



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KLİNİKTE KULLANIMI KANITLANMIŞ
BİYOBELİRTEÇLER İÇİN PEPTİT-BAZLI
ELEKTROKİMYASAL VE OPTİK TEST
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

Doktora Tezi

Simge BALABAN HANOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KLİNİKTE KULLANIMI KANITLANMIŞ
BİYOBELİRTEÇLER İÇİN PEPTİT-BAZLI
ELEKTROKİMYASAL VE OPTİK TEST
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

Simge BALABAN HANOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

İzmir
2024



Simge BALABAN HANOĞLU tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Klinikte Kullanımı Kanıtlanmış Biyobelirteçler için Peptit-Bazlı Elektrokimyasal ve Optik Test Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **30.09.2024** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye:

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Klinikte Kullanımı Kanıtlanmış Biyobelirteçler için Peptit-Bazlı Elektrokimyasal ve Optik Test Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30/09 / 2024

İmzası

Simge BALABAN HANOĞLU



ÖZET

Klinikte Kullanımı Kanıtlanmış Biyobelirteçler için Peptit-Bazlı Elektrokimyasal ve Optik Test Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları

BALABAN HANOĞLU, Simge

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Eylül 2024, 141 sayfa

Günümüzün en önemli hastalıklardan biri olan kolorektal kanserin erken teşhisi oldukça önemlidir. Bu açıdan kolorektal kanser için klinik kullanımı kanıtlanmış olan belirteçlerinin analizini sağlayabilecek hızlı test sistemlerine ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda, ilgili tez çalışmasında kolorektal kanser dedeksiyonu için peptit temelli elektrokimyasal ve optik test sistemlerinin tasarlanması hedeflenmiştir. Septin 9 metillenmiş DNA yapıları, miRNA 221 ve 222 hedef biyobelirteç olarak belirlenmiş olup, diğer biyoreseptörler ile kıyaslandığında avantajlı özelliklere sahip peptit nükleik asitler (PNA) kullanılarak, üç farklı elektrokimyasal ve bir optik biyosensör test sistemi tasarlanmıştır. PNA-DNA ve PNA-RNA hibridizasyon temelli optik ve elektrokimyasal biyosensörler için karakterizasyon çalışmalarına ek olarak, sistemlerin analitik parametreleri belirlenerek literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanmıştır. Tasarlanan biyosensörlerin spesifikliği belirlenmiş ve temin edilen gerçek plazma örnekleri ile sistemlerin başarılı şekilde hasta örneklerinde çalışabilirliği kanıtlanmıştır. Ek olarak, geliştirilmiş biyosensörlerin hastabaşı tanı (point of care, PoC) sistemi olarak kullanımının sağlanabilmesi için elektrokimyasal ölçümleri yapabilen ve akıllı telefonlar ile entegrasyonu sağlanabilen bir potansiyotat geliştirilmiştir. Benzer şekilde optik biyosensörün tasarımında da akıllı telefonla entegrasyon sağlanarak, pratik, portatif, hedefe spesifik, yenilikçi sistemlerinin geliştirilmesi sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kanser, kolon kanseri, peptitler, biyosensör, elektrokimyasal biyosensör, optik biyosensör

ABSTRACT**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF PEPTIDE-BASED
ELECTROCHEMICAL AND OPTICAL ASSAY SYSTEMS FOR
CLINICALLY PROVEN BIOMARKERS.**

BALABAN HANOĞLU, Simge

PhD in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Suna TIMUR

September 2024, 141 pages

Early diagnosis of colorectal cancer, one of the most important diseases of today, is very important. In this respect, the need for rapid test systems that can provide analysis of clinically proven biomarkers for colorectal cancer is increasing day by day. In the thesis study, it is aimed to design peptide-based electrochemical and optical test systems for colorectal cancer detection. Septin 9 methylated DNA structures, miRNA 221 and 222 were determined as target biomarkers, and three different electrochemical and an optical biosensor systems were designed using peptide nucleic acids (PNA) that have advantageous properties compared to other bioreceptors. In addition to the characterization studies for optical and electrochemical biosensors based on PNA-DNA and PNA-RNA hybridization, the analytical parameters of the systems were determined and compared with similar studies in the literature. The specificity of the designed biosensors was determined and the systems were proven to work successfully in patient samples with the provided real plasma samples. In addition, a potentiostat that can perform electrochemical measurements and integrate with smartphones has been developed to enable the use of the developed biosensors as a point of care (PoC) system. Similarly, integration with smartphones has been provided in the design of the optical biosensor, enabling the development of practical, portable, target-specific, innovative systems.

Keywords: Cancer, colorectal cancer, peptides, biosensors, electrochemical biosensor, optical biosensor



ÖNSÖZ

Tüm dünyada her cinsiyet ve yaşta yaygın görülebilen ve erken tanının çok önemli olduğu bilinen klinik hastalıkların en önemlilerinden biri kanserdir. Bu beni kanser konusunda yoğunlaştırdı. Bu sayede fark ettim ki kolon kanseri kanser türleri içinde en yaygın görülen üçüncüydü. Diğer kanserlerde olduğu gibi kolon kanserinde de temel ihtiyaç hızlı ve etkili tanıya yönelik basit, uygun fiyatlı, kolay kullanılabilen, çabuk sonuç veren sistemlerdi. Bu nedenle farklı biyosensör platformları geliştirme düşüncesini benimsediğim bu tez çalışması ortaya çıktı. Son yıllarda kanser belirteçleri arasında öne çıkan metillenmiş DNA ve mikro RNA yapıları üzerine yoğunlaşarak, yaptığım literatür taramaları sonucunda hedef belirteç olarak Septin 9 metillenmiş DNA yapıları ve miRNA 221/222 belirteçlerini belirledim. Tez çalışmamda özgünlük açısından ve yeni şeyler öğrenme isteğim ile biyoreseptör olarak peptitler ile çalışmayı seçtim. Tez kapsamında kolon kanseri dedeksiyonu için kullanılabilecek iki elektrokimyasal, bir optik temelli olmak üzere toplam 4 farklı peptit-temelli biyosensör sistemi geliştirdim. Tez çalışmam boyunca sonuç odaklı, problem çözmeye dayalı hareket etmenin önemini anladığım bir süreç geçirdim.

İZMİR

30/09/2024

Simge BALABAN HANOĞLU



İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
ÖNSÖZ	xiii
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kanser Biyobelirteçleri ve Çeşitleri	2
1.2.1. Germ hattı genetik varyantları.....	4
1.2.2. Somatik genetik mutasyonlar	5
1.2.3. Epigenetik varyantlar ve transkripsiyonel değişiklikler	6
1.2.4. Proteomik değişiklikler	8
1.2.5. Hücre fenotipi.....	9
1.3. Kolon kanseri	9
1.4. Septin 9 (SEPT9).....	14
1.5. miRNA-221 ve 222	15
1.6. Peptitler	15
1.6.1. Kimyasal yöntemlerle veya rekombinant DNA teknolojileriyle sentez.....	16
1.6.2. Faj gösterim.....	17
1.6.3. Peptit nükleik asitleri (PNA'lar)	19
1.7. Biyosensörler	20
1.7.1. Elektrokimyasal biyosensörler	21
1.7.2. Optik biyosensörler	23
1.7.3. Biyosensör sistemlerinin modifikasyonu	25
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27

2.1.	Materyaller	27
2.2.	Kullanılan Cihazlar	27
2.3.	Hasta Örneklerin Toplanması ve Etik Kurul	29
2.4.	Bölüm-1: “Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	29
2.4.1.	Metot.....	29
2.4.2.	Ferrosen işaretli PNA (Fc-PNA) problemlerinin ve mSEPT9 fragmentlerinin tasarımı.....	30
2.4.3.	İzotermal titrasyon kalorimetresi	31
2.4.4.	MNP sentezi	32
2.4.5.	MNP'lerin fonksiyonelleştirilmesi	32
2.4.6.	5-mC Ab ile MNP'lerin konjugasyonu.....	33
2.4.7.	Elektrokimyasal biyosensör platformunun dizaynı	34
2.4.8.	Biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonu	35
2.4.9.	Biyosensör sisteminin analitik özellikleri	35
2.4.10.	Optimizasyon çalışmaları	36
2.4.11.	Girişimci Denemeleri	36
2.4.12.	Örnek uygulama çalışmaları	37
2.4.13.	PoC sistemine biyosensörün entegrasyonu	38
2.4.14.	Doğrulama Çalışmaları.....	38
2.5.	Bölüm-2: “Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik PNA Temelli Optik Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	40
2.5.1.	Metot.....	40
2.5.2.	PNA problemlerinin ve mSEPT9 fragmentlerinin tasarımı	40
2.5.3.	AuNP sentezi.....	41
2.5.4.	AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatı.....	41
2.5.5.	Spot Test Sisteminin Tasarımı	42
2.5.6.	Optimizasyon çalışmaları	44
2.5.7.	Girişimci Denemeleri	44
2.5.8.	Örnek uygulama çalışmaları	44
2.5.9.	Renk analizi	44
2.5.10.	Fotoğraf çekimi için kutu tasarımı	45
2.5.11.	Doğrulama çalışmaları.....	46

2.6. Bölüm-3: “miRNA-221 ve 222’nin Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	47
2.6.1. Metot	47
2.6.2. miRNA-221/222 dizilerinin ve PNA problemlerinin tasarımı	47
2.6.3. MB/ PNA konjugasyonu	48
2.6.4. MB/PNA/miRNA konjugasyonu	48
2.6.5. Elektrokimyasal biyosensör sisteminin tasarımı	49
2.6.6. Biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonu.....	49
2.6.7. Biyosensör sisteminin analitik özellikleri	50
2.6.8. Optimizasyon çalışmaları.....	50
2.6.9. Girişimci Denemeleri.....	51
2.6.10. Örnek uygulama çalışmaları	51
2.6.11. Doğrulama çalışmaları	52
3. BULGULAR	55
3.1. Bölüm-1: “Metillenmiş DNA’ların Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	55
3.1.1. ITC sonuçları	55
3.1.2. MNP karakterizasyonu	61
3.1.3. Sensör platformunun yüzey karakterizasyon sonuçları	63
3.1.4. Sensör platformunun analitik özellikleri.....	65
3.1.5. Optimizasyon sonuçları.....	66
3.1.6. Girişimci denemeleri	68
3.1.7. Örnek uygulama sonuçları.....	69
3.1.8. Akıllı telefon uygulamasına biyosensörün entegrasyonu.....	71
3.1.9. Doğrulama çalışmaları	78
3.2. Bölüm-2: “Metillenmiş DNA’ların Analizine Yönelik PNA Temelli Optik Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	80
3.2.1. AuNP karakterizasyonu.....	80
3.2.2. Optimizasyon çalışmaları.....	81
3.2.3. Sensör platformunun analitik özellikleri.....	84
3.2.4. Girişimci denemeleri	86
3.2.5. Örnek uygulama sonuçları.....	87
3.2.6. Doğrulama çalışmaları	88

3.3. Bölüm-3: “miRNA-221 ve 222’nin Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”	90
3.3.1. MB karakterizasyonu	90
3.3.2. Sensör platformunun yüzey karakterizasyon sonuçları	92
3.3.3. Sensör platformunun analitik özellikleri	93
3.3.4. Optimizasyon sonuçları	95
3.3.5. Girişimci denemeleri	97
3.3.6. Örnek uygulama sonuçları	98
3.3.7. Doğrulama sonuçları.....	100
4. TARTIŞMA	102
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	111
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	113
TEŞEKKÜR.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	137

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1. 2022 GLOBOCAN verilerine göre Dünya genelinde kanser çeşitlerinin dağılımı.	1
Şekil 1. 2. 2022 GLOBOCAN verilerine göre Dünya genelinde kanser nedeniyle ölüm oranının kanser çeşitlerine göre dağılımı.	2
Şekil 1. 3. Evre 0 ve 1 kolon kanserinin şematize gösterimi (<i>Colon Cancer Treatment—NCI,2024</i>).	10
Şekil 1. 4. Evre 2 kolon kanserinin şematize gösterimi (<i>Colon Cancer Treatment—NCI,2024</i>).	10
Şekil 1. 5. Evre 3 kolon kanserinin şematik gösterimi (<i>Colon Cancer Treatment—NCI,2024</i>).	11
Şekil 1. 6. Evre 4 kolon kanseri şematize gösterimi (<i>Colon Cancer Treatment—NCI,2024</i>).	12
Şekil 1. 7. Peptitlerin rekombinant üretimi için kullanılabilecek farklı konakçı hücreler (Deo et al., 2022).	17
Şekil 1. 8. Faz görüntüleme yönteminin şematik gösterimi (Tian et al., 2022).	18
Şekil 1. 9. PNA ve DNA yapıları.	20
Şekil 1. 10. Biyosensörlerin özellikleri.....	20
Şekil 2. 1. Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan elektrokimyasal biyosensör sistemi için izlenen adımlar.	29
Şekil 2. 2. MNP'lerin yüzeyine 5-mC antikorun konjugasyonu.	33
Şekil 2. 3. mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör platformunun tasarım adımları.	35
Şekil 2. 4. Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlanan PoC cihazı.	38
Şekil 2. 5. Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan optik biyosensör sistemi için izlenen adımlar.	40
Şekil 2. 6. AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugasyonu.	42

Şekil 2. 7. mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan optik biyosensör platformunun tasarım adımları.....	43
Şekil 2. 8. Image J programı ile yapılan renk analiz adımları.....	45
Şekil 2. 9. Elde edilen sonuçların yorumlanması amacıyla fotoğrafların çekilmesi için yapılan ev yapımı kutu.....	46
Şekil 2. 10. miRNA-221/222 tespiti için tasarlanmış olan optik biyosensör sistemi için izlenen adımlar.....	47
Şekil 2. 11. miRNA-221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör platformunun tasarım adımları.....	49
Şekil 3. 1. Metillenmemiş (%0 metilasyon) fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi).....	55
Şekil 3. 2. %100 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi).....	56
Şekil 3. 3. %75 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.).....	57
Şekil 3. 4. %50 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.).....	58
Şekil 3. 5. %25 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.).....	59
Şekil 3. 6. VSM sonuçları.	62
Şekil 3. 7. Her modifikasyon adımı için SEM görüntüleri. (A) MNP, (B) MNP/TEOS, (C) MNP/TEOS/APTES, (D) MNP/APTES/TEOS/EDC:NHS, (E) MNP/APTES/TEOS/EDC:NHS/5-Mc Ab.....	63

Şekil 3. 8. Tasarlanan sensöre ilişkin (A) CV (%50 metillenmiş SEPT9 ve PNA eklenmiş yüzey için (SPCE/MNP/EDC: NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA) CV piki ilave olarak (i) verilmiştir.) (Ölçümler, 50 mV/s tarama hızında -0,4 V ile 0,8 V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi), (B) İmpedans sonuçları (Boş SPCE, SPCE/MNP ve SPCE/MNP/EDC:NHS olarak modifiye edilmiş yüzey için EIS sonuçları ilave olarak (i) verildi) (Ölçümler için 0,18V'da 0,02 Hz ile 10 Hz akım aralığı kullanıldı.).....	64
Şekil 3. 9. Tasarlanmış sensör platformunun mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıtla ilişkin A) DPV (%100 metillenmiş DNA için elde edilen pikler ilave olarak (i) verilmiştir) (Ölçümler için 0,4 V dan 0,8 V'a potansiyel aralığı kullanıldı.) B) Kalibrasyon grafiği.	65
Şekil 3. 10. Optimizasyon sonuçları. (A) MNP ile konjuge edilen 5-mC antikorunun konsantrasyon optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. (B) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeyine mSEPT9-PNA eklenmesi ardından inkübasyon süresi optimizasyon sonuçları.	67
Şekil 3. 11. PNA ile hibridite edilen mSEPT9 fragmentlerinin konsantrasyon optimizasyonu.....	68
Şekil 3. 12. Farklı metillenmiş mSEPT9 karışımlarına ve dolaşımda serbest bulunabilecek diğer BCAT, SOX21 fragmentlerine sensörün verdiği yanıt. ...	68
Şekil 3. 13. Gerçek hasta örnekleri ile gerçekleştirilen DPV ölçüm sonuçları (A) Kontrol, (B) kolon kanseri hasta örneği.	70
Şekil 3. 14. Kontrol grubu ve hasta örneklerinin tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sistemi ile mSEPT9 yüzdeleri (****: $p<0,0001$).	71
Şekil 3. 15. Elektrokimyasal cihaz (potansiyostat) elektrik devresi.	72
Şekil 3. 16. Elektrokimyasal cihazın elektrik devre baskısı ve cihazla ilgili en güncel görüntüler.	75
Şekil 3. 17. Tasarlanan POC ile elde edilen CV grafiği (A) Boş SPCE, (B) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab, (C) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA.	78
Şekil 3. 18. PalmSens cihazı ile elde edilen CV sonuçları. (A) Boş SPCE, (B) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab, (C) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA.	78

Şekil 3. 19. RT-PCR, ELISA ve elektrokimyasal biyosensör sistemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması (A) Kontrol grubu (n=10), (B) Hasta örnekleri (n=10).....	79
Şekil 3. 20. Sentezlenen AuNP'e ilişkin UV-VIS spektrumu.....	80
Şekil 3. 21. Her modifikasyon adımı için SEM görüntüleri.....	81
Şekil 3. 22. HS-PEG-COOH optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için UV-VIS spektrumu.....	82
Şekil 3. 23. Whatman kâğıt türü optimizasyonu (A) Grade 41 için (B) Grade 1 için sonuçlar.	83
Şekil 3. 24. PSS konsantrasyon optimizasyonu (A) rezervuar kağıdına AuNP eklendiğinde durum, (B) alıcı kağıda rezervuar kağıt bastırıldıktan sonra renk değişim farkı.....	84
Şekil 3. 25. Gümüş zenginleştirme işlemi öncesi ve sonrasında alıcı kağıttaki renk değişimleri.....	85
Şekil 3. 26. Tasarlanmış sensör platformunun mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıtla ilişkin kalibrasyon grafiği.....	85
Şekil 3. 27. Optik biyosensör sisteminin girişimci molekül olarak seçilmiş olan fragment karışımlarına verdiği yanıt.	87
Şekil 3. 28. Kontrol grubu ve hasta örneklerinin tasarlanan optik biyosensör sistemi ile mSEPT9 yüzdeleri (****: $p < 0,0001$).	88
Şekil 3. 29. RT-PCR, ELISA ve optik biyosensör sistemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması (A) Kontrol grubu (n=10), (B) Hasta örnekleri (n=10).....	89
Şekil 3. 30. MB/PNA/miRNA konjugatına ilişkin SEM görüntüleri.....	91
Şekil 3. 31. miRNA221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanmış olan PNA temelli elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin CV ve EIS sonuçları (A) miR221, (B) miRNA222 (CV ölçümleri, 50 mV/s tarama hızında -0,6 V ile 0,8 V arasında potansiyel aralığında, EIS ölçümleri ise 0,18V'da 0,02 Hz ile 10 Hz akım aralığı gerçekleştirilmiştir.)	92
Şekil 3. 32. miRNA221 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen (A) kalibrasyon grafiği (B) farklı konsantrasyonlarda miRNA221-5p için SWV pikleri (SWV ölçümleri 0,10 ile -0,40 V potansiyel aralığında, 25 mV amplitude ve 12 Hz'de 4 mV step potansiyelde gerçekleştirilmiştir.)	94

Şekil 3. 33. miRNA222 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen (A) kalibrasyon grafiği (B) farklı konsantrasyonlarda miRNA222-3p için SWV pikleri (SWV ölçümleri 0,10 ile -0,40 V potansiyel aralığında, 25 mV amplitude ve 12 Hz’de 4 mV step potansiyelde gerçekleştirilmiştir.).....	95
Şekil 3. 34. miRNA ve PNA’ların hibridize edilmesi için optimum inkübasyon süresi (A) miRNA221, (B) miRNA222.....	96
Şekil 3. 35 . Optimum MDB konsantrasyonu (A) miRNA221, (B) miRNA222.	97
Şekil 3. 36. Her iki elektrokimyasal biyosensör sisteminin girişimci molekül fragmntlerine verdiği cevaplar (A) PNA2 için, (B) PNA3 için.....	98
Şekil 3. 37. Pozitif ve kontrol örnekleri için SWV pikleri (A) PNA2 için, (B) PNA3 için.	99
Şekil 3. 38. Kontrol ve pozitif plazma örnekleri sonuçları, (a) miRNA221, (B) miRNA222 için.....	99
Şekil 3. 39. Hasta plazma örneklerinin RT-PCR sonuçları ışığında miRNA 221 ve 222 düzeyinin kontrol örneklerine göre kat değişim sonuçları (A) miRNA 221 için, (B) miRNA 222 için.	101
Şekil 4. 1. Peptit biyoreseptörleri için SWOT analizi.	104
Şekil 4. 2. Ferrosen işaretli PNA ile mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sisteminin çalışma prensibi.....	106



TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. 1. Biyobelirteçlerin kullanım potansiyelleri ve bazı örnekler.	3
Tablo 1. 2. Kolon kanseri tanısı için kullanılan bazı biyobelirteçler.....	12
Tablo 2. 1. Metillenmiş DNA analizi için RT-PCR reaksiyon içeriği	38
Tablo 2. 2. RT-PCR prosedürü için parametreler.....	39
Tablo 2. 3. cDNA'ların ön amplifikasyonu için reaksiyon içeriği.	52
Tablo 2. 4. RT-PCR reaksiyon için kullanılmak üzere temin edilen primer dizileri.	53
Tablo 2. 5. RT-PCR için için reaksiyon içeriği.	53
Tablo 3. 1. PNA ve hedef DNA fragmentleri arasındaki bağlanmaya ilişkin termodinamik parametreler.....	60
Tablo 3. 2. Her modifikasyon adımı için boyut ve zeta potansiyel sonuçları. .	63
Tablo 3. 3. CV piklerinin katyonik, anyonik pik değerleri ve impedans piklerinin ohm değerleri.	64
Tablo 3. 4. Tasarlanan biyosensör sistemi için bazı analitik parametreler.....	66
Tablo 3. 5. İnsan serum örneklerinde bulunan mSEPT9 fragmentleri için biyosensör cevabı.....	69
Tablo 3. 6. Kullanılan devre elemanları.	72
Tablo 3. 7. Biyosensör sonuçlarının RT-PCR ve ELISA ile kıyaslanması.	79
Tablo 3. 8. Her modifikasyon adımı için boyut ve zeta potansiyel sonuçları. .	81
Tablo 3. 9. Tasarlanan biyosensör sistemi için bazı analitik parametreler.....	86
Tablo 3. 10. Tasarlanan PNA ve miRNA fragmentleri ile gerçekleştirilen elektrokimyasal sensör platformları ve çalışma durumları.....	90
Tablo 3. 11. Her modifikasyon adımına ilişkin boyut ve zeta potansiyel sonuçları.....	91
Tablo 3. 12. miRNA221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanmış olan biyosensör sistemlerinin CV piklerinin katyonik, anyonik pik değerleri ve impedans piklerinin ohm değerleri.	93
Tablo 3. 13. miRNA 221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemleri için bazı analitik parametreler.....	95

Tablo 3. 14. Hasta ve kontrol örnekleri için belirlenen ΔC_T değerleri (H: hasta örnekleri; K: kontrol örnekleri)	100
Tablo 4. 1. Ticari mSEPT9 dedeksiyon kitleri.....	105
Tablo 4. 2. mSEPT9 tespiti için tasarlanmış biyosensör platformları.....	107
Tablo 4. 3. miRNA 221 ve 222 tespiti için tasarlanmış biyosensör platformları.	109



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory)
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)
ctDNA	Circulating tümör DNA
miRNA	mikroRNA
circRNA	Dairesel RNA
mSEPT9	Metillenmiş Septin9
PNA	Peptit nükleik asit
CV	Döngüsel voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
SWV	Kare dalga voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
MB	Manyetik boncuklar
MNP	Manyetik nanoparçacık
AuNP	Altın nanoparçacık
TEOS	Tetraetil ortosilikat
APTES	(3-Aminopropil) trietoksisilan
5-mC Ab	5-metil sitozin antikoru
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
NHS	N-hidroksisüksinimit
SH-PEG-COOH	Poli (etilen glikol) 2- merkapt o etil eter asetik asit
PSS	Poli(sodyum 4-stirensülfonat)

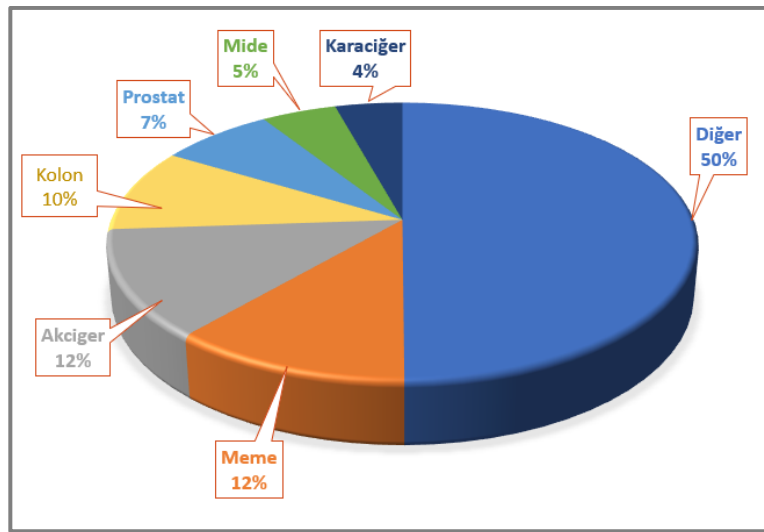


1. GİRİŞ

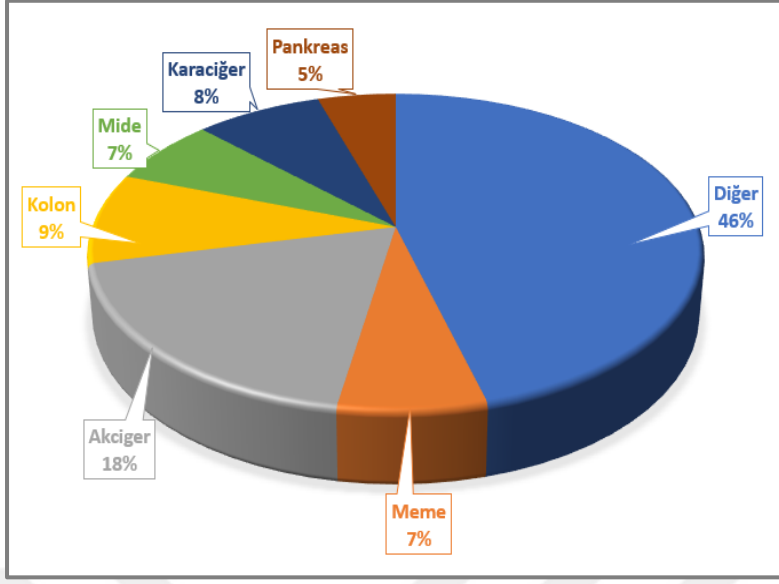
1.1. Kanser

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ile hücre ve dokuları istila ederek yayılabilen geniş bir hastalık grubu olarak tanımlamaktadır (WHO, 2024). Neoplazm veya kötü huylu tümör olarak da bilinen kanser, bugün dünya çapında her altı ölümden birine neden olmaktadır. Kanserın diğer dokulara yayılması durumunun, metastaz, ölümlerin önemli bir nedenini oluşturduğu bilinmektedir (Hanahan and Weinberg, 2011).

Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) dünya çapında kanser oluşumunu tanımlayan ve küresel kanser verilerini analizleyerek profillerini ve büyüklüğünü gösteren bir kurumdur. GLOBOCAN'ın 2022 verilerine göre Dünya çapında ~19 milyon kişi kanser ile mücadele ederken, ~10 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Benzer şekilde GLOBOCAN'ın verilerine göre, ~53 milyon kişi 5 yıl sonunda kanser ile savaşıyor durumda olacağı öngörülmektedir. (GLOBOCAN,2022).



Şekil 1. 1. 2022 GLOBOCAN verilerine göre Dünya genelinde kanser çeşitlerinin dağılımı.



Şekil 1. 2. 2022 GLOBOCAN verilerine göre Dünya genelinde kanser nedeniyle ölüm oranının kanser çeşitlerine göre dağılımı.

Kanserin nedenleri WHO'nun 2022 yılında yayınladığı bir makalede, genetik faktörlerin yanı sıra fiziksel karsinojenler (ultraviyole gibi radyasyon kaynakları), kimyasal karsinojenler (gıda ve sularda bulunan kirleticiler, alkol, tütün bileşenleri vb.) ve biyolojik karsinojenler (virüs, bakteri veya parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlar) olarak belirtilmiştir. Yüksek vücut kütle indeksi, fiziksel aktivite eksikliği, tütün ve fazla alkol tüketimi, besin yetersizliği kanser ölümlerinin üçte birini oluşturduğu bildirilmiştir (WHO, 2022).

2019 yılında Dünya genelinde SARS-CoV-2 virüsünün ortaya çıkması ile sağlık sektöründe meydana gelen sorunlar ve kişilerde meydana gelen virüs buluşma korkusu nedeniyle, kanser teşhis ve tedavisinde aksaklıklar ve gecikmeler meydana gelmiştir. Bu gecikmeler kanser hastalığının evrelerinde ilerlemelere ve mortalitenin artmasına neden olmuştur (Siegel et al., 2023). Erken teşhis edilme durumunda, hastaların hayatta kalma şansının artmasının yanı sıra tedavinin maliyeti de düşürülebilmektedir. Bu açıdan kanser için erken tanı oldukça önemlidir.

1.2. Kanser Biyobelirteçleri ve Çeşitleri

Kanser gelişiminin erken aşamaları, terapötik müdahale için maksimum potansiyeli taşımaktadır. Bu nedenle, premalign veya premetastatik malign

tümörlerin organlar içinde sınırlıyken tespit edilmesi ve etkili tedavinin sağlanması, hayatta kalma oranının arttırılması açısından kritik öneme sahiptir (Arya and Bhansali, 2011). Bu açıdan kanser teşhisinde biyobelirteçler oldukça önemli bir yere sahiptir. Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (National Cancer Institute, NCI) göre biyobelirteç, kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan, kanser gibi anormal bir süreç, durum veya hastalığın işareti olan biyolojik bir moleküldür (Comprehensive Cancer Information - NCI, 1980). Biyobelirteçler bir hastayı, hastalığı olmayan bir kişiden ayırabilmektedir. Bu yapılar sayesinde hastalık riskinin tahmin edilmesi, gizli primer kanserlerin taranması, benign bulguların malign bulgulardan veya bir tür malignitenin diğerinden ayırt edilmesi, tanısı konan hastalar için prognozun belirlenmesi, hastalığın nüksetme durumunun tespit edilmesi veya tedaviye yanıtın belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Biyobelirteçlerin kullanım potansiyelleri ve bu potansiyellere bazı örnekler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1. 1. Biyobelirteçlerin kullanım potansiyelleri ve bazı örnekler.

Kullanım Alanı	Örnek	Referans
----------------	-------	----------

Kanser riskinin hesaplanması	BRCA1 germ hattı mutasyonu (meme ve yumurtalık kanseri için)	(James et al., 2007)
Görüntüleme	Spesifik antijenler (AFP, CA125 vb)	(Duffy, 2015)
Diferansiyel Tanı	Orijinin belirlenmesi için immünohistokimya	(De Matos et al., 2010)
Prognozunun belirlenmesi	Nükse sebep olan 21 gen (meme kanseri için)	(Paik Soonmyung et al., 2004)
Tedavinin gözlemlenmesi	KRAS ve BRAF mutasyonu	(Vakiani and Solit, 2011)
Nüksetme	Eksozomal miR-17-92a (kolon kanseri için)	(Matsumura et al., 2015)
Metastazların izlenmesi	CEA, CA19.9, CA15.3 vb.	(Gaughran et al., 2020)

Tümör biyopsilerine alternatif olarak, invazif olmayan vücut sıvıları kanser biyobelirteçlerin belirlenmesi için iyi ortamlardır. Biyobelirteç analizi için kullanılan en yaygın tümör dışı numune türleri kan, idrar, dışkı, nefes, tükürük, sürüntüler, beyin omurilik sıvısı, balgam ve diğer vücut sıvılarıdır (NCI, 2017).

Biyobelirteçler çok çeşitli olabildiği gibi, çok farklı türleri de söz konusudur. Biyobelirteç olarak kullanılabilen biyolojik yapılar, germ hücre hattı genetik varyantlar, somatik genetik mutasyonlar, epigenetik varyantlar ve transkripsiyonel değişiklikler, proteomik değişiklikler ve hücre fenotipi olarak özetlenebilir.

1.2.1. Germ hattı genetik varyantları

Bir gen alt kümesindeki germ hattı mutasyonları, yaşam boyu kanser riskini arttırdığı bilinen kalıtsal kanser sendromlarıdır (Siraj et al., 2017). Germ hattı varyantları, sıklıklarına ve hastalığa neden olma büyüklüklerine göre üç

gruba ayrılabilir: yüksek penetranslı nadir varyantlar, orta penetranslı varyantlar ve düşük penetranslı yaygın varyantlar (Sarhadi and Armengol, 2022). Bu gruplardan yüksek penetranslı nadir varyantlar grubu, kansere yatkın sendromlara ve kalıtsal kanserlere karşılık gelmektedir. Bu varyantlar güçlü etkileri nedeniyle kanser riski değerlendirme biyobelirteçleri olarak kullanılmaya iyi adaylardır. Germ hattı genetik belirteçleri yalnızca kanser duyarlılığını belirlemek için değil, aynı zamanda hedefe yönelik tedaviler için önemli prognostik ve öngörücü belirteçlerdir. Bu tip biyobelirteçlere örnek olarak meme ve yumurtalık kanseriyle güçlü bağlantıları olduğu kanıtlanmış BRCA1 ve BRCA2 yüksek penetranslı varyantları verilebilir (Pavanello et al., 2020).

1.2.2. Somatik genetik mutasyonlar

Germ hücreleri haricindeki diğer hücrelerde meydana gelen mutasyonlardır. Kanser hücrelerinin önemli bir özelliği genomik istikrarsızlıktır. Bu mutasyonlar tek bir kanser türüne özgü iken, bazıları ise diğer kanserlerle paylaşılabilir. Bu mutasyonlar, büyük bir parçadan veya bir kromozomun tamamından tek baz çifti değişikliklerine kadar geniş bir boyut aralığını içerebilir (Sarhadi and Armengol, 2022). Bu mutasyona örnek olarak meme kanseri PIK3CA mutasyonları verilebilir (Martínez-Sáez et al., 2020).

Tümör dokusunda görülen mutasyonların yanı sıra, dolaşımdaki tümör DNA'sı (circulating tumor DNA, ctDNA) olarak adlandırılan, kanser hücresinin parçalanması/ölümü veya aktif salgılanmasından kaynaklanan hücre dışı DNA yapıları da biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu DNA'lar kan, idrar, dışkı, tükürük, balgam ve dışarı verilen nefes gibi vücut sıvılarında bulunabilir ve tümör DNA'sında görülenlere benzer genomik değişiklikleri yansıtabilmektedir. Sağlıklı kişiler ve kanser hastalarının ctDNA konsantrasyonu kıyaslandığında, göreceli oranında farklılıklar görülmüştür. Bu da ctDNA'yı iyi bir potansiyel kanser biyobelirteci haline getirmiştir (Hassan et al., 2022). Ancak ctDNA'nın saptanmasıyla ilgili temel zorluk, plazma veya diğer vücut sıvılarında çok düşük konsantrasyonlu olmasıdır, dolayısıyla tespiti için çok hassas yöntemler gerektirmesidir.

1.2.3. Epigenetik varyantlar ve transkripsiyonel değişiklikler

Epigenetik, gen ifadelerini düzenlemeye yardımcı olan, DNA dizisinde bir değişiklik olmadan meydana gelen gen ifadesindeki kalıtsal değişikliklerin incelenmesini ifade etmektedir (Rodenhiser and Mann, 2006). Epigenetik düzenlemeden sorumlu anahtar süreçler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve genellikle mikroRNA'lardır (Ducasse and Brown, 2006)

1.2.3.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, en iyi karakterize edilen epigenetik modifikasyonlardan biridir. Ökaryotlarda metilasyon, genom bütünlüğünün korunmasında, genomik damgalamada, transkripsiyonel düzenlemede ve gelişimsel süreçlerde önemli bir rol oynayan epigenetik DNA modifikasyonları ile karakterize edilir (Wu and Zhang, 2010). DNA metilasyonu genellikle CpG dinükleotidleri içindeki sitozin halkasının 5' pozisyonunda gerçekleşir (Kanwal and Gupta, 2012). DNA metilasyonu değişiklikleri tümör oluşumunun erken aşamalarında meydana geldiğinden, kanser biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır (Sarhadi and Armengol, 2022). Ek olarak, DNA metilasyon biyobelirteçleri, aynı zamanda kanser tedavisine yanıtın tahmin edilmesinde de faydalıdır. Epigenetik varyantlar, plazma gibi minimal invaziv örneklerde tespit edilebilmektedir (Constâncio et al., 2020). Bu varyasyonlara örnek, Amerika Birleşik Devletleri Sağlık Bakanlığına bağlı Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration, FDA) onaylı kolon kanseri biyobelirteci olarak bir metillenmiş DNA olan ve plazmadan test edilebilen SEPT9 (Epi ProColon) ve dışkı örneklerinden elde edilen NDRG4 ve BMP3 kombinasyonu verilebilir.

1.2.3.2. Histon modifikasyonu

Histonlar, küresel bir C-terminal alanına ve yapılandırılmamış bir N-terminal kuyruğına sahip, yüksek düzeyde korunmuş ve bazik proteinlerdir. Genoma fizyolojik olarak duyarlı ve kromatine dönüştürmek için en önemli proteinlerdir (Khan et al., 2015). Nükleozomlar, etrafına 146 baz çifti DNA'nın

sarıldığı H2A, H2B, H3 ve H4'ten (her biri iki adet) oluşan bir oktamerden oluşan temel kromatin birimleridir. Histon modifikasyonlarının değişen modelleri, kanserde yaygın olarak gözlenmektedir. Histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin büyük çoğunluğu, bir veya daha fazla gen promotörünün incelenmesi yoluyla tespit edilmekte ve kanser fenotipi için kritik sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır (Kurdistani, 2011).

1.2.3.3. Mesajcı RNA (mRNA)

Tümör mRNA profili, normal dokuya kıyasla tümörlerdeki genlerin farklı ekspresyonu, kanserin aşamaları ve diğer tümör özellikleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Tümörler, RNA profiline dayalı olarak moleküler alt tiplere ayrılabilir. Bu alt tipler, tümör tipine bakılmaksızın tedaviye yanıtı tahmin etmeyi sağlayabilmektedir. Tümör immün profili veya immün ilişkili genlerin ekspresyonu da immünoterapi yanıtı için önemli biyobelirteçlerdir (Sarhadi and Armengol, 2022).

1.2.3.4. mikroRNA (miRNA)

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan küçük RNA'lardır. Her bir dokunun yaklaşık bin miRNA ifade ettiği ve bunların 143'ünün tüm dokularda bulunduğu bilinmektedir. miRNA, normal hücre fizyolojisi için hayati öneme sahip olmasına rağmen bunların yanlış ekspresyonu kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Tümör dokularında ve kanser hastalarının vücut sıvılarındaki miRNA bilgisi, normal doku veya sağlıklı bireylerle kıyaslandığında diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'larda belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıklar ışığında miRNA'ların, prognoz veya öngörücü kanser biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Mishra et al., 2016).

miRNA'ların kanser biyobelirteçleri olarak temel avantajı, küçük boyutlu olmalarıdır. Bu avantajları, vücut sıvıları gibi düşük RNA kalitesine sahip numuneler içinde onları tespit etmeye uygun hale getirmektedir. Tümör

dokusunda farklı ekspresyona sahip miRNA'lar, vücut sıvılarındaki ctRNA'da da tespit edilebilir. Dahası miRNA'lar, hücre dışı keseciklerin ana yükünü oluşturur; burada RNazlardan korunurlar. Bu nedenle kandaki kanser biyobelirteçleri olarak kullanımları her geçen gün daha popüler hale gelmektedir (Inoue and Inazawa, 2021).

1.2.3.5. Dairesel RNA (circRNA)

miRNA gibi davranan, transkripsiyon ve eklemeyi düzenleyen endojen kodlanmayan RNA'lardır. Başlığı ve poli-A kuyruğu olmayan, uçları kovalent olarak birleşmiştir. Bu birleşme nedeniyle dairesel bir yapıya sahip, tek sarmallı RNA'lardır. Yüksek stabiliteleri, dokuya spesifik ekspresyonları ve tümör ile ilişkileri nedeniyle kanser biyobelirteçleri olarak kullanılabilir (Sarhadi and Armengol, 2022).

1.2.4. Proteomik değişiklikler

DNA ve RNA seviyelerinin kanserle ilişkili değişiklikleri, protein seviyesinde de gözlemlenmektedir. Proteinlerin incelenmesi, nükleik asitlere göre daha zordur. Bunun nedeni ise proteinlerin yapısındaki karmaşıklığıdır. Proteinler, fizyolojik değişikliklere karşı hassastır ve işlevleri translasyon sonrası modifikasyonlara bağlıdır. Kanser biyobelirteci olarak kullanılan proteinler, aşırı eksprese edilmiş proteinleri, mutasyona uğramış proteinleri veya tümöre özgü translasyon sonrası modifikasyonlara sahip proteinleri içermektedir. Bütün bu proteinler, tümör dokusunda tespit edilebilmektedir. Diğer taraftan, tümörlerde saptananlara ek olarak, proteinler kan veya diğer vücut sıvılarında saptanabilmektedir. Protein biyobelirteçlerine ek olarak, glikanlar ile birleşerek oluşan glikoproteinlerde kanda olduğu gibi tümör dokusunda da faydalı kanser biyobelirteçlerdir. En yaygın olarak bilinen AFP, (CA)15-3, CA125, CEA, HER2 glikanlar/glikoproteinlerdir (Borrebaeck, 2017).

