSA-C120 sistemine ait farklı metal iyonları için elde edilen bağlanma sabitleri (K_A) ve bağlanma yerleri sayısı (n). (pH 7,4; T:296 K)

Metal	Logaritmik denklem	R²	$K_A \times 10^5$ (M⁻¹)	n
Boş	$y=1,077x+1,479$	0,990	301,32	1,077
Na⁺¹	$y=0,813x+2,749$	0,962	562,34	0,813
Li⁺¹	$y=1,060x+3,996$	0,996	6904,39	1,060
Ag⁺¹	$y=0,603x+2,629$	0,964	426,57	0,603
Ca⁺²	$y=0,625x+1,820$	0,984	66,07	0,625
Ba⁺²	$y=0,415x+1,319$	0,993	20,89	0,415
Cr⁺²	$y=0,814x+1,779$	0,994	60,25	0,814
Mn⁺²	$y=0,933x+1,066$	0,999	11,64	0,933
Hg⁺²	$y=0,649x+1,825$	0,997	66,98	0,649
Al⁺³	$y=0,625x+2,079$	0,997	120,02	0,625
Sn⁺⁴	$y=0,952x+2,019$	0,991	104,71	0,952

Çizelge 4.6’da verilen metal iyonlarına göre BSA-C120 sistemi için K_A sabitlerinin nasıl değişim gösterdiği sütun grafik olarak Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Metal iyonlarının bağlanma sabitine olan etkisi

Burada metal iyonlarının bağlanma sabiti üzerine olan etkisi, metal iyonu içermeyen örneğin bağlanma sabiti ile karşılaştırıldığında; $Ca^{+2}, Ba^{+2}, Cr^{+2}, Mn^{+2}, Hg^{+2}, Al^{+3}, Sn^{+4}$ metal iyonları içeren örneklerde bağlanma sabiti değerleri düşerken, $Na^{+1}, Li^{+1}, Ag^{+1}$ metal iyonları ile etkileşim halinde olan sistemin bağlanma sabiti değerleri yükselmiştir. Bağlanma sabiti değerlerinin yüksek olması, BSA ile etkileşim sonucu oluşan komplekslerin ömrünün daha uzun olması ve etkin bir şekilde floresans özelliğinin bundan etkilenmesi, buna karşın bağlanma sabiti değerlerinin düşmesine sebep olan metal iyonlarını bulunduran BSA ile etkileşim için tam tersi durum söz konusudur (Tian *et al.* 2011). Bu çalışmada araştırılan metallere, etkinliğin artması ve kompleks ömrünün uzun olması nedeniyle özellikleri iyileştirilmiş problemlerin üretilmesinde $Na^{+1}, Li^{+1}, Ag^{+1}$ kullanılması uygun olabileceğini öngörebiliriz. Metal iyonlarının bağlanma sabitlerine etkisini gösteren Şekil 4.12'deki sütun grafiğinde ve Çizelge 4.6'da gösterilen deneysel verilerden yola çıkarak BSA-C120 sistemine ait bağlanma sabitlerinin metal iyonu varlığında değiştiği görülmektedir. Li^{+} içeren numune, referans olan boş numuneyle karşılaştırıldığında bağlanma sabiti değerinde yaklaşık 23 kat bir artışa neden olmakta ve en yüksek bağlanma sabitine sahip olmaktadır. Bunun tersine metal iyonu bulundurmeyen numunenin yaklaşık 0,04 katı olan Mn^{+2} en düşük

bağlanma sabiti değeri göstermektedir. Bu da BSA ve C120 moleküler etkileşimini negatif yönde etkileyen iyon olmaktadır.



5. SONUÇ

Bu çalışmada 7-amino kumarin ailesinin bir üyesi olan Kumarin 120'nin sığır serum albumin (BSA) ile olan moleküler etkileşimleri ve metal iyon sensör özelliği UV-Gör moleküler absorpsiyon ve durgun hal floresans spektroskopisi teknikleriyle incelenip floresans enerji transfer proseslerine uygunluğu tartışılmıştır.