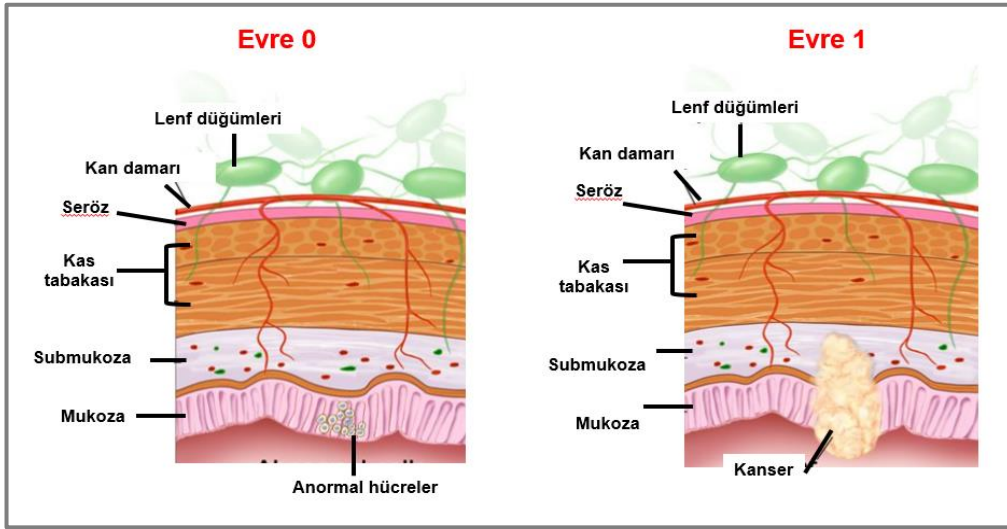
1.2.5. Hücre fenotipi

Gen ve protein ifadesindeki değişiklikler, hücresel fenotip olarak bilinen hücrelerin morfolojisinde ve fonksiyonunda değişikliklere neden olabilmektedir. Bu fenotipik özellikler, söz konusu fenotipin ifadesinde yer alan yolların çeşitliliğini yansıtmaktadır. Bu nedenle, diğerlerinin yanı sıra, oksidatif stres seviyeleri veya hücre ölümü (apoptoz) gibi hücre tepkileri, kanser için hücresel biyobelirteçler olarak kullanılabilir (Sarhadi and Armengol, 2022).

1.3. Kolon kanseri

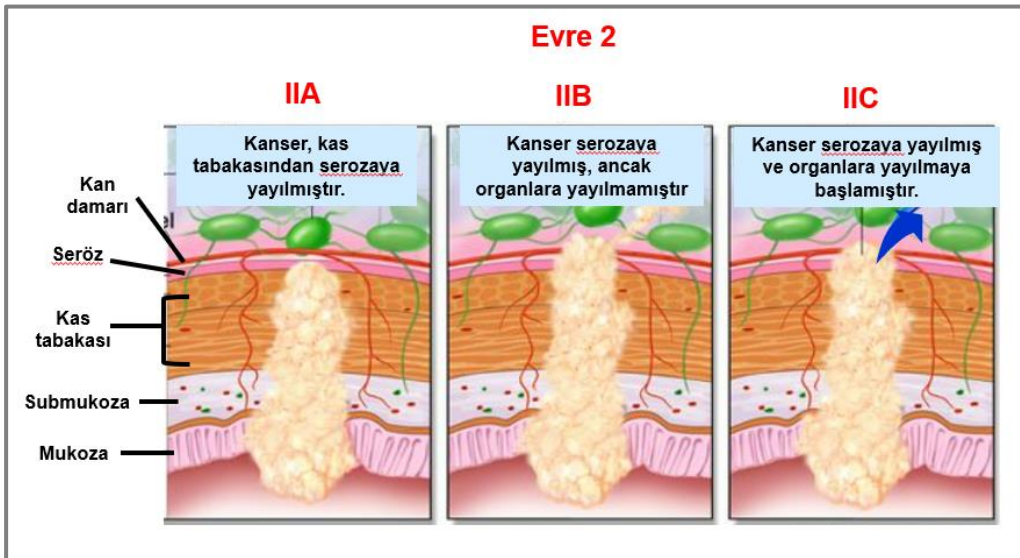
Kolon, vücuda alınan ve sindirim sonrasında oluşan atık maddelerin vücuttan atılmasına yardımcı olan, sindirim sisteminin bir parçasıdır. Kolon, kalın bağırsağın ana kısmıdır ve yaklaşık 5 metre uzunluğundadır. Rektum ve anal kanal birlikte kalın bağırsağın son kısmını oluşturur ve yaklaşık 6 ila 8 inç uzunluğundadır. Kolorektal kanser, kolorektal bölgedeki hücrelerin çalışma biçimindeki, özellikle de büyüme ve yeni hücrelere bölünme durumundaki bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu kanser için beş farklı evre söz konusudur (Colon Cancer Treatment - NCI, 2024).

- Evre 0; kolon duvarının mukozasında anormal hücrelerin oluşumu başlar. Bu hücreler kansere dönüşebilir ve normal dokuya yayılabilir. Bu evreye *in situ* karsinoma da denir (Şekil 1.3).
- Evre I; kanser kolon duvarının mukozasında oluşmuş ve submukozaya (mukozanın yanındaki doku tabakası) veya kolon duvarının kas tabakasına yayılmıştır (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3. Evre 0 ve 1 kolon kanserinin şematize gösterimi (*Colon Cancer Treatment—NCI,2024*).

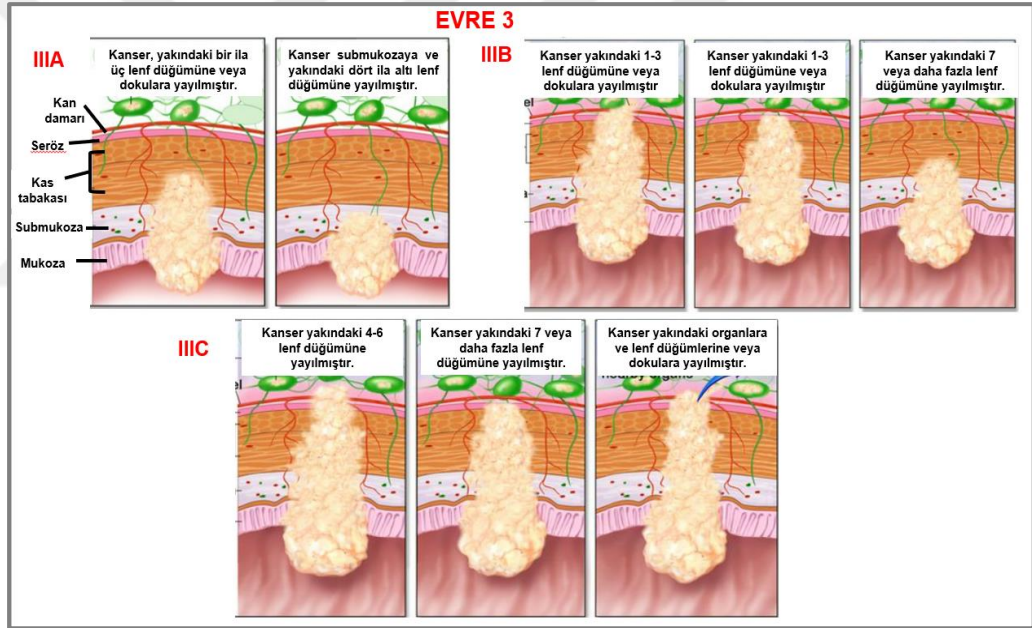
- Evre II; kendi içerisinde üçe ayrılır (Şekil 1.4)
 - ✓ Evre IIA: Kanser kolon duvarının kas tabakasından kolon duvarının serözasına (en dış tabakasına) yayılmıştır.
 - ✓ Evre IIB: Kanser, kolon duvarının serözāsından, karın içindeki organları kaplayan dokuya (visseral periton) yayılmıştır.
 - ✓ Aşama IIC: Kanser, kolon duvarının serözāsından, yakındaki organlara yayılmıştır.



Şekil 1. 4. Evre 2 kolon kanserinin şematize gösterimi (*Colon Cancer Treatment—NCI,2024*).

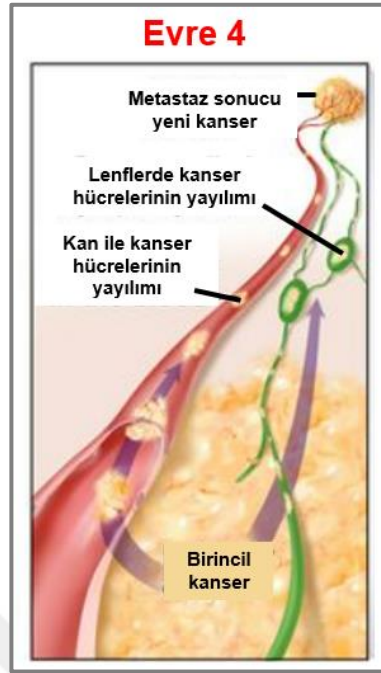
- Evre III; kendi içerisinde üçe ayrılır (Şekil 1.4)

- ✓ Evre IIIA: kolon duvarının mukozadan, submukozaya ve kas tabakasına yayılmıştır. Yakındaki 1-3 lenf düğümlerine veya dokulara veya 1-6 lenf düğümlerine yayılmıştır.
- ✓ Evre IIIB: kolon duvarının kas tabakası yoluyla serözaya yayılmış durumdadır, ancak henüz yakındaki organlara yayılmamıştır. Yakındaki lenf düğümlerine (1-3 veya 1-6 veya 7 ve daha fazla) veya lenf düğümlerinin yakınındaki dokulara yayılmış olabilir.
- ✓ Evre IIIC: kolon duvarının serözünden karındaki organları kaplayan dokuya kadar uzanmıştır. Yakındaki 1-6 lenf düğümlerine yayılmıştır.



Şekil 1. 5. Evre 3 kolon kanserinin şematik gösterimi (Colon Cancer Treatment—NCI,2024).

- Evre IV; kanser kan ve lenf düğümleri yoluyla akciğer, karaciğer, karın duvarı veya yumurtalık gibi vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır (Şekil 1.6)



Şekil 1. 6. Evre 4 kolon kanseri şematize gösterimi (*Colon Cancer Treatment—NCI,2024*).

Kolorektal kanser dünya çapında en sık görülen üçüncü kanser türüdür. GLOBOCAN'a göre, 2022 yılında 1,9 milyondan fazla vakaya teşhis konulmuş ve kanser ölümlerine neden olan ikinci kanser türü olarak bilinmektedir. Yılda 900.000'den fazla ölüme yol açtığı belirtilmektedir (GLOBOCAN,2022). Erken teşhisin oldukça önemli olduğu bu kanser türünde biyobelirteçlerin önemi büyüktür. Tablo 1.2'de bazı kolon kanseri tanı biyobelirteçleri verilmiştir.

Tablo 1. 2. Kolon kanseri tanısı için kullanılan bazı biyobelirteçler.

Biyobelirteç Türü	Biyobelirteç	Bulunduğu yer	Referans
Metillenmiş DNA	SEPT9	Kan	(Fu et al., 2018; Grützmann et al., 2008; Tänzer et al., 2010)
	SDC2	Kan	(Barták et al., 2017; Zhao et al., 2020)
	SFRP1 ve 2	Kan	(Barták et al., 2017; Zhao et al., 2020)
	PRIMA1	Kan	(Barták et al., 2017)
Histon modifikasyonu	H3K9me3 ve H4K20me	Kan	(Gezer et al., 2015)
	H2BK12	Kan	(J.-Y. Hou et al., 2023)
miRNA	miR-103a-3p, miR-127-3p, miR-17-5p ve miR-18a-5p	Doku	(H. Zhang et al., 2019)
	miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-18a-5p and miR-18b-5p	Kan	(H. Zhang et al., 2019)
	miR221 ve 222	Kan	(Iida et al., 2018; Q. Song et al., 2019)

Protein	CEA, CA19-9, CA72-4, CA125	Kan	(Gao et al., 2018)
---------	----------------------------	-----	--------------------

1.4. Septin 9 (SEPT9)

SEPT9, GTP bağlayıcı proteinleri kodlayan, oldukça korunmuş bir septin genleri ailesine aittir. Bu proteinler kompleksler halinde bir araya gelmekte ve hücre iskeletinin bir kısmını oluşturan filamentli yapılar oluşturmaktadır (Sandrock et al., 2011). Septin proteinleri, hücre zarına sertlik sağlayarak, proteinleri spesifik alt hücre bölgelerine toplamak için iskelet görevi görmektedir. Ayrıca, ayrı hücresel alanlar oluşturmak için membran difüzyon bariyerleri oluşturarak birçok hücresel süreçte önemli rol oynamaktadır (Estey et al., 2011). SEPT9, 219 kb'yi kapsayan ve 15 izoformu kodlayan 18 farklı transkript içeren karmaşık genomik organizasyonu ile karakterize edilmektedir (Wasserkort et al., 2013).

SEPT9, yumurtalık kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanan sitokinez ve hücre döngüsü kontrolünde olan bir gendir (Scott et al., 2006). Ayrıca SEPT9'u içeren kromozomal anormallikler, akut miyeloid lösemiyle ilişkilendirilmiştir (Saito et al., 2010). 2010 yılında yapılan bir çalışma sonrasında metillenmiş SEPT9'un (mSEPT9) kolorektal kanser biyobelirteci olarak dolaşımda bulunabileceği belirlenmiştir (Church et al., 2014; deVos et al., 2009). Bu durum, SEPT9 geni V2 transkriptinin promotör bölgesindeki CpG adasında 3' hipermetile edilmesi ardından, genin DNA'sının, kolorektal kanser karsinogenezi sırasında nekrotik ve apoptotik kanser hücrelerinden periferik dolaşımdaki kana salınması ile açıklanmaktadır. mSEPT9, FDA tarafından onaylanmış kolon kanseri biyobelirteçleri arasındadır. Bu açıdan, kolorektal kanserin erken teşhisine yardımcı olmak için mSEPT9 analizine yönelik test sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu duruma örnek Epi proColon ® 2.0 CE, verilebilir (Lamb and Dhillon, 2017).

1.5. miRNA-221 ve 222

Son yıllarda kanser üzerine yapılan araştırmalarda miR-221 ve miR-222 seviyelerinin farklı kanser türlerindeki düzensizliği dikkat çekmektedir. X kromozomu (Xp11.3) üzerinde kodlanan bu iki miRNA homologdur. Tohum dizilerini paylaşmakta ve genellikle bir küme (miR-221/222) gibi davranmaktadır (Ravegnini et al., 2019). Meme, karaciğer, pankreas, prostat, mide, kolorektal kanser, glioma gibi pek çok kanserin tanı, prognoz ve tedavisinde anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir (J. Song et al., 2017).

Yapılan araştırmalar sonucunda kolorektal kanser durumunda miR-221/222 seviyelerinin yükseldiğini bildirilmiştir (Q. Song et al., 2019). Onkogen KRAS, kolorektal hücre hatlarında miR-221/222 ekspresyonunun artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Tsunoda et al., 2011). Benzer şekilde p27/ CDKN1B , p57/ CDKN1C ve PTEN genlerinin kolorektal hücrelerde miR-221/222'nin ekspresyonunu arttırmaktadır (Le Sage et al., 2007; Sun et al., 2011; Xue et al., 2013). Bunun gibi pek çok gen tarafından regüle edilen miR-221/222 çifti kolorektal kanser dedeksiyonu için kandan analiz edilebilmeleri nedeniyle, önemli biyobelirteçlerdir.

1.6. Peptitler

Peptitler, proteinlerin aynı yapı taşları olan amino asitlerin bağlanmasıyla oluşan kısa zincirli polimerlerdir. Peptitleri oluşturan amino asitlerin yan zincirleri (R grupları) peptidlerin konfigürasyonunu, işlevselliğini önemli ölçüde etkilemektedir (Ulijn and Smith, 2008). Peptit zincirinde yüklü karboksil ve amin gruplarının varlığı, hidrojen bağlarının oluşmasına teşvik etmektedir. Bu durumda, yüzeyde hidrasyon katmanı ve hidrofilik karaktere neden olmaktadır. Bu nedenle peptitler hidrofilik özellikler sergilemektedir. Spesifik olarak sentezlenen peptit dizisinin genel yükü neredeyse nötr olabilmektedir. Bu nötrlük sayesinde negatif veya pozitif yüklü proteinlerin adsorpsiyonu önlenmektedir (S. Chen et al., 2009).

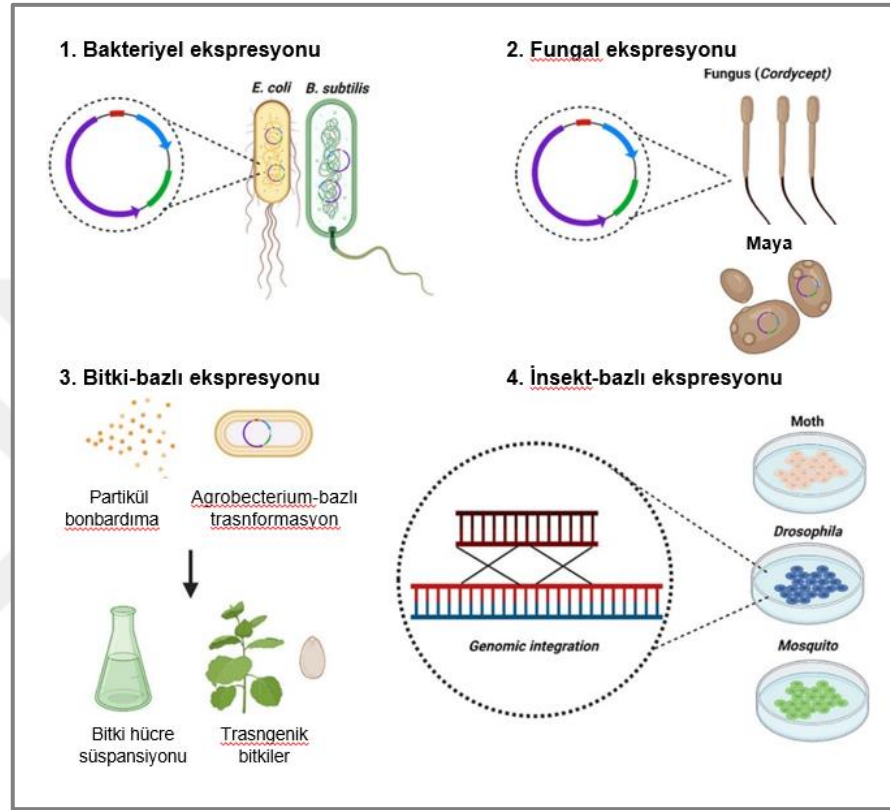
Peptitler, biyosensör uygulamalarında biyoreseptör olarak kullanımı durumunda proteinlere göre, daha kısa zincir uzunlukları nedeniyle gelişmiş kimyasal ve konformasyonel stabilite, sentez ve modifikasyon kolaylığı, çok yönlülük ve hedef spesifikliğı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Karimzadeh et al., 2018; Q. Liu et al., 2015). Hedefe spesifik ve istenilen şekilde sentezlenebilmeleri ile peptitlerin hedef analite afiniteleri arttırabilmektedir. Dahası, peptitlerin ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri biyosensör sistemlerinin tasarımına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu özellikler sayesinde miseller, tüpler ve tek katmanlı birçok nanomalzeme ile kolayca modifiye olabilmektedir (Pavan and Berti, 2012). Peptitlerin sentez yöntemleri aşağıda sınıflandırılmıştır.

1.6.1. Kimyasal yöntemlerle veya rekombinant DNA teknolojileriyle sentez

Merrifield tarafından 1963 yılında tanıtılan katı faz sentezi, peptit üretimi için kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Behrendt, R. et al., 2016; B. Merrifield, 1997). Merrifield tarafından 1985 yılında alınan Nobel ödüllü (R. B. Merrifield, 1985), biyosensörlerde kullanılacak peptitlerin üretimini mümkün kılmıştır (Bhardwaj et al., 2014). Geniş kullanımına rağmen katı faz sentezi, dimetilformamid (DMF) gibi organik çözücülere duyulan gereksinim nedeniyle çevre dostu olmayan bir işlemdir (W. Hou et al., 2017). Bu nedenle süreci daha yeşil hale getirmek için farklı yaklaşımlar denenmiştir (Jad et al., 2019).

Biyosensörlerin bileşenleri olarak sıklıkla antibakteriyel (Erdem Büyükkiraz, M. and Kesmen, Z., 2022) ve antiviral peptidler (Agarwal and Gabrani, 2021) kullanılmaktadır. Antimikrobiyal peptitler, katı faz sentezi veya SPOT sentez yöntemleri kullanılarak kimyasal olarak sentezlenmektedir. Antimikrobiyal peptidlerin rekombinant üretimi, uzun peptidleri daha düşük maliyetle üretmenin alternatif bir yoludur (Gaglione et al., 2019; Y. Li, 2011). Peptitlerin rekombinant üretimi için bakteri ve mantar hücreleri ile bitki veya böcek bazlı sistemleri içeren farklı konakçı sistemleri mevcuttur (Şekil 1.7.) (Deo et al., 2022). Özellikle bakteriyel sistemler maliyet ve saflaştırma kolaylığı

açısından üstündür. Ancak üretilen peptitler düşük stabiliteye sahip olabilir ve bazıları konakçı için toksik olabilir. Bu sorunların üstesinden gelmek için, peptitlerin taşıyıcı proteinlerle füzyon halinde üretilmesi ve peptitlerin art arda tekrarlar şeklinde ekspresyonu gibi çeşitli stratejiler önerilmektedir (Fida et al., 2009; Yurkova et al., 2020).

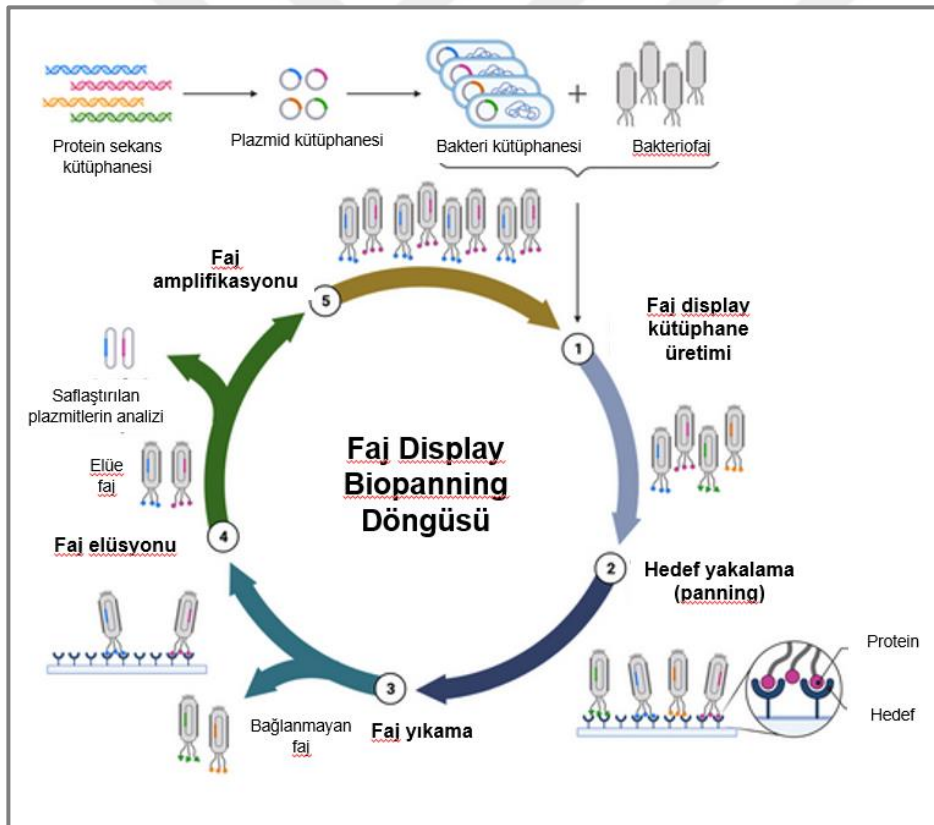


Şekil 1. 7. Peptitlerin rekombinant üretimi için kullanılabilecek farklı konakçı hücreler (Deo et al., 2022).

1.6.2. Faj gösterim

Faj gösterim, hedefe özgü peptitlerin rastgele kütüphanelerden tanımlanmasına olanak tanıyan bir tekniktir. Nobel ödüllü bu teknoloji ilk olarak 1985 yılında George P. Smith tarafından tanımlanmıştır (Smith, G. P., 2019). Biyosensörlerde kullanılmak üzere peptitlerin ve antikorların sentezi için yaygın olarak kullanılmıştır (Peltomaa et al., 2019; Xu et al., 2021) (Şekil 1.8). Faj display tekniği, yüzeylerinde yabancı peptidleri sergileyen bakteriyofaj kütüphanesinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu amaçla, rastgele bir havuzdan alınan peptidi kodlayan DNA dizisi, bakteriyofajın kaplama proteini

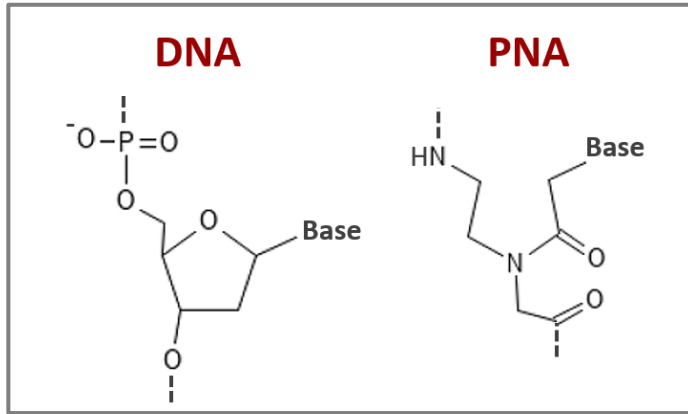
ile birleştirilir. Bakteriyel konakçı hücrelerin enfeksiyonu üzerine yabancı peptit, kaplama proteini ile füzyon halinde bakteriyofajın yüzeyinde eksprese edilir ve görüntülenir. Böylece her biri farklı bir peptit sergileyen bir bakteriyofaj kütüphanesi elde edilir (Fagerlund et al., 2014). Bir sonraki adım, peptitlerin afinite seçimini içeren biyopanning'tir (McGuire et al., 2009). Kısaca, bakteriyofaj kütüphanesi bir mikropilaya kuyucuğu, manyetik boncuklar veya kromatografi kolonu üzerinde immobilize edilen hedef ile inkübe edilir (Noppe et al., 2009). Bağlanmamış bakteriyofajların yıkanmasından sonra, hedef bağlayıcılar elüe edilir ve konakçı hücrelerde yeniden amplifiye edilir. Bu adımlar, yüksek afiniteli bağlayıcılar zenginleşene kadar tekrarlanır (Alfaleh et al., 2020). Zenginleştirmenin ardından bakteriyofaj DNA'sı ekstrakte edilir ve sekanslanır (Juds et al., 2020).



Şekil 1. 8. Faz görüntüleme yönteminin şematik gösterimi (Tian et al., 2022).

1.6.3. Peptit nükleik asitleri (PNA'lar)

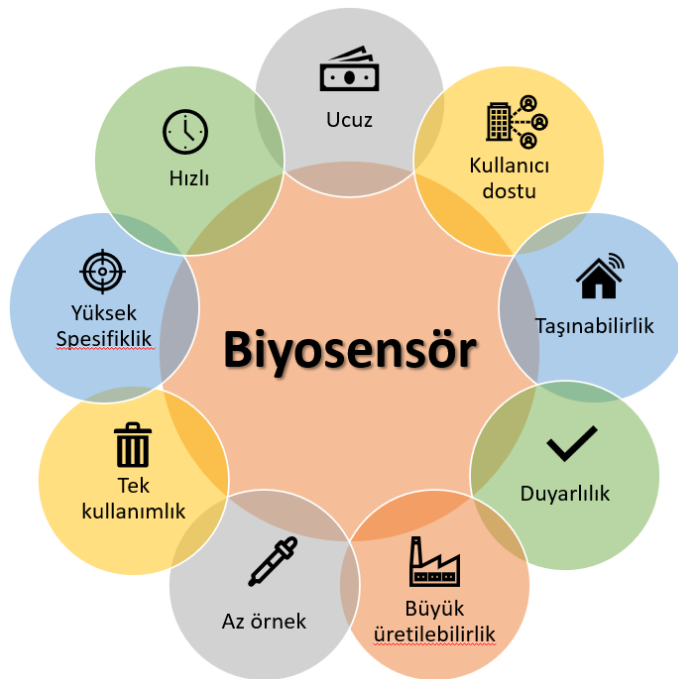
PNA'lar, nükleobazları bağlayan omurga açısından farklılık gösteren sentetik nükleik asit analoglarıdır (Şekil 1.9) (Karimi-Maleh et al., 2021; Pellestor and Paulasova, 2004). PNA'nın omurgası, nükleazlara karşı direnç sağlayan, tekrarlayan N-2 aminoetil glisin birimlerinden oluşur. Pürin ve pirimidin bazları omurgaya metilen karbonil bağları ile bağlanmaktadır. DNA veya diğer DNA analoglarından farklı olarak PNA'lar herhangi bir pentoz şeker kısmı veya fosfat grubu içermemektedir (Saarbach et al., 2019). Tüm molekül içi mesafeler ve nükleobazların konfigürasyonu, DNA molekülleri ile benzer olduğundan, PNA ile DNA veya RNA dizileri arasında hidrojen bağlanması yoluyla spesifik hibridizasyon meydana gelebilmektedir. PNA'nın yüksüz zinciri nedeniyle, PNA/DNA dublekslerinin DNA/DNA eşdeğerleriyle karşılaştırıldığında daha iyi termal stabiliteye sahiptir. Nötr amid omurgası nedeniyle PNA, düşük tuzlu ortam koşullar altında DNA ve RNA molekülleri ile hibridizasyonu sağlayabilir. Bunun nedeni, negatif yüklü iki nükleik asit arasında dubleks oluşumunu engelleyen iplikçikler arası itmeyi ortadan kaldırmak için hiçbir pozitif iyon gerekli olmamasıdır. Sonuç olarak, DNA veya RNA analitlerindeki molekül içi katlanma yapılarının bolluğu ve stabilitesi önemli ölçüde azalır ve tamamlayıcı PNA oligomerleri için daha erişilebilir hale gelir. Ayrıca PNA, asidik koşullar altında DNA'nın aksine, geniş bir sıcaklık ve pH değeri aralığında stabildir. Ancak alkali koşullar altında PNA molekülleri düzenlenebilir. Ek olarak PNA, nükleazlara ve proteazlara karşı dirençlidir (Shakeel et al., 2006). Üstün bağlanma ve stabilite özellikleri sayesinde PNA'lar sıklıkla biyosensörlerde kullanılmaktadır (Saadati et al., 2019).



Şekil 1. 9. PNA ve DNA yapıları.

1.7. Biyosensörler

Biyosensörler, son yıllarda önemi giderek artan popüler bir tanı yöntemidir. Biyoreseptör moleküllerini kullanarak hedef analiti tespit eden ve hedef ile tanıma molekülleri arasındaki reaksiyonu ölçülebilir sinyallere dönüştüren sistemler olarak tanımlanmaktadır. WHO ideal bir biyosensör sisteminin sahip olması gereken özellikleri uygun maliyetli, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipman gerektirmeyen ve taşınabilir olarak sıralamaktadır (Celikbas et al., 2019a) (Şekil 1.10).



Şekil 1. 10. Biyosensörlerin özellikleri.

Biyosensör sistemleri tasarımında kullanılan biyoreseptör tiplerine göre veya sinyal üretim sistemlerine göre sınıflandırılmaktadır. Sinyal üretim sistemine göre, elektrokimyasal, optik, termal ve piezoelektronik olarak sınıflandırılırken; bioreseptör tipine göre; antikor, aptamer, nükleik asit, peptit, enzim temelli olabilirler.

1.7.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyoreseptör molekülleri kullanarak hedef analitin tespit edilmesini ve biyoreseptör ile hedef analit arasında meydana gelen tepkimenin elektrokimyasal sinyallerle izlenmesini sağlayan biyosensör sistemleridir. Elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımındaki en temel malzemelerden biri elektrotlardır (S. Zhang et al., 2000). Elektrokimyasal biyosensör sistemleri çalışma, referans ve karşıt elektrot olmak üzere üçlü elektrot sisteminden oluşur. Ag/AgCl genellikle bir elektrokimyasal reaksiyonda potansiyeli korumak için referans elektrot olarak kullanılır. Karşıt elektrot, çalışma elektrotu ile elektrokimyasal hücre arasındaki bağlantıdan sorumlu elektrot iken, çalışma elektrodu üzerinde reaksiyonun meydana geldiği elektrottur (Chaubey and Malhotra, 2002). Elektrotların sensör sisteminin performansını etkilemesi nedeniyle iletken ve kararlı malzemeler olmaları gerekmektedir.

Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde, hedef analitin biyoreseptör molekülleri tarafından yakalanması sonucu oluşan tepkime amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve empedans ölçümleri ile izlenebilir (Grieshaber et al., 2008). Kondüktometrik biyosensör sistemleri, elektrotlar arasındaki elektrolit çözeltisinin iletkenliği ile ilgilenmektedir. Bu sistemler, enzimatik bir reaksiyon sonucunda elektrotlar arasında meydana gelen iletkenlik değişimini ölçer. Bu sistemlerin minyatürleştirilmesi, referans elektrot gerektirmediğinden diğer elektrokimyasal sistemlere göre daha kolaydır (Perumal and Hashim, 2014).

Potansiyometrik sensör sistemleri ise, statik koşullar altında elektrokimyasal hücrede meydana gelen potansiyel değişimini ölçmektedir. Bu

sistemlerde, hücreden geçen akım ihmal edilebilir düzeydedir (Karimi-Maleh et al., 2021). Akım ihmal edilebilir olduğundan potansiyometrik sistemler, girişim yapan moleküllerin etkilerine karşı diğer elektrokimyasal biyosensör sistemlerine göre daha dirençlidir (Walker et al., 2021).

Voltametrik biyosensör sistemleri, akımı potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçmektedir. Elektrokimyasal hücredeki potansiyel, çalışma elektrotundaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları için güç olarak kullanılır (Özkan et al., 2003). Voltametrik biyosensör sistemlerinde uygun ölçüm tekniğinin seçimi biyosensör sistemlerinin seçicilik ve duyarlılık gibi özelliklerini etkiledikleri için oldukça önemlidir (J. Liu et al., 2022). En yaygın voltametrik ölçüm teknikleri döngüsel voltametri (cyclic voltammetry, CV), diferansiyel puls voltametrisi (differential pulse voltammetry, DPV) ve kare dalga voltametrisidir (square wave voltammetry, SWV). CV tekniğinde, çalışma elektroduna üçgen dalga şeklinde bir potansiyel uygulanır. Reaksiyon ortamındaki türler denge potansiyeline yaklaştığında voltaqramda tepe noktası oluşmuştur. Ortaya çıkan voltaqram, reaksiyonun tersinirliği, hızı ve mekanizması ile hedef analitin konsantrasyonu hakkında bilgiler vermektedir (Elgrishi et al., 2018). DPV tekniğinde, sabit genlikli bir darbe şeklinde uygulanan bir potansiyel söz konusudur. Bu potansiyel altında darbeden önceki ve sonraki akım ölçülür. DPV tekniği ile oldukça düşük tespit limitlerine ulaşılmaktadır (J. Liu et al., 2020). CV ve DPV tekniklerinin birleşiminden ortaya çıkan diğer bir teknik ise SWV'dir. Bu teknikte, potansiyel DPV'ye benzer şekilde simetrik bir dalga ve merdiven darbesi olarak uygulanmaktadır. Bu potansiyel sayesinde CV'ye benzer şekilde hem anodik hem de katodik reaksiyonlar meydana gelmektedir. İleri ve geri akım darbelerden hesaplanan net akımla bir voltaqram oluşturur. Teknik DPV kadar duyarlıdır ve geri dönüşümlü reaksiyonların analizine olanak sağlamaktadır (A. Chen and Shah, 2013).

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniğinde, ortama bir voltajın uygulanması sonucu akım ölçülmektedir ve voltajın akıma oranına empedans adı verilmektedir. Bu sistemde empedans, frekansın bir fonksiyonu olarak ölçülür (Fernández-Sánchez et al., 2005). Empedans sadece tek bir frekansta değil aynı zamanda farklı frekanslarda da belirlenebilmektedir. Bu,

elektrot yüzeyindeki katmanların karakterize edilmesini mümkün kılmaktadır (Lisdar and Schäfer, 2008). Empedans spektrumu, dirençli bir devre, bir kapasitans, sabit fazlı bir eleman ve bir Warburg empedansı içeren empedansı belirlemek için kullanılır. Empedans ölçüm sonuçları ile devre elemanlarının değerleri Randles devreleri olarak tanımlanmaktadır ve yarı dairesel Nyquist diyagramı kullanılarak değerlendirilmektedir. Bu diyagram, elektrot ile elektrokimyasal elektrolit arasında temas olması durumunda çözeltinin direncini ve yük transfer dirençlerini hesaplamaya yardımcı olmaktadır. Bu hesaplamalara dayanarak analitik parametreler ve yüzey karakterizasyonu hakkında bilgiler elde edilmektedir.

1.7.2. Optik biyosensörler

Optik sistemler, fotonlardan gelen bilgiyi sinyallere dönüştüren biyosensörlerdir (Borisov and Wolfbeis, 2008). Bu sistemlerde görünür veya ultraviyole ışık tercih edilmektedir. Temel olarak bu biyosensör sistemlerinde, analit ile reseptör arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan absorpsiyon, floresans, kırılma indisi veya ışık saçılımı gibi değişiklikler ölçülür. Sinyallerin alınması hedef analit konsantrasyonlarıyla ilişkilidir (Garzón et al., 2019). Etiketli ve etiketsiz olarak iki tip optik biyosensör sistemi vardır. Hedef analit ile etkileşime giren biyoreseptör molekülünün kendine özgü özelliği nedeniyle optik özelliklerde meydana gelen bir değişiktir ve bu tip biyosensör sistemi, etiketsiz olarak adlandırılmaktadır. Diğer tür sistemde ise optik değişimi izlemek amacıyla biyomoleküller optik özellik taşıyan problemlerle kovalent olarak etiketlenmektedir (Borisov and Wolfbeis, 2008). Bu sistem etiket bazlı olarak bilinmekte ve etiketleme için ek bir adım içermektedir. Bu nedenle etiketsiz sistemlerin etiket tabanlı sistemlere göre daha ucuz ve daha basit olduğu bilinmektedir (Fan et al., 2008). Her iki tip optik biyosensör de hızlı sonuçları ve taşınabilirliklerinin yanı sıra özgüllükleri ve stabiliteleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Harshita et al., 2023). Optik biyosensör sistemleri, sinyal algılama prensiplerine göre tipik olarak kolorimetrik, floresan, kimyasal/biyoluminesans ve dağılım temelli olmak üzere dört sınıfta toplanmaktadır.

Analit ile biyoreseptör arasında oluşan kompleksin absorbands veya yansıyan ışığın yoğunluğundaki değişikliklerin değerlendirildiği optik sistemler, kolorimetrik biyosensörler olarak adlandırılmaktadır. Renk değişimine dayalı bu sistemlerde altın, manyetik, gümüş ve karbon nanotüpler gibi nanopartiküller yaygın olarak kullanılmaktadır. Renk değişimi çıplak gözle bile tespit edilebildiği için, bu sistemlerde karmaşık ve pahalı biyolojik tespit araçlarına gerek yoktur (Y. Song et al., 2011). Son yapılan çalışmalarda, renk değişimleri akıllı telefonlar ile analiz edilmektedir. Ucuz, basit, pratik özellikleri nedeniyle diğer yöntemlere kıyasla kolorimetrik sistemler avantajlıdır.

Uyarılma nedeniyle hedef numuneden yayılan ışığın tespit edilme prensibine dayanan optik sistemler, floresans bazlı biyosensörler olarak adlandırılmaktadır. Floresans nanoparçacık, kuantum noktaları (QDs), florofor gibi floresans özelliklerine sahip parçacıklar bu sistemlerde kullanılmaktadır (Hanoglu et al., 2024). Bu sistemde floresans bazlı nanopartiküller sadece biyoyumlu olmakla kalmayıp aynı zamanda iyi bir fotostabiliteye de sahiptir. Ayrıca hedefe spesifik olarak bağlanarak, bağlanma sonucu malzemelerin optik özelliklerinde değişikliğe neden olurlar.

Optik biyosensör sistemlerinden biri olan lüminesans temelli sistemlerde analit ile biyoreseptör arasındaki reaksiyon sonucu oluşan dar bant ışık emisyonunu ölçülmektedir. Bu reaksiyonlar zamana bağımlı olmakla birlikte, hızlı ölçüm gerektirmektedir. Bu nedenle diğer sistemler ile kıyaslandığında ölçüm biraz daha zordur (E. McCracken and Yoon, 2016).

Analit ile biyoreseptör arasında meydana gelen biyolojik reaksiyonlar sonucu meydana gelen ısı değişiminin izlendiği optik biyosensör sistemleri, kalorimetrik temelli olarak adlandırılır. Bu ısı değişimi meydana gelen reaksiyon ve reaksiyona giren malzemelerin yapısal özellikleri hakkında bilgiler sağlamaktadır. Bu sistemlerdeki temel zorluk ısıнын ölçülmesinde yaşanan zorluklardır (Das et al., 2022).

1.7.3. Biyosensör sistemlerinin modifikasyonu

1.7.3.1. Manyetik boncuklar (MB)

Manyetik boncuklar (MB'ler), nükleik asitlerin, proteinlerin ve diğer biyomakromoleküllerin, bunların komplekslerinin ve hücrelerinin ayrılmasında çok yönlü araçlardır. Manyetik ayırma, geleneksel manyetik olmayan yöntemlere göre pek çok avantajları vardır. Bu yöntem, hücrelerin, hücre organellerinin yanı sıra nükleik asitler ve proteinler gibi spesifik biyomoleküllerin verimli bir şekilde ayrılması için kullanır (Hourfar et al., 2005). Süperparamanyetik parçacıklar güçlü bir manyetik alan altında manyetik hale gelirken, manyetik alandan çıkarıldığında birbirleriyle etkileşime girmezler. Parçacıkların çapı genellikle 0,5 ila 10 µm arasındadır. Hidrofilik yüzeylere sahip tek dağılımlı küresel parçacıklar, tekrarlanabilir manyetik ayırma sağlayan nükleik asitler için özellikle uygundur. MB'ler çeşitli şekillerde hazırlanabilir. Genellikle demir oksit gibi manyetizmaya duyarlı parçacıklar biyolojik veya sentetik polimerlerle kaplanır (Paleček and Fojta, 2007).

1.7.3.2. Manyetik nanoparçacık (MNP)

Biyosensör sistemlerinin tasarımında kullanılan kritik nanomateryallerden biri MNP'lerdir. Demir, kobalt, nikel gibi saf metallere veya bunların metal oksitlerinden ve ayrıca metal ve polimer karışımlarından 1 ila 100 nm arasında büyük ölçekte hazırlanabilmektedirler. Çekirdek ve kabuk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Manyetik özellikler çekirdek kısım ile ilgili iken, biyomolekül tanıma, bağlanma ve katalitik işlemler çekirdek kısımla ilişkilidir (Katz, 2019). Küçük parçacık boyutları ve geniş yüzey alanı/hacim oranı MNP'lerin en belirgin özellikleridir. Dahası MNP'lerin sentezlenmesi kolaydır ve kabuk parçalarının üretimi sırasında istenildiği gibi işlevselleştirilebilirler. MNP'ler yüksek sıcaklıklarda süperparamanyetik özellikler sergilemektedir. Süperparamanyetizma, net manyetik dipoller sıfır olduğunda ortaya çıkmaktadır. Belirli bir sıcaklığın üzerinde bir elektromanyetik

alan uygulandığında bir dipol indüklenir ve bu durum manyetik momentlerin hizalanmasına neden olur. Ancak bu alan kaldırıldığında manyetik momentler yeniden rastgele hale gelir. Yapıların kristallliği ve boyutu, malzemenin türü ve spin sayısı süperparamanyetizmayı belirler (Mohammed et al., 2017; Rocha-Santos, 2014). Ek olarak MNP'ler, manyetik alan altında malzemenin entropisindeki değişimin neden olduğu adyabatik sıcaklık değişimi olarak tanımlanan manyetokalorik bir etkiye sahiptir (Mozharivskyj, 2016). Bu ayrıcalıklı özellikleri sayesinde MNP'lerin geniş bir uygulama alanı söz konusudur.