İlk olarak BSA ve kumarin 120 bileşiklerinin fizyolojik pH değerindeki tampon çözeltide örnekleri hazırlanmıştır. Denemelerde BSA miktarının 5 μM 'da sabit tutulmasına karşılık C120'nin konsantrasyonunun 2 nM'dan 214 nM'a kadar farklı konsantrasyonlarda değiştirilip absorpsiyon ve floresans spektrum ölçümleri yapılmıştır. Absorpsiyon spektrumları için dalga boyu aralığı 240 nm ile 440 nm arası seçilmiştir. Bu aralıkta absorpsiyon spektrumunun maksimumunun 278 nm'de olduğu gözlemlenmiştir. Yine 5 μM olarak alınan BSA ve 2 nM'dan 214 nM'a kadar farklı konsantrasyonlarda C120 ilavesi ile oluşturulan sistemin 298 nm dalga boyunda uyarılarak incelenen floresans spektrumlarında yaklaşık 438 nm'de kuvvetli bir emisyon bandı gözlemlenmiştir. Özetle BSA ortamına C120'nin ilavesiyle meydana gelen değişimlere değinmek gerekirse; C120 ilavesiyle absorpsiyon maksimumlarında artmalar meydana gelirken, BSA'nın floresans spektrumlarında C120 konsantrasyon artışına bağlı olarak kuençleşmenin şiddetinde artışa eşlik eden hafif maviye kaymaların olduğu gözlemlenmiştir. BSA floresans şiddetindeki azalmaya eşlik eden band maksimumlarındaki maviye kaymalar C120 ilavesine bağlı olarak BSA'nın tirozin bölgelerindeki mikro çevrenin değişmesi neticesinde daha fazla hidrofobik bir hal aldığı ve C120 ilavesinin protein yapısında konformasyonel değişimlere sebep olduğunu göstermiştir.

Stern-Volmer eşitliği ve Stern-Volmer eşitliğinin modifiye hali olan Lineweaver-Burk eşitliği kuençleşmenin çeşidi belirlenmiştir. Stern- Volmer eşitliği kullanılarak kuençleşme sabitleri sırasıyla 288 K; 296 K; 303 K; 310 K için 9,190; 11,822; 17,578; 26,580 M^{-1} olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artışıyla birlikte kuençleşme sabitlerinde artmaların olduğu görülmüştür. Kuençleşme sabitlerinde sıcaklığa bağlı olarak meydana

gelen artışa bakarak dinamik kuençleşme mekanizmasının hâkim olduğu gözlemlenmiştir. Lineweaver-Burk denklemi ile statik kuençleşme sabitleri aynı sıcaklıklarda sırasıyla 5,716; 15,921; 23,216; 27,008 M⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu da BSA-C120 ikili sisteminin dinamik kuençleşme üzerinden etkileşim gösterdiğini teyit etmektedir. C120 ve BSA arasındaki bağlanma dengelerini incelemek amacıyla çift logaritmik denklem kullanılmış ve 288 K; 296 K; 303 K; 310 K sıcaklıkları için bağlanma sabitleri sırasıyla 3,39; 7,15; 15,58; 114,24 M⁻¹ ve bağlanma yeri sayıları sırasıyla 0,93471; 0,95634; 1,02001; 1,06515 olarak hesaplanmıştır. Bağlanma sabitlerinin sıcaklık artışıyla beraber artmasından yola çıkılarak kompleks oluşumunun sıcaklığın artmasıyla güçlendiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bağlanma yeri sayısının yaklaşık bir olması florofor ile BSA'nın etkileşiminin bir bölge odaklı olduğunu göstermektedir.

C120-BSA arasındaki termodinamik veriler incelendiğinde serbest Gibbs enerji değişimi ΔG değeri negatif değer olarak bu etkileşimin kendiliğinden gerçekleşebileceğini gösterirken; hesaplanan entropi değişimi ΔS ve entalpi değişimi ΔH 'ın pozitif değer alması, C120-BSA sisteminde hidrofobik etkileşimlerin baskın olduğunu göstermiştir.