1.7.3.3. Altın nanoparçacık (AuNP)

AuNP, 10–50 nm çapında sentezlenebilen şarap kırmızısı renkte en kararlı nanoparçacıklar arasındadır. AuNP'lerin kırmızı renkte olması, görünür bölgede bulunan bir dalga boyu ile nanopartiküller (~13 nm) uyarıldıklarında, bu ışık (yeşil ışığa karşılık gelen) nanoparçacık ile absorbe edilmesinin ardından yüzeyde bulunan elektronlardan birinin salınımının indüklenmesi ve 520 nm'de bir absorpsiyon bandı meydana gelmesi ile açıklanabilir (Sardar et al., 2009). Nanoparçacıkların boyutu arttıkça, bu absorpsiyon bandı kaymaya ve genişlemeye başlar, ayrıca renk kırmızıda mora kaymaktadır. AuNP'lerin birçok avantajlı özelliği vardır. Bu özellikler basit şekilde sentezlenebilme, sentez aşamasında boyut ve şekil özelliklerinin ayarlanabilmesi, iyi optoelektronik özellikler, yüksek yüzey/hacim oranı, kolay modifikasyon ile fonksiyonel hale getirilmesi olarak sıralanabilir (Sztandera et al., 2019).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Materyaller

Altın (III) klorit hidrat (HAuCl_4), poli (etilen glikol) 2- merkaptto etil eter asetik asit (Mn 5000) (SH-PEG-COOH), demir (2) klorür, demir (3) klorür, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC), N-hidroksisüksinimit (NHS), bovin serum albumin (BSA), tetraetil ortosilikat (TEOS), (3-Aminopropil) trietoksisilan (APTES), 2-(N-Morfolin) etansülfonik asit hidrat (MES), potasyum klorür, potasyum hekza siyanoferrat (3), sodyum klorür, sodyum hidrojen fosfat, potasyum klorür, dipotasyum hidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat magnezyum klorür, amonyum sülfat, amonyum hidroksit, human serum Sigma Aldrich (Almanya) firmasından, Whatman filtre kağıtları (Grade 41(20–25 μm), Grade 1 (11 μm)) ve poli(sodyum 4-stirensülfonat) (PSS) Alfa Aesar'den satın alındı. 5- metilsitozin antikoru (5-mC Ab) Karyon Biyoteknoloji (New York)'den, Cobas® cfDNA Örnek Hazırlama Kiti La Roche Ltd (Basel, İsviçre)'dan, The OneStep qMethyl-PCR Kit (D5311 ve D5310) Zymo Research (Kaliforniya)'dan, C MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Fluorometrik) EpiGentek Group'dan temin edildi. Streptavidin uçlu manyetik boncuklar Bangs Laboratories Inc., miRNeasy Mini Kit, miScript II RT Kit, miScript SYBR Green PCR kit ise Qiagen (Almanya), miR221-222 primerleri Sentebiogen firmasından temin edildi.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler PalmSens4 potentiostat (Palm Instruments, Houten, Netherlands) cihazında gerçekleştirildi. Bu cihazın bilgisayar ara yüzü olarak PStace 5.9 programı kullanıldı. Yüzey baskılı karbon elektrotlar (Screen Printed Carbon Electrode; SPCE) çalışma elektrodu olarak karbon, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin kaplı olacak şekilde (DropSens- DRP-150) Metrohm (Herisau, İsviçre) şirketinden temin edildi.

Neodyum mıknatıslar, 4,0 mm çapında olacak şekilde Megahand Bilgi Teknolojileri (Menemen, İzmir)'den satın alındı.

Metillenmiş DNA analizi için geliştirilen biyosensör sisteminde elektrokimyasal ölçümler için iki farklı elektrokimyasal hücre sistemi kullanıldı. Bu hücrelerden ilki 0,01 M PBS tamponu (pH 7,4) içerisinde 1,0 M KCl ve 50 mM $[K_3Fe(CN)_6]$, ikincisi ise PNA probleminin Fc ucunun olması nedeniyle 1,0 M KCl, 1X PBS tamponu içeren elektrokimyasal hücredir. DPV ölçümleri -0,4 V ile + 0,8 V potansiyel aralığında; CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında -0,4 V ile +0,8 V potansiyel aralığında, impedans ölçümleri ise 0,18 V'da 0,02 Hz-10 Hz akım aralığında gerçekleştirildi.

miRNA 221 ve 222 analizi için geliştirilen biyosensör sisteminde elektrokimyasal ölçümler içinde Meldola's blue içeren TBS tamponu (20 mM Tris-HCl ve 20 mM NaCl, pH 7,0) kullanıldı. SWV ölçümleri 0,10 ile -0,40 V potansiyel aralığında, 25 mV amplitude ve 12 Hz'de 4 mV step potansiyelde gerçekleştirildi. CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında -0,6 V ile +0,8 V potansiyel aralığında, impedans ölçümleri ise 0,18 V'da 0,02 Hz-10 Hz akım aralığında gerçekleştirildi.

Karakterizasyon çalışmalarında boyut ve yüzey yükü ölçüm cihazı Dynamic Light Scattering (DLS)- Malvern Nano ZS cihazı ve Thermo Fischer Scientific Apreo S LoVac model (Oregon, USA) taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscopy (SEM)) kullanıldı. Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı İleri Teknolojik Malzeme Üretim ve Karakterizasyon Lab. biriminde "Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM) (Lake Shore, Model 7407) M-H Ölçümleri yapıldı. PNA probu ile hedef mSEPT9 fragmentleri arasındaki hibridizasyonun doğrulanması amacı ile, Malvern MicroCal PEAQ-ITC (Malvern, United Kingdom) cihazı kullanıldı. Hasta serum örneklerindeki metillenmiş DNA ve miRNA miktarının belirlenmesi amacıyla Bio-Rad, CFX Connect Real time system (Hercules, Kaliforniya, ABD) cihazı kullanıldı. Ayrıca karakterizasyon çalışmalarında Thermo Fisher Scientific NanoDrop ONE kullanıldı.

2.3. Hasta Örneklerin Toplanması ve Etik Kurul

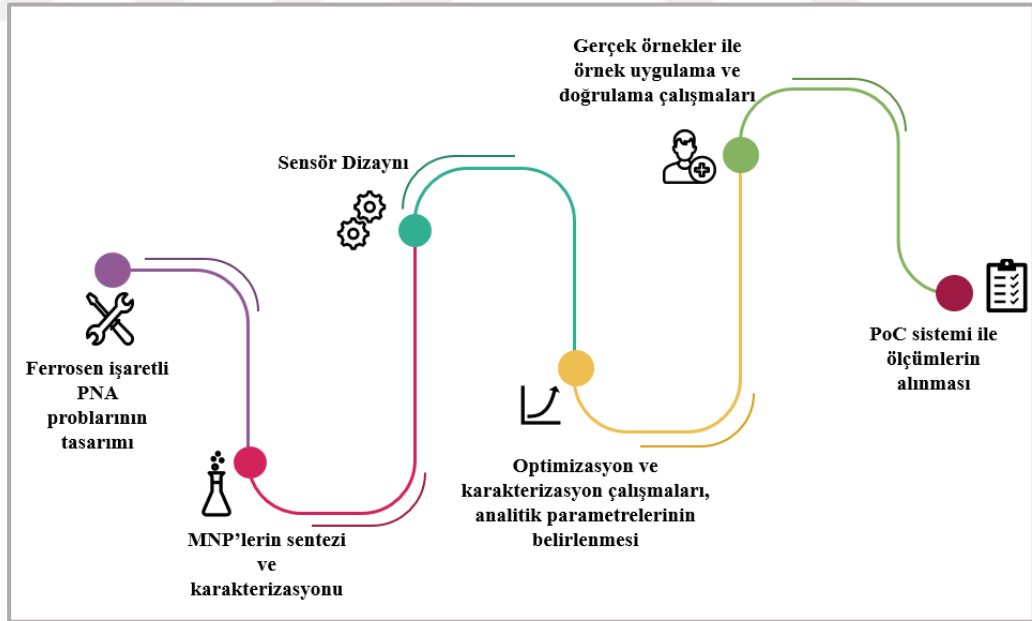
Çalışmalarda kullanılmak üzere hasta kan örnekleri toplandı. Bu kapsamda Yeditepe Üniversitesi, Medikal Biyoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Soner Doğan ile yapılan iş birliği sonucunda 10 kolon kanseri hastasından kan örneği toplandı. Kan örnekleri, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi klinik araştırma etik kurulu tarafından (no: 2020/351) verilen izin ile toplandı.

2.4. Bölüm-1: “Metillenmiş DNA’ların Analizine Yönelik PNA

Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

2.4.1. Metot

Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan elektrokimyasal biyosensör sistemi için izlenen adımlar Şekil 2.1’de özetlendi.



Şekil 2. 1. Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan elektrokimyasal biyosensör sistemi için izlenen adımlar.

2.4.2. Ferrosen işaretli PNA (Fc-PNA) problemlerinin ve mSEPT9 fragmentlerinin tasarımı

PNA problemlerinin tasarımı Prof. Dr. Serap EVRAN ve grubu tarafından gerçekleştirildi. Wasserkort et al. (2013) tarafından yapılan çalışma referans alındı. SEPT9 geninin CGI3 merkezinde lokalize Amplikon 5 (amp5) bölgesine ait nükleotid dizilimi UCSC Genome Browser web sayfasından (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) elde edildi.

chr17:77,369,420..77,369,648 pozisyonları arasındaki arama sonucunda aşağıdaki dizi elde edildi.

SEPT9 amp5 bölgesinin nükleotid dizilimi:

AGAAACGCACCATGGTTTGGATGCTGAGGGTGAGGGAAAGAGAGG
AGTCAACAGTGGTGCCCGGAGACTTGGCTTGAGCAACTAGGTGGAT
GGTAGCACCGTTTCCTAAGATGAGGGGCTGTGGGAAGTTGAGGGGC
TGTGAAGGCTCTGCCACTGACGGACCCAGGGCTCGGCAGCTCTGGG
AGGCCTACTTTGTGTCAGGCCACGCAGAGATAAGACCATCTGGGC

Bu dizi ve dizi içinde metilasyona uğrayabilecek sitozinlerin pozisyonları dikkate alınarak, biyosensör çalışmalarında kullanılacak hedef fragment aşağıdaki dizi olarak belirlendi. Metilasyon için hedef olabilecek bölgeler sarı renk ile işaretlendi.

Hedef fragment:

TGGGAAGTTGAGGGGCTGTGAAGGCTCTGCCACTGACGGACCCAGGGCTCGGCAGCTCTG

Hedef fragmentin TGGGAAGTTGAGGGG bölgesine komplementer PNA dizisi aşağıdaki şekilde tasarlandı.

Hedef fragmente komplementer peptid nükleik asit (PNA) dizisi:

CCCCTCAAGTTCCCA- NH₂

Amplikon 5 bölgesinden belirlenen ve %0, %25, %50, %75 ve %100 metilasyon düzeyine sahip hedef mSEPT9 fragmentleri yurtdışından temin edildi. Metillenmiş fragmentlerin dizileri aşağıda sunuldu. Metilasyon pozisyonları sarı renk ile işaretlenmiştir.

%100 metilasyon (8 pozisyon metillenmiş)

TGGGAACCTTGAGGGGmCTGTGAAGGCTmCTGCCAmCTGAmCmCGGAC
CmCAGGGCTmCmCGGmCAGCTmCTG

%75 metilasyon (6 pozisyon metillenmiş)

TGGGAACCTTGAGGGGmCTGTGAAGGCTmCTGCCAmCTGAmCmCGGAC
CCAGGGCTmCmCGGCAGCTmCTG

%50 metilasyon (4 pozisyon metillenmiş)

TGGGAACCTTGAGGGGCTGTGAAGGCTCTGCCAmCTGAmCmCGGACCCA
GGGCTmCmCGGCAGCTmCTG

%25 metilasyon (2 pozisyon metillenmiş)

TGGGAACCTTGAGGGGCTGTGAAGGCTCTGCCACTGACGGACCCAGG
GCTmCmCGGCAGCTmCTG

%0 metilasyon

TGGGAACCTTGAGGGGCTGTGAAGGCTCTGCCACTGACGGACCCAGG
GCTCGGCAGCTCTG

2.4.3. İzotermal titrasyon kalorimetresi

İzotermal titrasyon kalorimetresi (ITC) sitokiyometri, denge sabiti, standart molar Gibbs enerjisi (ΔG) ve standart molar entalpi değişimi (ΔH) gibi termodinamik parametrelerin doğrudan ölçümü için, etkileşim sırasında açığa çıkan veya alınan ısıнын belirlenmesine dayanan en hassas yöntemlerden biridir

(M. Li et al., 2010). ITC, biyomolekülerin etkileşimlerinin karakterizasyonu için tercih edilen bir metottur (Qi et al., 2021; Slavkovic and Johnson, 2018).

PNA ile metillenmiş DNA yapılarının etkileşimlerinin incelenmesi için, 25°C, referans power 10 μ cal/s, 750 rpm karıştırma hızı ve spacing time 150 s parametreleri kullanıldı. Ölçüm hücresinin hacmi 300 μ L, şırınga hacmi ise 40 μ L olarak belirlendi. Ölçümler, metillenmiş DNA örnek hücresinde, PNA ise şırıngada yer alacak şekilde gerçekleştirildi. Titrasyon sırasında açığa çıkan enerjinin (reaksiyonun ekzotermik oluşundan) referans hücre ile kıyaslanması prensibi ile ölçüm gerçekleştirildi. Ölçümlerde konsantrasyon optimizasyonu için örnek hücresi ve şırıngada farklı konsantrasyonlar ile denemeler yapıldı. Gerekli optimizasyonlar sonrasında 50 μ M PNA konsantrasyonuna karşı 5,0 μ M metillenmiş DNA konsantrasyonu optimum olarak belirlendi. Ölçümler 'one binding site' modeli kullanılarak gerçekleştirildi.

2.4.4. MNP sentezi

Süper paramanyetik nanopartiküller elde etmek için literatürde yer alan birlikte çöktürme yöntemi (Petcharoen and Sirivat, 2012) modifiye edilerek kullanıldı. Yöntem kısaca, 100 mL 2,0 M FeCl_3 ve 1,0 M FeCl_2 azot gazı altında 2300 rpm'de hızla karıştırılarak 80°C'de hazırlandı. Ardından çözeltiye damla damla 10 mL, ağırlıkça %25 NH_4OH ilave edildi ve 30 dakika bekletildi. Siyah MNP çöktürmeleri birkaç defa su ve etanol ile yıkandı. Son olarak, MNP'ler 6 saat 80°C'de kurutuldu ve oda sıcaklığında, karanlıkta ve nemsiz ortamda depolandı.

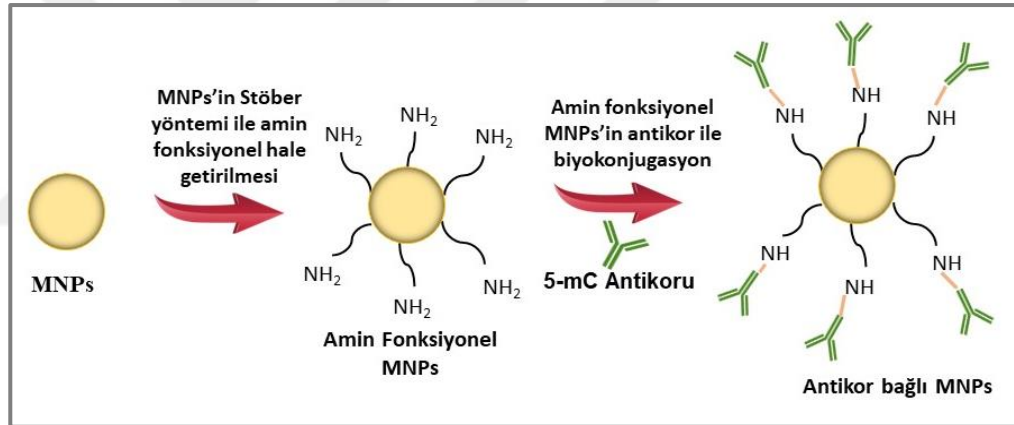
2.4.5. MNP'lerin fonksiyonelleştirilmesi

Sentezlenen MNP yüzeyleri Stöber yöntemi kullanılarak amino-fonksiyonel hale getirildi (Stöber et al., 1968). Kısaca; 300 mg MNP üzerine, 80 mL etanol/20 mL su ve 2,5 mL amonyak çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika boyunca sonik banyoda bekletildi. Ardından, 5,0 mL TEOS çözeltiye eklendi ve 40°C'de 4 saat inkübe edildi. Reaksiyona girmemiş TEOS birkaç defa metanol ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Son olarak amino fonksiyonel yüzey elde etmek için, silika kaplı MNP ler 100 mL metanol ve 5,0 mL APTES çözeltisi ile

15 dakika boyunca sonik banyoda bekletildi ve 60°C'de 6 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyona girmemiş bileşikler ve fazla APTES metanol ve su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. H₂N-MNP'ler, oda sıcaklığında, nemsiz ortamda depolandı. Elde edilen, MNP'lerin boyut analizleri ve yüzey zeta potansiyelleri belirlendi. Ek olarak MNP'lerin manyetik özellikleri VSM ölçümleri ile belirlenirken, yüzey karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirildi.

2.4.6. 5-mC Ab ile MNP'lerin konjugasyonu

H₂N-MNP'ler, metillenmiş DNA'lara seçimli olan 5-mC Ab ile konjuge edildi (Şekil 2.2). Bu modifikasyon MNP'lerin amino grubu ile antikorun karboksil grubu arasında EDC ve NHS ajanları kullanılarak, EDC/NHS metodu ile gerçekleştirildi (Singh and Krishnan, 2014).



Şekil 2. 2. MNP'lerin yüzeyine 5-mC antikorun konjugasyonu.

Bu amaçla, 10 mg EDC ve 1,7 mg NHS, 150 mL MES tamponu (0,1 M; pH 6,0) içinde 0,5 mg H₂N-MNP ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 1000 rpm, 10 dakika inkübe edildi. MNP'ler bir mıknatısla toplandı, iki kez saf su ile yıkandı ve 250 mL PBS tamponu (0,01 M; pH 7,4) içinde yeniden süspanse edildi. Daha sonra, toplam hacim 300 µL ve son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde 5-mC Ab, 50 mL MNP çözeltisi bulunduran PBS tamponu içerisinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 2 saat, 1000 rpm de inkübe edildi. Elde edilen MNP-5-mC Ab konjugatları bir mıknatısla toplandı. Bağlanmadan ortamda kalan antikorların uzaklaştırılması amacıyla iki kez PBS tamponunda hazırlanan %1,0'lik BSA solüsyonu ile yıkandı ve son olarak aynı solüsyondan

100 mL'de yeniden süspanse edildi. Tüm MNP-5-mC Ab konjugatları, her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı. Yüzey karakterizasyonu için SEM görüntüleme, zeta potansiyel ve boyut analizi gerçekleştirildi.

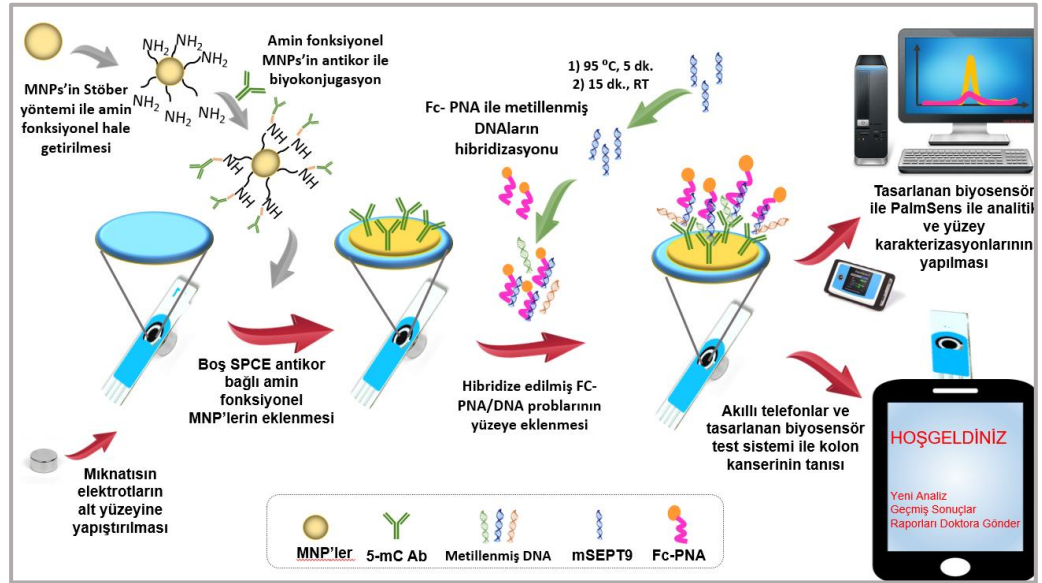
2.4.7. Elektrokimyasal biyosensör platformunun dizaynı

SPCE elektrotların çalışma elektrodu arkasına gelecek şekilde mıknatıslar yerleştirildi ve elektrot yüzeyine MNP-5-mC Ab konjugatından 10 µL damlatıldı. Kurutulduktan sonra, elektrokimyasal ölçümler 1,0 M KCl ve 50 mM $[K_3Fe(CN)_6]$ içeren elektrokimyasal hücre içerisinde ölçümler gerçekleştirildi. Ardından, yüzeye dışarıda hibridize edilmiş olan mSEPT9/ Fc- PNA solüsyonundan 5,0 µL eklendi ve oda sıcaklığında, 1 saat inkübasyonun ardından elektrokimyasal ölçümler, 1,0 M KCl ve 1X PBS içeren elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleştirildi.

mSEPT9/ Fc-PNA prob hibridizasyonu:

mSEPT9 fragmentleri PNA ile hibridize edilmeden önce daha etkili bağlanma sağlanması amacıyla katlama prosedürü gerçekleştirildi. İzlenen katlama prosedürü şu şekildedir; 1X PBS içerisinde 20 nM olarak hazırlanmış olan mSEPT9'lar öncelikle, 95 °C'de 5 dk., ardından 15-20 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

Katlanmış olan farklı metilasyon (%0; %25; %50; %75, %100) özelliğine sahip olan SEPT9 fragmentlerinin son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde üzerine hibridizasyon tamponu (1X PBS içerisinde 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 1,0 M NaCl, 20 mM $MgCl_2$) eklendi (Y. Wang et al., 2017). Ardından son konsantrasyonu 0,5 µM olacak şekilde Fc-PNA eklendi (Kongpeth et al., 2016). Hibridizasyonun gerçekleşmesi amacıyla 1 saat, oda sıcaklığında inkübe edildi. Tasarlanan sensör platformu Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2. 3. mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör platformunun tasarım adımları.

2.4.8. Biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonu

Tasarlanan biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla her modifikasyon adımından sonra CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirildi.

2.4.9. Biyosensör sisteminin analitik özellikleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin analitik özelliklerini belirlemek amacıyla elektrot yüzeyine MNP/5-mC Ab konjugatının eklenmesi ve farklı metilasyon yüzdelere sahip SEPT9 (%0; %25; %50; %75, %100) ile Fc-PNA hibridize edildikten sonra uygulanması ardından DPV ölçümleri gerçekleştirildi. Meydana gelen akım farklanmasından yola çıkılarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Teşhis sınırı (limit of detection, LOD) için, doğrusal tayin aralığında bulunan konsantrasyon için 3 tekrarlı ölçümler DPV tekniği ile alındı. LOD değeri $((3 \cdot S.H.)/m)$ formülü ile hesaplandı. Tekrarlanabilirlik için, doğrusal tayin aralığının orta noktası seçildi ve farklı elektrotlarda ölçümler alındı. Ayrıca varyasyon katsayısı (% cv) hesaplandı.

2.4.10. Optimizasyon çalışmaları

Biyosensör sisteminin tasarım aşamasında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları şu şekildedir;

1. 5-mC Ab derişiminin optimizasyonu: Farklı konsantrasyonlarda (1,0; 5,0; 10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$) 5-mC Ab ile MNP konjugasyonu gerçekleştirildi. Her bir farklı konjugat yüzeyine %50 mSEPT9-PNA eklenerek DPV ölçümleri gerçekleştirildi.
2. MNP-5-mC Ab ile mSEPT9-PNA'nın inkübasyon süresi: Yüzeye mSEPT9-PNA eklendikten sonra 30., 45., 60. ve 75. dk'da ölçümler gerçekleştirildi. 5-mC Ab eklenmesi ile elde edilen akım ile farklı zamanlarda alınan ölçümlerde elde edilen akım, arasındaki fark hesaplandı.
3. PNA ile hibridize edilen mSEPT9 fragmentlerinin de konsantrasyonları: Bu optimizasyon çalışması için 1,0; 5,0; 10 ve 50 nM konsantrasyonlara sahip %100 mSEPT9 fragmentleri, 0,5 μM PNA ile hibridize edildi. MNP-5-mC Ab ile fonksiyonelleştirilmiş elektrot yüzeyine eklenerek DPV ölçümleri alındı.

2.4.11. Girişimci Denemeleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin metillenmiş mSEPT9 seçimliliğinin belirlenmesinin amacıyla,

- Farklı oranlarda metillenmiş (%10-%100) ve metillenmemiş SEPT9 fragmenti
- Zayıf metillenmiş ve %100 metillenmiş SEPT9 fragmenti
- Farklı oranlarda metillenmiş SEPT9 fragmenti ile metillenmiş ve dolaşımda serbest bulunabilecek diğer BCAT, SOX21 gibi fragmentlerinin bulunduğu karışımlar

ile denemelerinin yapılması planlandı.

Bu kapsamda,

1. %0 SEPT9 ile %50 mSEPT9 fragmenti,
2. %25 mSEPT9 ile %100 mSEPT9 fragmentleri,
3. BCAT ile SOX21 fragmentlerinin karışımı

Fc- PNA ile hibridize edildi ve ölçümler gerçekleştirildi.

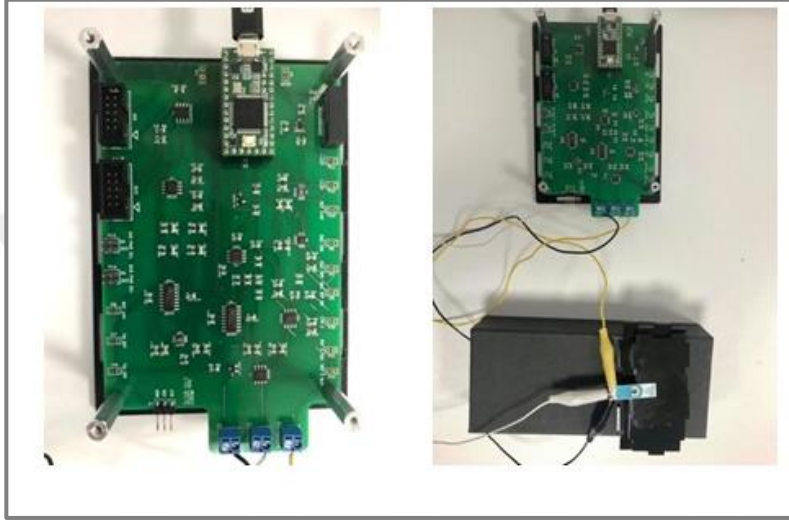
2.4.12. Örnek uygulama çalışmaları

Tasarlanan biyosensörün hasta örneklerinde çalışabilirliğinin belirlenmesi amacıyla ticari olarak temin edilmiş human serum içerisine standart katma yöntemi ile mSEPT9 fragmentleri eklendi. DPV tekniği ile ölçümler gerçekleştirildi.

Ek olarak kolon kanseri tedavisi gören hastalardan toplanan plazma örnekleri ile biyosensör sisteminin gerçek örneklerde çalışabilirliği test edildi. Bu amaçla öncelikle kan örneklerinden cfDNA yapıları izole edildi. Bu amaçla Roche, Cobas® cfDNA Örnek Hazırlama Kiti kullanıldı ve izolasyon için kitin içerisinde yazan prosedür takip edildi. Kısaca, plazma örnekleri içerisine 250 µL proteinaz K ve 2,0 mL PBB tamponu eklendi. 30 dk inkübasyonun ardından 500 µL izopropanol alkol eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan çözelti, HPEA filtreli ependorfa aktararak 3850 rcf'de 5 dk., 2 kez santrifüjlendi. Tüm plazmanın filtreden geçtiğine emin olunduktan sonra, filtre yıkama ependorfuna aktararak 500 µL yıkama tamponu-1 eklendi. 10000 rcf'de 1 dk. santrifüjün ardından yeni bir yıkama ependorfuna filtre aktararak 500 µL yıkama tamponu-2 eklendi. 10000 rcf'de 1 dk. santrifüjün ardından, filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 11000 rcf'de 3 dk. santrifüj işleminden sonra, filtre yeni bir ependorfa aktararak üzerine 100 µL DNA EB çözeltisinden eklendi. 5 dk. oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 8000 rcf'de 1 dk. santrifüjlendi. Ependorfta kalan çözelti izole cfDNA'dır. Elde edilen cfDNA'ların nanodropta ölçümleri gerçekleştirildi.

2.4.13. PoC sistemine biyosensörün entegrasyonu

Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla akıllı telefon ile entegre edilebilecek olan PoC olarak bilinen bir ev yapımı potansiyotat geliştirildi (Şekil 2.4). Elektrot modifikasyonu için gerçekleştirilen tüm adımların CV ölçümleri, PoC cihazı ile de gerçekleştirildi ve diğer sonuçlar ile kıyaslandı.



Şekil 2. 4. Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlanan PoC cihazı.

2.4.14. Doğrulama Çalışmaları

Hasta plazma örneklerinden izole edilen cfDNA'larda metillenmiş DNA miktarının analizi için RT-PCR kullanıldı. PCR için OneStep qMethyl-PCR Kiti (D5311 and D5310) kullanıldı. Kit içerisindeki protokol uygulanmıştır. Oluşturulan reaksiyon karışımı Tablo 2.1'de verildi.

Tablo 2. 1. Metillenmiş DNA analizi için RT-PCR reaksiyon içeriği

	Hacim
Test reaksiyon Premix	10 μ L
10 μ M MGMT Primer I ve II	2,0 μ L
DNase/RNase free su	Son hacime göre ayarlandı
DNA örneği (20 ng)	Konsantrasyona göre ayarlandı

TOPLAM	20 µL
Kabarcık oluşumunu engellemek için plate karıştırıldı ve plate'in üstü kapatıldı. Sırasıyla eksitasyon ve emisyon dalga boyları 465 ve 510 nm'e ayarlandı. Cihaz parametreleri Tablo 2.2'de verildi.	

Tablo 2. 2. RT-PCR prosedürü için parametreler.

	SICAKLIK	SÜRE
MSRE Digestion	37 °C	2 saat
Başlangıç Denatürasyon	95 °C	10 dk.
Denatürasyon	95 °C	30 dk
Annealing	54 °C	60 dk
Extension	72 °C	60 dk
Final extension	72 °C	7 dk
Hold	4 °C	>5 dk

40-45 döngü

% metilasyon değeri aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\% \text{ Metilasyon} = 100 \times 2^{-\text{Act}}$$

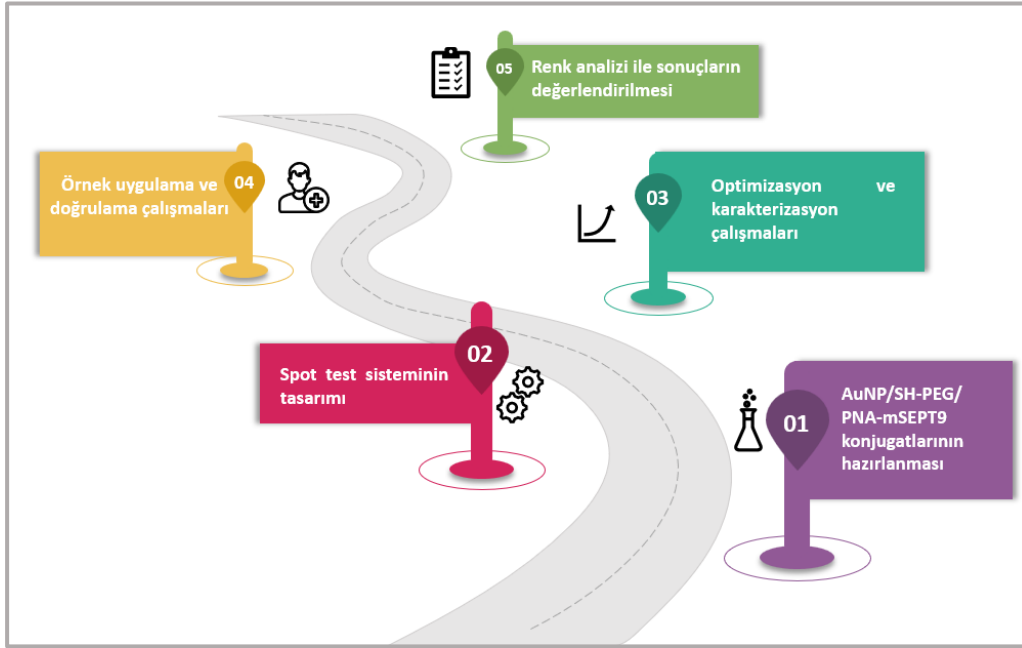
Act = Test reaksiyon ortalama Ct değeri- Referans Reaksiyon ortalama Ct değeri

Validasyon için, MethylDetect SEPT9 kit ve kantitatif analiz için MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit kullanıldı.

2.5. Bölüm-2: “Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik PNA Temelli Optik Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

2.5.1. Metot

Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan optik biyosensör sistemi için izlenen adımlar Şekil 2.5’de özetlendi.



Şekil 2. 5. Septin 9 metillenmiş DNA tespiti için tasarlanmış olan optik biyosensör sistemi için izlenen adımlar.

2.5.2. PNA proplarının ve mSEPT9 fragmentlerinin tasarımı

Elektrokimyasal biyosensör sistemi için tasarlanan farklı metilasyon düzeylerine sahip mSEPT fragmentleri, bu biyosensör sistemi içinde kullanıldı. Benzer şekilde elektrokimyasal biyosensör sistemi için tasarlanan Fc-PNA ile aynı diziyeye sahip, ferrosen işaretli olmayan amino fonksiyonel uçlu PNA (PNA-NH₂) dizisi sentezlendi ve kullanıldı.

2.5.3. AuNP sentezi

Altın nanoparçacıkların sentezi için Hosu ve çalışma arkadaşlarının prosedürü kullanıldı (Hosu et al., 2017). Kısaca, 0,25 mM, 50 mL HAuCl₄ çözeltisi hazırlandı. Kaynayana kadar ısıtıldı ve kaynama başlayınca %1,0'lik (w/v) sodyum sitrat çözeltisinden 1,75 mL eklendi. Isı kapatılarak, karıştırılmaya devam edildi. Renk sarıdan kırmızıya dönmesi beklendikten sonra, çözelti oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sentezlenen AuNP'nin karakterizasyonu için absorpsiyon ve boyut ölçümleri gerçekleştirildi.

2.5.4. AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatı

Spot test prosedüründe renk gözlemlenebilmesi adına, sentezlenen AuNP'ler deriştirildi. Bunun için öncelikle 4 mL AuNP, 4500 rpm'de 20 dk, +4 °C'de santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldı.

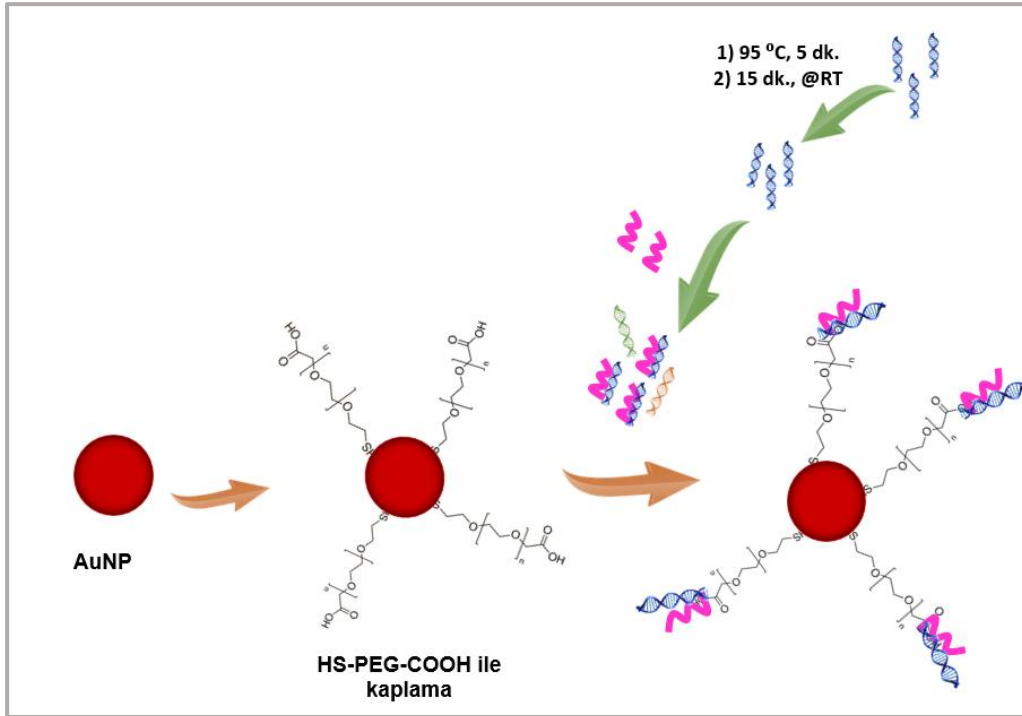
AuNP/SH-PEG-COOH konjugatı için altta kalan AuNP pelleti 200 µL, 10 µM SH-PEG-COOH çözeltisi içerisinde çözüldü ve gece boyu 600 rpm, 37 °C'de inkübe edildi. Bağlanmadan kalan SH-PEG-COOH'i uzaklaştırmak amacıyla 11000 rpm'de, 20 dk, +4 °C'de santrifüj yapıldı. Üst faz uzaklaştırıldı. Pellet, 48 mM EDC ve 12 mM NHS, 200 µL 0,01 M MES tamponu (pH 6,0) içerisinde tekrar çözüldü. Karboksil gruplarının aktifleşmesi amacıyla 20 dk. 600 rpm, 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 11000 rpm'de, 20 dk, +4 °C'de santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldı ve altta kalan pellet 1X PBS (pH 7,4)'de çözüldü. AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatı için, hibriditize edilmiş NH-PNA/mSEPT9 içerisine, 3 µL AuNP/ SH-PEG-COOH konjugatı eklendi ve 2 saat, 600 rpm, 25 °C'de inkübe edildi. AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatı her kullanımdan önce taze hazırlandı (Şekil 2.6).

mSEPT9/ HN-PNA prob hibridizasyonu:

mSEPT9 fragmentleri PNA ile hibridize edilmeden önce daha etkili bağlanma sağlanması amacıyla katlama prosedürü gerçekleştirildi. İzlenen katlama prosedürü şu şekildedir; 1X PBS içerisinde 20 nM olarak hazırlanmış

olan mSEPT9'lar öncelikle, 95 °C'de 5 dk., ardından 15-20 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

Katlanmış olan farklı metilasyon (%0; %25; %50; %75, %100) özelliğine sahip olan mSEPT9 fragmentlerinin son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde üzerine hibridizasyon tamponu (1X PBS içerisinde 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 1M NaCl, 20 mM MgCl₂) eklendi (Y. Wang et al., 2017). Ardından son konsantrasyonu 1,0 µM olacak şekilde PNA eklendi (Kongpeth et al., 2016). Hibridizasyonun gerçekleşmesi amacıyla 1 saat, oda sıcaklığında inkübe edildi.



Şekil 2. 6. AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugasyonu.

2.5.5. Spot Test Sisteminin Tasarımı

Test sistemi tasarımında Alba-Patiño ve çalışma arkadaşlarının tasarladığı test platformu prosedürü izlendi (Alba-Patiño et al., 2020). Whatman kağıdı (Grade 41) 1 cm kenar uzunluğunda kareler olacak şekilde kesildi. Test platformunun oluşturulmasında alıcı ve rezervuar adı verilen iki farklı kağıt modifiye edildi.

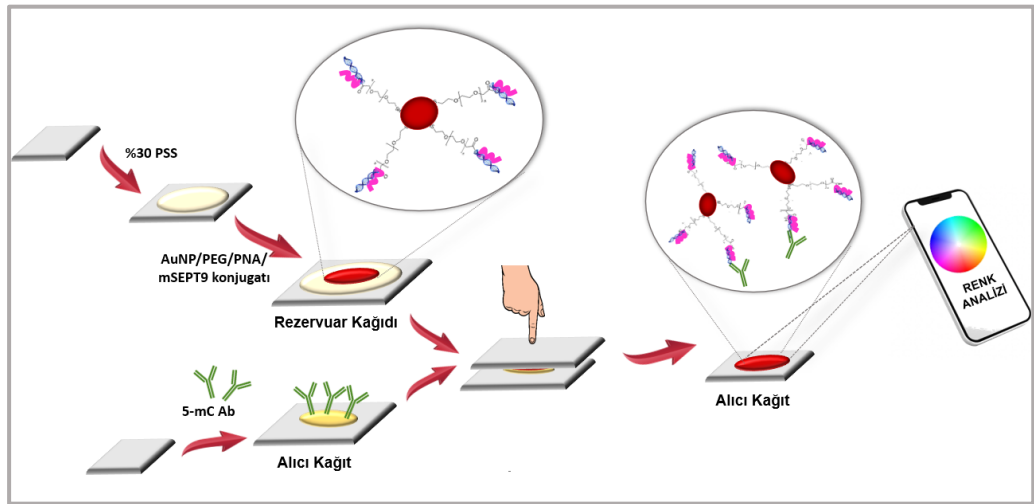
Rezervuar kağıdının modifikasyonu:

Öncelikle rezervuar kağıdı, %30'luk PSS çözeltileri ile ıslatıldı ve kuruması amacıyla 1 saat oda sıcaklığında beklendi. Ardından AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatından 1 μ L damlatıldı ve kuruması için 1 saat, oda sıcaklığında, karanlık ortamda bekletildi.