FRET metodu ile BSA-C120 ikili sistemi arasındaki moleküler mesafe 288 K; 296 K; 303 K; 310 K sıcaklıklarının her biri için sırasıyla 2,75; 2,50; 2,35; 2,17 olarak belirlenmiştir. r değerlerinin 8'den küçük olması ve $0,5R_0 < r < 1,5R_0$ aralığında olması nedeniyle BSA'dan C120'ye yüksek olasılıkta enerji transferinin vuku bulunduğunu göstermiştir. Aynı zamanda sistemin senkronize floresans spektrumları alınmış ve C120 ilavesiyle BSA'ya ait floresans şiddetlerinde azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Ancak $\Delta\lambda=15$ nm ve $\Delta\lambda=60$ nm'de kaydedilen spektrumlarda maviye kaymaların olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda BSA molekülüne tirozin ve triptofan bölgelerinden yaklaşımların olduğu söylenebilir. Ancak maviye kaymalara bakarak tirozin bölgelerinin daha çok etkileşime maruz kaldığını ve tirozin ve triptofan bölgelerinin mikro çevrelerindeki polaritelerin farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Logaritmik denklem yardımıyla C120 ve BSA sistemine 10 farklı metal iyonu etkisi incelenmiş ve sistemin metal iyonlarına tepkisi tartışılmıştır. Çalışılan bu iyonların bağlanma sabitleri metal iyonu içermeyen numunenin bağlanma sabiti ile karşılaştırıldığında, Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , Sn^{+4} metal iyonları ile etkileşimde olan sistemin bağlanma sabiti değerlerinin düştüğü gözlemlenirken; Na^{+1} , Li^{+1} Ag^{+1} metal iyonları ile etkileşim halinde olan sistemin bağlanma sabiti değerlerinde artış görülmüştür. En fazla bağlanma sabitindeki artış Li^{+1} 'de gözlemlenirken, en düşük bağlanma sabiti Mn^{+2} 'de gözlemlenmiştir. Bu durum ileriki çalışmalar için Li^{+1} metali üzerinden sensör çalışmaları yapılabilmesi ve bu durumun gerekçelerini açıklayabilmeyi öngörmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Acar, M., Bozkurt, E., Meral, K., Arık, M., Onganer, Y., 2015. The Fluorescence Quenching Mechanism Of Coumarin 120 with CdS Nanoparticles in Aqueous Suspension, *Journal Of Luminescence* 157, 10-15.
- Acar, S., 2006. Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Akkılıç, N., 2006. Bovine Serum Albumun İle Poliakrilik Asidin Suda Çözünen Komplekslerinin Ve Kovalent Konjugatlarının HPLC Yönemiyle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ashoka, S., Seetharamappa, J., Kandagal, P.B., Shaikh, S.M.T., 2006. Investigation of The Interaction Between Trazodone Hydrochloride and Bovine Serum Albumin. *Journal of Luminescence* 121, 179–186.
- Bayraktutan, T., Onganer, Y., 2017. Biophysical Influence of Coumarin 35 on Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 171, 90-96.
- Bayraktutan, T., 2015. Kumarin 35 Bileşiğinin DNA ve Sığır Serum Albumin İle Etkileşiminin Spektroskopik Tekniklerle İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Bloomfield, V., 1966, The Structure of Bovine Serum albumin at Low pH, *Biochemistry* 5, 684-689.
- Cave, R., Burke, K., Castner, E., 2002. Theoretical Investigation of The Ground and Excited States of Coumarine 151 and Coumarine 120. *The Journal of Chemistry A* 106, 9294-9305
- Fan, G.j., Mar, W., Park, M. K., Choi, E. W., Kim, K. and Kim, S. 2001. A Novel Class of Inhibitors for Steroid 5 α -Reductase: Synthesis and Evaluation of Umbelliferone Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 2361-2363.
- Furetta, C., Weng, P.S., 1998. Operational Thermoluminescence Dosimetry, World Scientific, 1, Singapore.
- Gu, X., Chen, Q., Fang, Z., 2017. A Novel Fluorescent Probe Based on β -C-Glycoside for Quantification of Bovine Serum Albumin. *Dyes and Pigments* 139, 339-343.
- Hoult, J. R. S. and Paya, M. 1996. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology*, 27(4); 713-722.
- Hughes, W. L. 1954. In *The Proteins* (H. Neurath and K. Biley, eds.), Vol. 2b, 663- 755. Academic Press, New York.
- Inoue, Y., Kondo, H., Taguchi, M., Jinbo, Y., Sakamoto, F. and Tsukamoto, G. 1994. Synthesis and Antibacterial Activity of Thiazolopyrazine-in Corporated Tetracyclic Quinolone Antibacteria. *J. Med. Chem*, 37; 586-592
- Ivezic, Z. and Trkovnik, M. 2003. *PCT Int. Appl.*, 41.
- Kayser, O. and Kolodziej, H. 1997. Antibacterial Activity of Extracts and Constituents of *Pelargonium Sidoides* and *Pelargonium Reniforme*. *Planta Medica*, 63(6); 508-510.