Alıcı kağıdın modifikasyonu:

Bu kağıt altın konjugatının yüzeye geçişinin yapılacağı ve son ölçümün yapılacağı kağıttır. Kağıt yüzeyi, 2,5 μ L 10 μ g/mL 5-mC Ab ile modifiye edildi ve 1 saat, oda sıcaklığında kurutuldu. Ardından 50 μ L 5 mg/mL PBS-BSA çözeltisi ile ıslatıldı ve rezervuar kağıdının üzerine bastırıldı.

Hazırlanan kısıkaç ile kağıtlar birbirine bastırıldı. Kağıtların kuruması ardından birbirinden ayrıldı. Hazırlanan AuNP konjugatının rezervuar kağıdından, alıcı kağıt üzerine geçişi sonucunda renk analizinin yapılabilmesi için gümüş arttırıcı kit (silver enhancer kit) kullanıldı. Kit içerisinde çıkan A ve B solüsyonu 1:1 oranında hazırlandı. AuNP konjugatının geçişi sonucunda renklenen alıcı kağıda 2,0 μ L uygulandı ve 8 dk. inkübasyonun ardından, kit içerisinde çıkan sodyum tiyosülfonat pentahidrat %2,5'luk olarak hazırlandı ve 2,0 μ L uygulandı. Kurumasının ardından renk analizi için kağıtların fotoğrafları çekildi. Tüm deneysel adımlar Şekil 2.7.'da özetlendi.



Şekil 2. 7. mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan optik biyosensör platformunun tasarım adımları.

2.5.6. Optimizasyon çalışmaları

mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan optik biyosensör platformu için gerçekleştirilen optimizasyon adımları şu şekilde sıralanabilir:

- PEG konsantrasyonu (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10,0 μM)
- Whatman kağıdı türü (Grade 41(20–25 μm), Grade 1 (11 μm))
- PSS konsantrasyonu (%45, %30, %15, %10,0, %5,0 ve %1,0)

2.5.7. Girişimci Denemeleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin mSEPT9 seçimliliğinin belirlenmesinin amacıyla,

1. %0 mSEPT9 ile %50 mSEPT9 fragmenti,
2. %25 mSEPT9 ile %100 mSEPT9 fragmentleri,
3. BCAT ile SOX21 fragmentlerinin karışımı

PNA-NH₂ ile hibridize edilmesinin ardından AuNP/SH-PEG-COOH ile konjuge edildi ve spot test sistemine uygulandı.

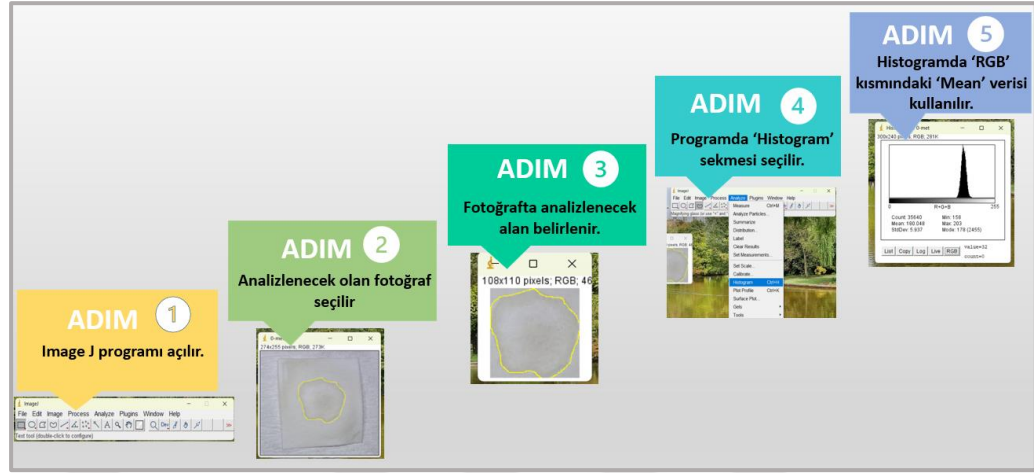
2.5.8. Örnek uygulama çalışmaları

Tasarlanan spot test sistemine, elektrokimyasal biyosensör sisteminde kullanılmak üzere plazma örneklerinden (pozitif n=10 ve kontrol n=10) izole edilmiş cfDNA yapıları kullanıldı. Öncelikle cfDNA ile PNA ve AuNP/SH-PEG-COOH konjugasyonu gerçekleştirildi ve spot test sistemine uygulandı.

2.5.9. Renk analizi

Renk analizi için Image J programı kullanıldı. Tasarlanan test sisteminde rezervuar kağıt ile alıcı kağıt birbirine bastırıldıktan sonra, AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatı alıcı kağıt üzerindeki 5-mC Ab yüzeyine

geçti. Burada meydana gelen renk değişimi analizlendi. Renk analiz için gerçekleştirilen adımlar Şekil 2.8’de özetlendi.



Şekil 2. 8. Image J programı ile yapılan renk analiz adımları.

2.5.10. Fotoğraf çekimi için kutu tasarımı

Tasarlanan biyosensör ile elde edilen sonuçların ışıktan etkilenmemesi adına, fotoğrafların çekilmesi amacıyla bir ev yapımı kutu tasarlandı. Ebatları (10x 10x10 cm) olan karton kutunun içi spreyci boya ile siyaha boyandı. Kutu kapağına led lambalar döşendi. Fotoğraf çekilmesi için kartonun üst kapağının ortasına delik açıldı (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. Elde edilen sonuçların yorumlanması amacıyla fotoğrafların çekilmesi için yapılan ev yapımı kutu.

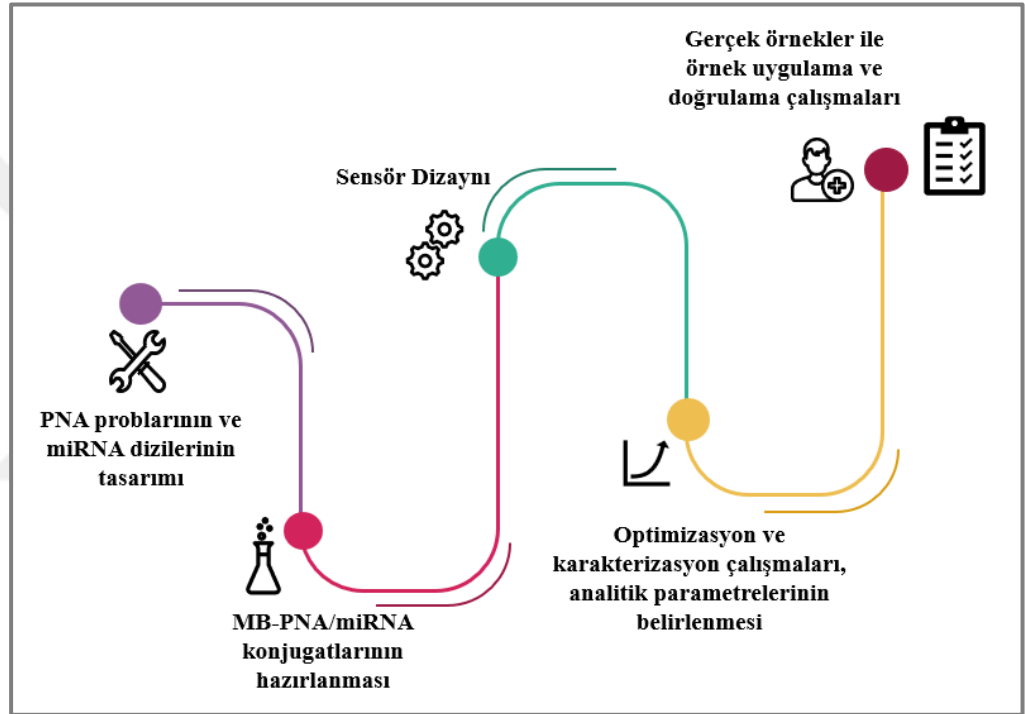
2.5.11. Doğrulama çalışmaları

Optik biyosensör sistemine uygulanan pozitif ve kontrol plazma örneklerindeki mSEPT9 miktarı, elektrokimyasal biyosensör sisteminin doğrulaması için kullanılan fluorimetrik ELISA kiti ve RT-PCR ile gerçekleştirildi.

2.6. Bölüm-3: “miRNA-221 ve 222’nin Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

2.6.1. Metot

miRNA-221/222’nin tespiti için tasarlanmış olan PNA temelli elektrokimyasal biyosensör sistemi için izlenen adımlar Şekil 2.10’da özetlendi.



Şekil 2. 10. miRNA-221/222 tespiti için tasarlanmış olan optik biyosensör sistemi için izlenen adımlar.

2.6.2. miRNA-221/222 dizilerinin ve PNA probleminin tasarımı

PNA probleminin ve miRNA-221/222 oligo dizilerinin tasarımı Prof. Dr. Serap EVRAN ve grubu tarafından gerçekleştirildi. PNA ve miRNA dizileri şu şekildedir;

miR-221-5p: ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU

miR-221-3p: AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC

miR-222-5p: CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU

miR-222-3p: AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

PNA-mir221-5p: 5'-biotin-O-GACCGTAT-NH₂

PNA-miR221-3p: 5'-biotin-O-ACGACCCA-NH₂

PNA-miR222-5p: 5'-biotin-O-GAGTCATC-NH₂

PNA-miR222-3p: 5'-biotin-O-ATGACCCA-NH₂

2.6.3. MB/ PNA konjugasyonu

Elektrokimyasal biyosensör tasarımında kullanılmak üzere temin edilmiş streptavidin fonksiyonel MB'ler ile biyotin uçlu PNA'lar konjuge edildi. Konjugasyon için MB'lerin temin edildiği Bangs Laboratories'in önerdiği prosedür ve Kerman ve arkadaşlarının izlediği prosedür kullanıldı (Kerman et al., 2004). Bu prosedüre göre 100 µL MB üzerine 100 µL TTL tamponu (pH 8,0) (100 mM Tris-HCl, %0,1 Tween 20 ve 1,0 M LiCl) eklendi. Mıknatısla MB'ler toplandı ve üst faz uzaklaştırıldı. Toplanan MB'ler 21 µL TTL tamponu (pH 8,0) eklendi. Son hacim 25 µL olacak şekilde PNA'lar (miR221-5p, miR221-3p, miR222-5p, miR222-3p) eklendi. Bağlanmanın sağlanması amacıyla 15 dk., oda sıcaklığında, hafif karıştırma altında inkübe edildi. Bağlanmayan PNA'ların uzaklaştırılması amacıyla, mıknatıs ile MB/PNA'lar toplandı ve 100 µL TTL tamponu (pH 7,0) (20 mM Tris-HCl, %0,1 Tween 20 ve 0,5 M LiCl) ile yıkandı. Ardından pellet 100 µL hibridizasyon tamponu (20 mM Tris-HCl ve 750 mM NaCl, pH 7,0) içerisinde çözüldü.

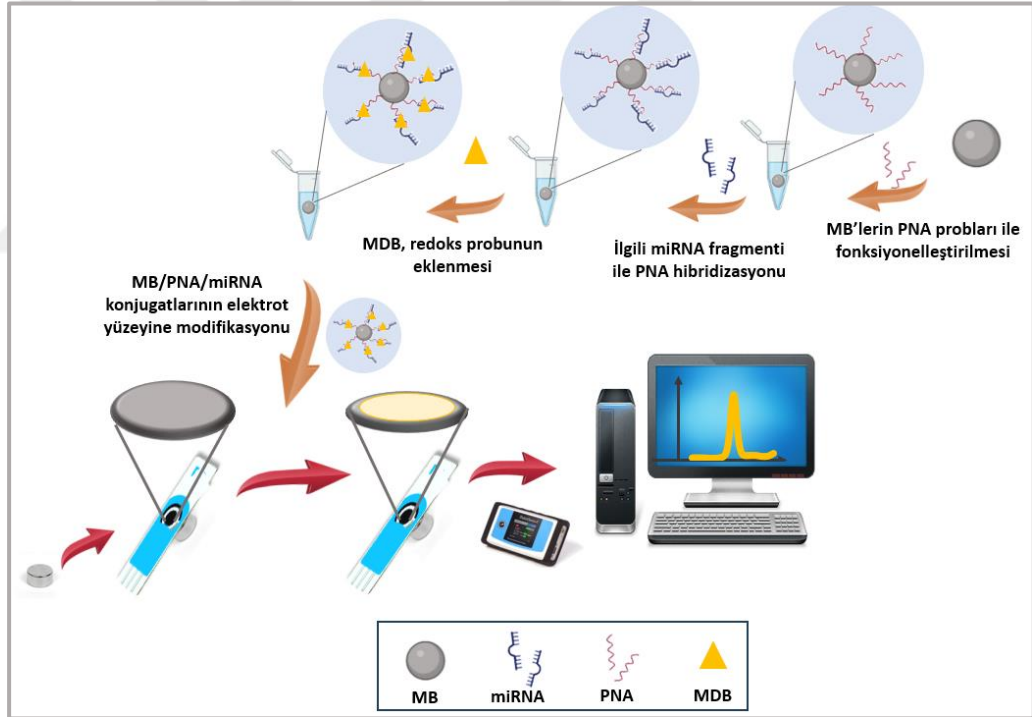
2.6.4. MB/PNA/miRNA konjugasyonu

Hibridizasyon tamponu içerisinde bulunan MB/PNA konjugatından 5,0 µL alındı ve üzerine 5,0 µL farklı konsantrasyonlarda miRNA'lar eklendi. Hibridizasyonun sağlanması amacıyla 20 dk., oda sıcaklığında, hafif karıştırma altında inkübe edildi (Moccia et al., 2020). Konjugatın karakterizasyonu SEM ve boyut ölçümü ile gerçekleştirildi.

2.6.5. Elektrokimyasal biyosensör sisteminin tasarımı

Hazırlanan MB/PNA/miRNA konjugatları üzerine, biyosensör sisteminde ölçüm için kullanılacak olan redoks probu olan MDB son konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde eklendi. Hibridize olmuş PNA-miRNA yapısının arasına girmesinin sağlanması amacıyla 10 dk. inkübe edildi.

Biyosensör tasarımında SPCE elektrotları kullanıldı. Öncelikle SPCE çalışma elektrodu arkasına gelecek şekilde mıknatıslar yapıştırıldı. Çalışma elektrodunun yüzeyine hazırlanan konjugattan 10 μ L eklendi (Şekil 2.11). Elektrokimyasal ölçümler için TBS tamponu (20 mM Tris-HCl ve 20 mM NaCl, pH 7,0) kullanıldı. SWV, CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirildi.



Şekil 2. 11. miRNA-221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör platformunun tasarım adımları.

2.6.6. Biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonu

Tasarlanan biyosensör sisteminin yüzey karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla her modifikasyon adımından sonra CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirildi.

2.6.7. Biyosensör sisteminin analitik özellikleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin analitik özelliklerini belirlemek amacıyla MB/PNA konjugatı ile farklı konsantrasyonlarda miRNA'lar ile konjuge edilmesinin ardından SWV ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen akım değerlerinden yola çıkılarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

LOD belirlenmesi için, doğrusal tayin aralığında bulunan konsantrasyon için 3 tekrarlı ölçümler SWV tekniği ile alındı. LOD değeri $((3 \cdot S.H.)/m)$ formülü ile hesaplandı. Tekrarlanabilirlik için, doğrusal tayin aralığının orta noktası seçildi ve farklı elektrotlarda ölçümler alındı. Ayrıca varyasyon katsayısı (%cv) hesaplandı.

2.6.8. Optimizasyon çalışmaları

Biyosensör sisteminin tasarım aşamasında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları şu şekildedir;

- Farklı PNA'lar ile miRNA'ların hibridizasyonu
 - ✓ PNA-mir221-5p ile miR-221-5p
 - ✓ PNA-mir221-5p ile miR-221-3p
 - ✓ PNA-miR221-3p ile miR-221-5p
 - ✓ PNA-miR221-3p ile miR-221-3p
 - ✓ PNA-miR222-5p ile miR-222-5p
 - ✓ PNA-miR222-5p ile miR-222-3p
 - ✓ PNA-miR222-3p ile miR-222-5p
 - ✓ PNA-miR222-3p ile miR-222-3p
- PNA ile miRNA'ların hibridizasyonu için inkübasyon süresi (10; 15; 20; 40; 60 dk.)
- MDB konsantrasyonu (2,5; 5,0; 10,0 ve 20 μ M)

2.6.9. Girişimci Denemeleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin hedef miRNA'a seçimliliğinin belirlenmesinin amacıyla dolaşımında serbest bulunabilecek,

- %100 mSEPT9 fragmenti
- %0 mSEPT9 fragmenti
- BCAT
- SOX21 fragmentleri

ile MB/PNA konjugasyonu inkübe edildi ve ölçümler gerçekleştirildi.

2.6.10. Örnek uygulama çalışmaları

Kolon kanseri tedavisi gören hastalardan toplanan plazma örnekleri ile biyosensör sisteminin hasta örneklerinde çalışabilirliği test edildi. Kontrol ve pozitif plazma örneklerinden RNA izolasyonu için Qiagen-miRNeasy Mini Kit (cat no: 217004) kullanıldı. Prosedür olarak kit içerisindeki protokol takip edildi. Kısaca protokol, örneklerin üzerine örnek hacmi kadar QIAzol Lysis Reagent eklendi. Oda sıcaklığında, 5 dk. inkübasyonun ardından 140 µL kloroform eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-3 dk. inkübasyonun ardından 12000g'de 15 dk. santrifüjlendi. Santrifüj ardından 3 farklı faz elde edildi. En altta bulunan faz, kırmızı renkli olup organik fazdır. Ortada bulunan faz DNA ve proteinlerin olduğu, en üst faz ise RNA'ların olduğu şeffaf fazdır. En üstteki faz ependorfa transfer edildi ve 525 µL etanol eklendi. Pipetleme işlemi ardından, örneklerden 700 µL RNeasy Mini ayırma kolonuna transfer edildi. Örneğin kolondan geçirilmesi amacıyla, 8000 g'de 15 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Kolonun altına geçen çözelti uzaklaştırıldı ve kolona 700 µL RWT tamponu eklendi. 8000 g'de 15 dk. santrifüj işlemi ardından alt faz uzaklaştırıldıktan sonra, kolona 500 µL RPE tamponu eklendi. 8000 g'de 15 dk. santrifüjden sonra, kolona 10 µL RNase-free su eklendi ve filtredeki tüm RNA'ların alınması amacıyla 8000 g'de 15 dk. santrifüjlendi. Elde edilen total RNA çözeltisinin nanodropta ölçümü gerçekleştirildi.

Plazma örneklerinden saflaştırılan RNA'lar MB/PNA konjugatları ile hibridize edildi. Elektrot yüzeyine immobilize edildi ve SWV ölçümleri gerçekleştirildi.

2.6.11. Doğrulama çalışmaları

Plazma örneklerinden saflaştırılan RNA'lar tasarlanan biyosensör sistemine uygulanmasının ardından sonuçların doğrulanması amacıyla RT-PCR kullanıldı. Öncelikle saflaştırılan ve konsantrasyonu nanodrop ile belirlenen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için miScript II RT Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Buradaki ana hedef, elde edilen RNA'lardan tek iplikli cDNA'ların ön amplifikasyonunun sağlanmasıdır. Amplifikasyon için kit içerisindeki prosedür izlendi. Reaksiyon karışımı Tablo 2.3'de verildi.

Tablo 2. 3. cDNA'ların ön amplifikasyonu için reaksiyon içeriği.

	Hacim
5X miScript HiSpec Tamponu	4,0 µL
10X MiScript nükleik asit karışımı	2,0 µL
miScript Reverse-Transkriptaz karışımı	2,0 µL
RNA örnekleri (20 ng)	Son konsantrasyona göre ayarlandı.
RNAz free su	Son hacime göre ayarlandı.
TOPLAM	20 µL

Hazırlanan reaksiyon karışımı RT-PCR'da, 60 dk. 37 °C'de ve 5 dk. 95 °C'de inkübe edildi.

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak miRNA-221 ve miRNA-222'nin ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla RT-PCR gerçekleştirildi. Bunun için tasarlanan primer dizileri Sentebiolab firmasına sentezlettirildi ve primerlerin dizileri açık şekilde Tablo 2.4'de verildi.

Tablo 2. 4. RT-PCR reaksiyon için kullanılmak üzere temin edilen primer dizileri.

	Primer Dizisi
miR-221	5'-CGA GCT ACA TTG TCT GCT GGG T-3'
miR-222	5'-CCG CAG CTA CAT CTG GCT ACT G-3'
Reverse Primer	5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
RNU6 primer forward	5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
RNU6 primer reverse	5'-AGGGGCCATGCTAATCTTCT-3'

RNU6 primerleri kontrol geni olarak kullanıldı. Reaksiyon karışımı Tablo 2.5'de verildi.

Tablo 2. 5. RT-PCR için için reaksiyon içeriği.

	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µL
10x miScript Universal Primer	2,0 µL
Primerler	2,0 µL
RNAz free su	Son hacime göre ayarlandı.
cDNA	Son konsantrasyona göre ayarlandı
TOPLAM	20 µL

Sonuçlar $\Delta\Delta C_T$ yöntemine göre kontrol olarak kullanılan RNU6 ile kıyaslanarak, kontrol örneklerine göre kat değişim olarak hesaplandı.