- Kempen, I., Papapostolou, D., Thierry, N., Pochet, L., Counerotte, S., Masereel, B., Foidart, J.-M., Reboud-Ravaux, M., Noel, A. and Pirote, B. 2003. 3-Bromophenyl 6-acetoxymethyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate Inhibits Cancer Cell Invasion In Vitro and Tumour Growth In Vivo. *British Journal of Cancer*, 88; 1111 - 1118.
- Khan, M. S. Y. and Sharma, P. 1993. Synthesis of New α -pyronoflavones and Related Products. Part II. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 32B(8); 817-821.
- Koçak, G., 2011. Kumarin Halkası İçeren Metakrilat Monomerlerinin Sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
- Kontogiorgis, C. and Hadjipavlou-Litina, D. 2003. Biological Evaluation of Several Coumarin Derivatives Designed as Possible Anti-Inflammatory/Antioxidant Agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18 (1); 63-69.
- Lakowicz, J.R., 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, 258, New York, USA.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Press, 950 P, USA.
- Liu, E., Qi L. And Li P. 2010. Structural Relationship and Binding Mechanisms of Five Flavonoids with Bovine Serum Albumin. *Molecules*, 15, 9092-9103.
- Madhavan, G. R., Balraju, V., Malleshm, B., Chakrabarti, R. and Lohray, V. B. 2003. Novel Coumarin Derivatives of Heterocyclic Compounds as Lipid-Lowering Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 , 2547-2551.
- Meer, V.D., Coker, B.W., Chen, Y.S. 1994. *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*. VCH, 98, Newyork.
- Munkholm, C., Parkinson, D.R., Walt, D.R., 1990. Intramolecular Fluorescence Self-Quenching Of Fluoresceinamine. *Journal Of The American Chemical Society* 112 (7), 2608–2612.
- Murray, R. D. H., Mendez, J., Brown, S.A. 1982. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons , New York.
- O’Kenedy, R. and Thornes, R. D. (1997). *Coumarins biology, Applications and Mode of Action*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- O’Reilly, R., Kowitz, P., 1967. Studies On The Coumarin Anticoagulant Drugs: Interaction Of Human Plasma Albumin And Warfarin Sodium. *Journal Of Clinical Investigation* 46(5), 829-837.
- Özçeşmeci, İ., 2010. Tetrakis(Hidroksietiltia)ftalosiyanın’den Yeni Bileşiklerin Sentezi ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pal, H., Nad S., Kumbhakar, M., 2003. Photophysical Properties Of Coumarin-120: Unusual Behavior In Nonpolar Solvents. *Journal Of Chemical Physics* 119, 443.
- Patra, S. Santhosh, K., Pabbathi, A. and Samanta, A. 2012. Diffusion of Organic Dyes in Bovine Serum Albumin Solution Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Royal Society of Chemistry*, 2, 6079-6086 .
- Qin, M., Yin, T., Shen, W., 2016. The Interaction Between Crystal Violet and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations. *Journal of Dispersion Science and Technology* 37, 1623-1629

- Qin, Y., Zhang, Y., Yan, S., Ye, L., 2010. A Comparison Study on The Interaction of Hyperoside and Bovine Serum Albumin with Tachiya Model and Stern–Volmer Equation *Spectrochimica Acta Part A* 75, 1506-1510.
- Reddy, N. S., Mallireddigari, M. R., Cosenza, S., Gumireddy, K., Bell, S. C., Reddy, P. and Reddy, M. V. 2004. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(14);4093-4097.
- Retting, W., Klock, A., 1985. Intramolecular Fluorescence Quenching In Aminocoumarines Identification of An Excited State with Full Separation. *Canadian Journal of Chemistry* 63, 1649.
- Sabnis, R.W., 2015. *Handbook Of Fluorescent Dyes And Probes*. Wiley, 54, New Jersey, USA.
- Samari, F., Hemmateenejad, B., Shamsipur M., Rouhani S., Esfandiyari, Fatemeh., 2016. Characterization of The Interaction Between A New Merocyanine Dye and Bovine Serum Albumin. *Iranian Chemical Society* 13, 2309-2317.
- Sekar, R.B and Periasamy, A. 2003. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localization. *Journal of Cell Biology*, 160(5):629-33.
- Sener, B. and Mutlugil, A. 1987. Naturally Occurring Coumarins and Their Biological Activities. *Farmasotik Bilimler Dergisi*, 12(2); 99-114.
- Sethna, S. M. and Shah, N. M. 1945. The Chemistry of Coumarins. *Chemical Reviews*, 1-36; 1-62.
- Singer, L. A. and Kong, N. P. 1966. Vinyl Radicals. Stereoselectivity in Hydrogen Atom Transfer to Equilibrated Isomeric Vinyl Radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, 88; 5213- 5219.
- Skoog, D.A., West, D.M., 1980. *Principles of Instrumental Analysis*. Ront Linehard and Winston 279-294, Philadelphia.
- Soine, T. O. 1964. Naturally Occurring Coumarins and Related Physiological Activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(3); 231-264.
- Spino, C., Dodier, M. and Sotheeswaranaude, S. 1998. Anti-Hiv Coumarins from Calophyllum Seed Oil. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8; 3475-3478
- Squire, P.G., Moser, P., O’Konski, C. T. 1968. The Hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin Monomer and Dimer. *Biochemistry*, 7; 4261-4272.
- Sun, C.J., Yang, J., Wu, X., Huang, X., Wang, F., Liu, S., 2005. Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin Induced By Cetylpyridinium Bromide. *Biophysical Journal* 88, 3518–3524.
- Şen, S., 2018. Işığın Renkli Dansı: Lüminesans Ve Tekstil Uygulamalarına Bir Bakış. *MYD Teknik Bülten*. 7(2); 8-11.
- Takadate, A., Masuda, T., Murata, C., Tanaka, T., Irikura, M. and Goya, S. 1997. Fluorescence Characteristics as Novel Fluorophores of Methoxycoumarins. *Anal. Sci.*, 11; 97.
- Tian, J., Xie, Y., Zhao, Y., Li, C., Zhao, S., 2011. Spectroscopy Characterization of The Interaction Between Brevifolin Carboxylic Acid and Bovine Serum Albumin. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence* 26, 296–304.
- Tian, J., Zhao, Y., Liu, X., Zhao, S., 2010. A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence, Circular Dichroism Study on The Binding of Myricetin To Bovine Serum Albumin. *Luminescence* 24, 386–393.

- Wang, C. J., Hsieh, Y. J., Chu, C. Y., Lin, Y. L. and Tseng, T. H. 2002. Inhibition of Cell Cycle Progression in Human Leukemia HL-60 Cells by Esculetin. *Cancer Letters*,183; 163-168.
- Wolfbeis, O. S., Fuerlinger, E., Kroneis, H. and Marsoner, H. 1983. Fluorimetric Analysis. 1. A Study on Fluorescent Indicators for Measuring Near Neutral (physiological) pH Values. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, 314(2); 119-124.
- Wright, A. K., and Thompson, M. R., (1975), Hydrodynamic Structure of Bovine Serum Albumin Determined by Transient Electric Birefringence, *Biophys. J.* 15; 137-141.
- Valeur, B., 2001. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. 4, Willey-Vch Verlag GmbH, Weinheim.
- Yanar, U., 2014. Yeni Floresans Kumarin-Tiyofen Hibrit Moleküllerin Sentezi Ve Çeşitli Anyonlara Karşı Duyarlılığının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum'un Aşkale ilçesinde doğdu. Liseyi Erzurum Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi'nde bitirdi. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2015 yılında mezun oldu ve Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Fizikokimya Bilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