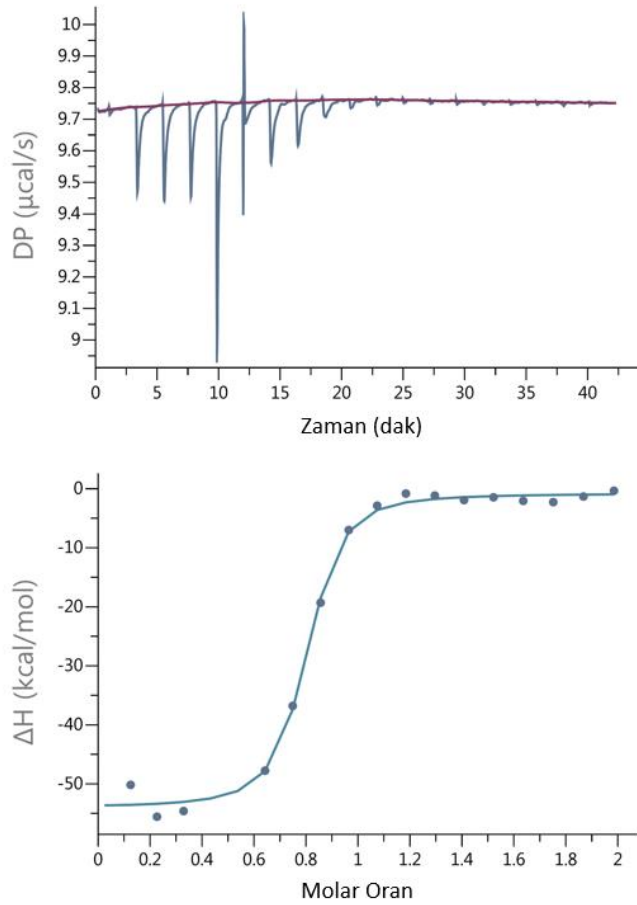


3. BULGULAR

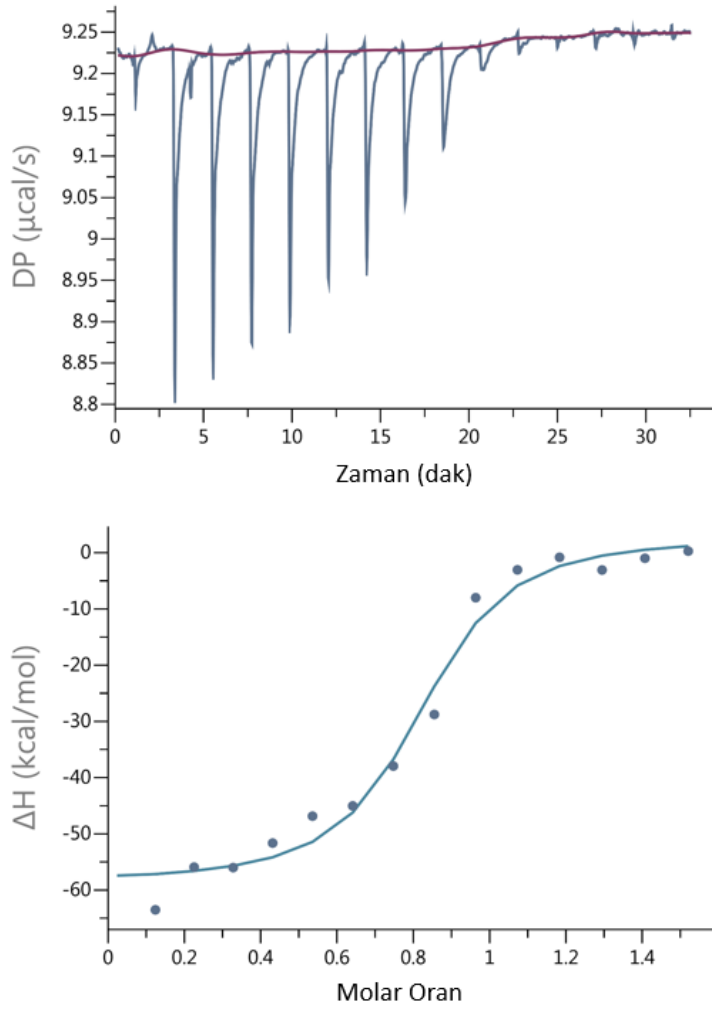
3.1. Bölüm-1: “Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

3.1.1. ITC sonuçları

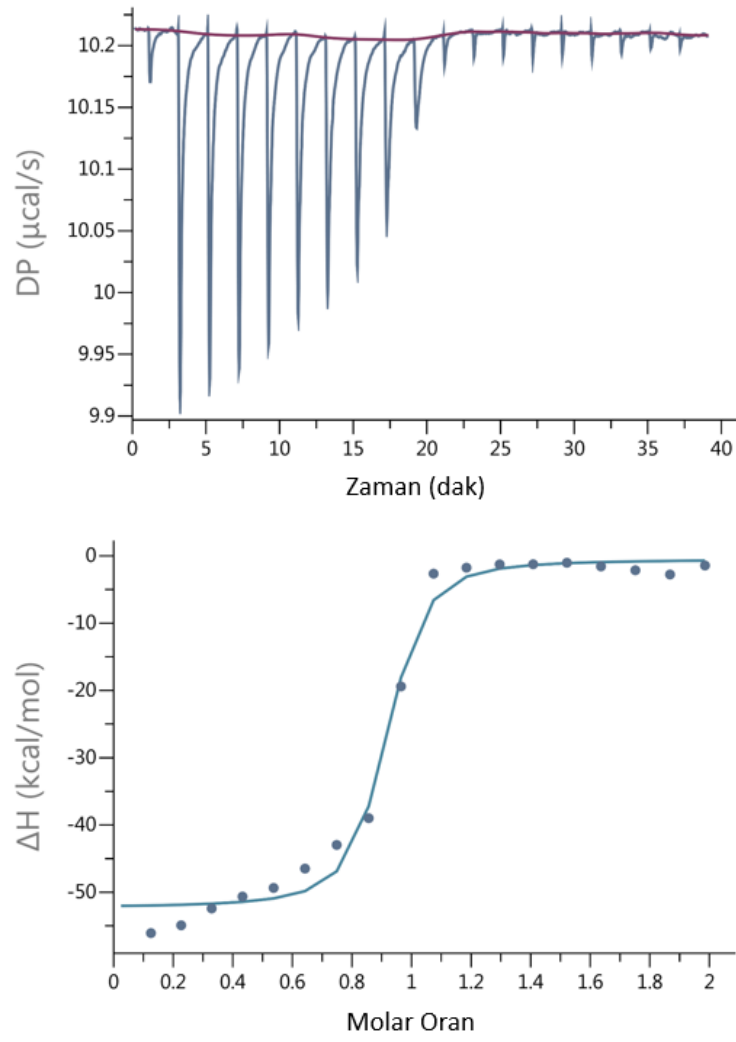
PNA probu ile hedef mSEPT9 fragmentleri arasındaki hibridizasyonun doğrulanması amacı ile ITC denemeleri gerçekleştirilmiştir. %0, %100, %75, %50 ve %25 metilasyon düzeyleri için elde edilen titrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilmiştir.



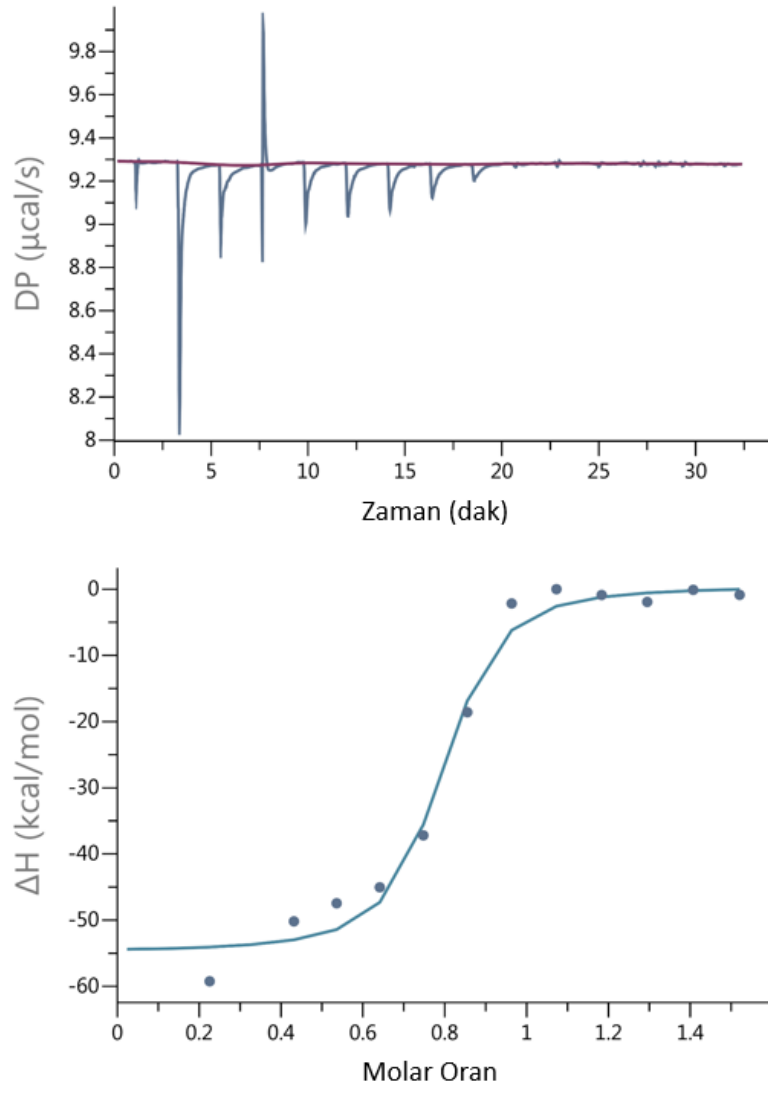
Şekil 3. 1. Metillenmemiş (%0 metilasyon) fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi)



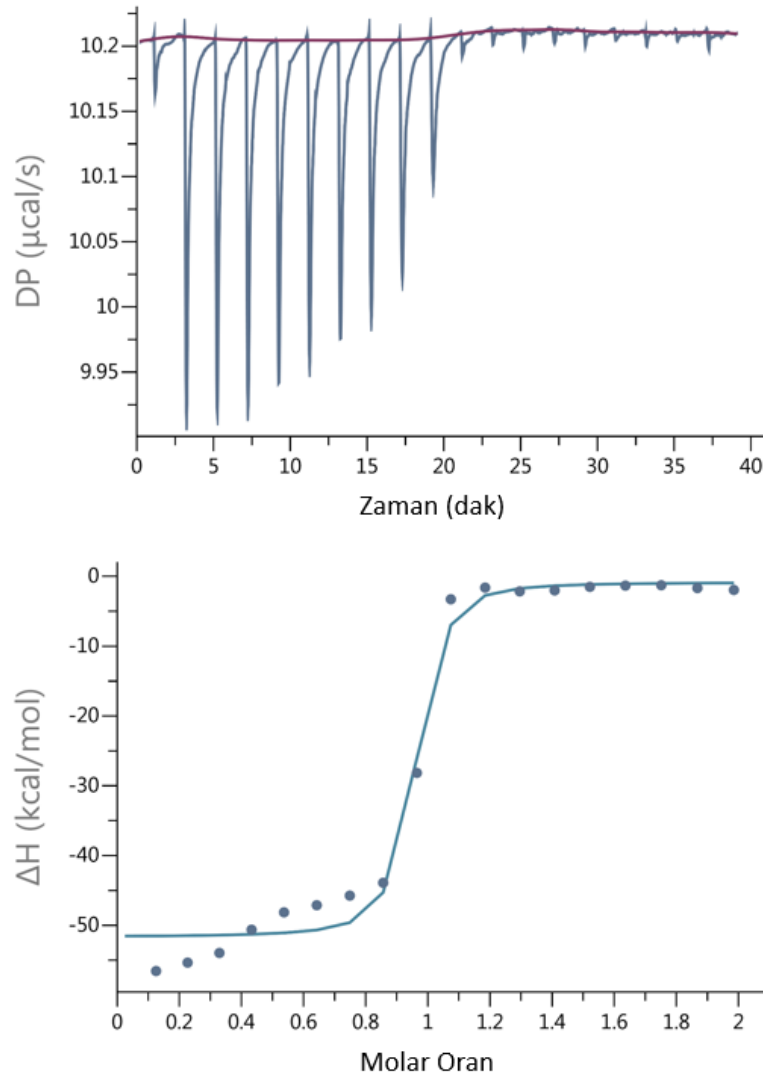
Şekil 3. 2. %100 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi)



Şekil 3. 3. %75 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.)



Şekil 3. 4. %50 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.)



Şekil 3. 5. %25 metillenmiş fragment ile PNA arasındaki hibridizasyona ilişkin titrasyon eğrisi. (Titrasyon sırasında birim zamanda değişen enerji miktarının zamana karşı grafiği üstte ve titrasyonda değişen enerji miktarının molar orana karşı grafiği altta verildi.)

Titrasyon sonrası elde edilen değerler, PEAQ- ITC software tarafından hesaplanarak K_d (ayrışma sabiti), ΔH (entalpi), ΔG (Gibbs Serbest Enerji) ve ΔS (Entropi) değerleri belirlenmiştir. ITC ölçümleri sonucunda belirlenen termodinamik parametreler Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3. 1. PNA ve hedef DNA fragmentleri arasındaki bağlanmaya ilişkin termodinamik parametreler

DNA fragmenti	K _d	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{kcal/mol})$
%0	26,5 nM	-53,2	-10,3	-42,9
%100	85,5 nM	-61,6	-9,65	-51,9
%75	20,8 nM	-51,7	-10,5	-41,2
%50	30,4 nM	-55,3	-10,3	-45,1
%25	9,49 nM	-50,8	-10,9	-39,8

Elde edilen bağlanma afinitesi, entalpi ve entropi değerleri hedef DNA fragmentleri ile PNA arasında yüksek afiniteli (nM düzeyde) ve istemli bir etkileşim olduğunu göstermektedir. PNA ile nükleik asitlerin hibridizasyonunun karakterizasyonu amacı ile ITC'nin kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Sugimoto et al., 2001). Tablo 3.1'de karşılaştırıldığı gibi, metillenmemiş kontrol fragmenti ile karşılaştırıldığında metilasyonun K_d değerlerinde farklanmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, K_d değerlerinin nM düzeyinde bulunması, PNA'nın metillenmiş DNA fragmentlerine yüksek afinitesini koruduğunu ifade etmektedir. Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, PNA dizilerinin RNA'ya bağlanma afiniteleri belirlenmiş ve K_a değerinin 10⁷ M'den yüksek (veya K_d değerinin 10⁻⁷ M'dan düşük) olması güçlü bağlanma olarak ifade edilmiştir (M. Li et al., 2010).

PNA ile DNA fragmentleri arasındaki bağlanmaya ilişkin ΔG ve ΔH değerleri değerleri arasında ise önemli bir farklanma gözlenmemiştir. Negatif ΔG değerleri PNA/DNA dupleksinin termodinamik olarak kararlı olduğunu ve hedef DNA fragmenti üzerindeki metilasyonların PNA-DNA dupleksinin kararlılığı üzerinde belirgin bir farka neden olmadığını göstermektedir (Sugimoto et al., 2001).

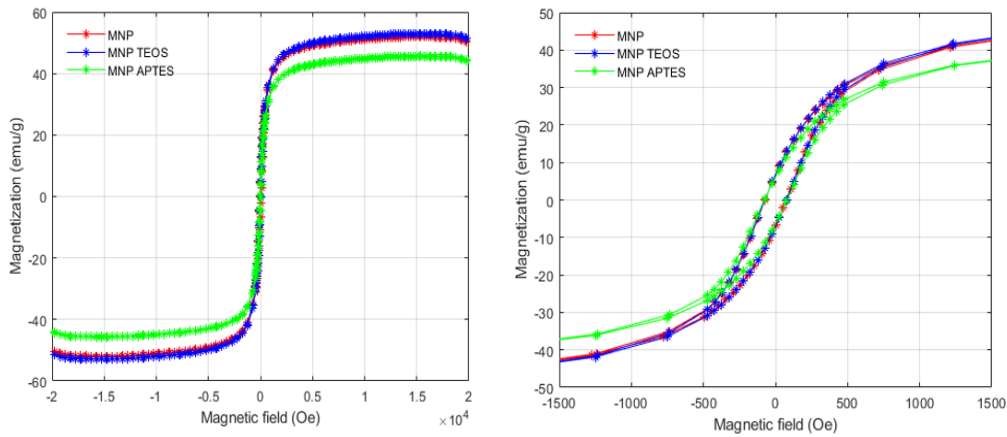
Proteinlerin, protein-ligand ve protein nükleik asit komplekslerinin termodinamik analizleri, entropi-entalpi değerlerinin birbirlerini kompanse ettiklerini göstermiştir. Bu durum literatürde “entalpi–entropi kompanzasyon fenomeni” olarak tanımlanmıştır. Entalpi–entropi kompanzasyonu, birçok kimyasal ve biyokimyasal sistemde kendini gösteren bir fenomendir. Belirli bir reaksiyonda entalpi ve entropi değerleri (azalma ya da artma) değişim

gösteriyorsa ΔG değişimi kompanse edilmektedir. Bunun sonucunda, ΔG değeri aynı kalmakta veya minimum düzeyde değişiklik göstermektedir. Geniş bir fizyolojik sıcaklık aralığında ΔH ve $\Delta S'$ deki bu senkronize değişim ligand bağlanması, protein katlanması gibi birçok biyokimyasal reaksiyon için geçerlidir (Khrapunov, 2018). DNA bağlanma olayları, farklı termodinamik kuvvetler (entalpi, entropi) tarafından yönlendirilmesine rağmen benzer ΔG enerji değerlerine sahip oldukları bulunmuştur (Breslauer et al., 1987). Tablo 3.1'de gösterildiği gibi, %0 ve %50 metillenmiş DNA-PNA çiftleri benzer Gibbs serbest enerji değerlerine sahip olmalarına rağmen, entalpi ve entropi değerlerinin farklı olduğu ve entalpi-entropi kompanzasyonunun bir sonucu olarak Gibbs serbest enerji değerlerinin aynı kaldığı bulunmuştur.

3.1.2. MNP karakterizasyonu

MNP sentezinin ve modifikasyonun başarılı şekilde gerçekleştiğinin belirlenmesi amacıyla MNP'lerin manyetizasyon özellikleri manyetik histeresis ölçümü (VSM), ve her modifikasyon adımından sonra SEM görüntüleme, zeta potansiyel ve boyut analizi gerçekleştirilmiştir.

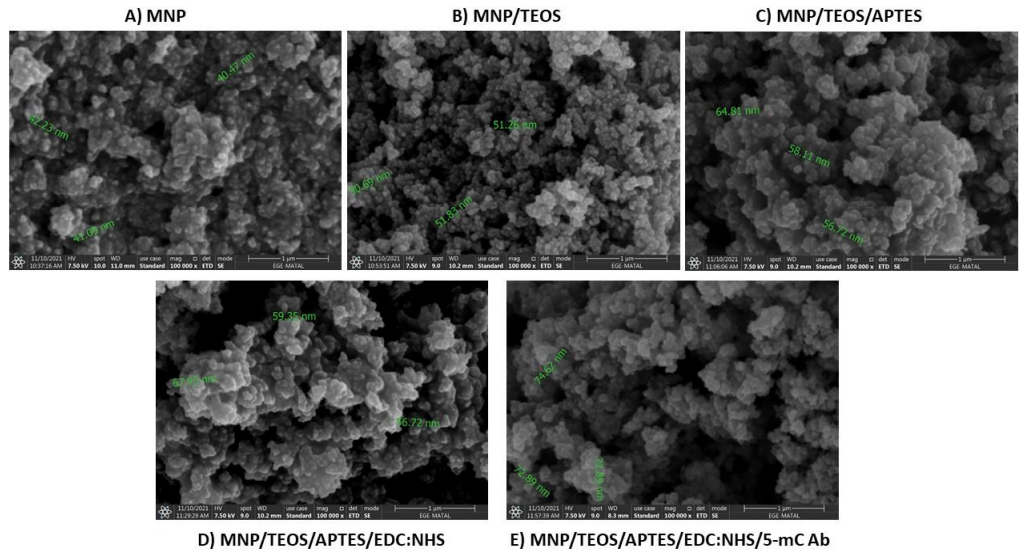
MNP, MNP/TEOS ve MNP/TEOS/APTES numunelerin manyetik özellikleri VSM ölçümleri yapılarak manyetik özellikleri incelenmiştir. VSM analizleri yapılan numunelerin kütle miktarı ölçülmüş ve manyetizasyon birimi kütle cinsinden emu/g olarak alınmıştır. VSM yöntemiyle 300 K sabit oda sıcaklığında, uygulanan manyetik alan şiddeti -20000 Oe ile +20000 Oe ve +20000 Oe ile -20000 Oe aralığında bir manyetik alan altında M-H ölçümüne tabi tutulmuştur. Sonuçlar Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3. 6. VSM sonuçları.

MNP ($M_s=52,3$ emu/g) ve MNP/TEOS ($M_s=55,1$ emu/g) her iki örnek doygunluk manyetizasyon değeri (M_s) neredeyse ikisi de aynı sonucu içerip MNP/TEOS doygunluk manyetizasyon değeri biraz daha büyüktür. MNP ve MNP/TEOS örneklerinde iki etki de aynı manyetizasyonu oluşturmaktadır. MNP/TEOS/APTES ($M_s=43$ emu/g)' de ise manyetizmanın azaldığı görülmüştür. Ancak tüm numuneler manyetik özellik gösterdiği net bir şekilde gözlemlenmiştir.

SEM görüntülerine göre her modifikasyon adımından sonra parçacıkların boyutları artmıştır (Şekil 3.7). SEM görüntüleri ile boyut ölçümü sonuçları (Tablo 3.2) benzerdir. Bu durum MNP modifikasyonunun başarılı şekilde yapıldığını kanıtlar niteliktedir.



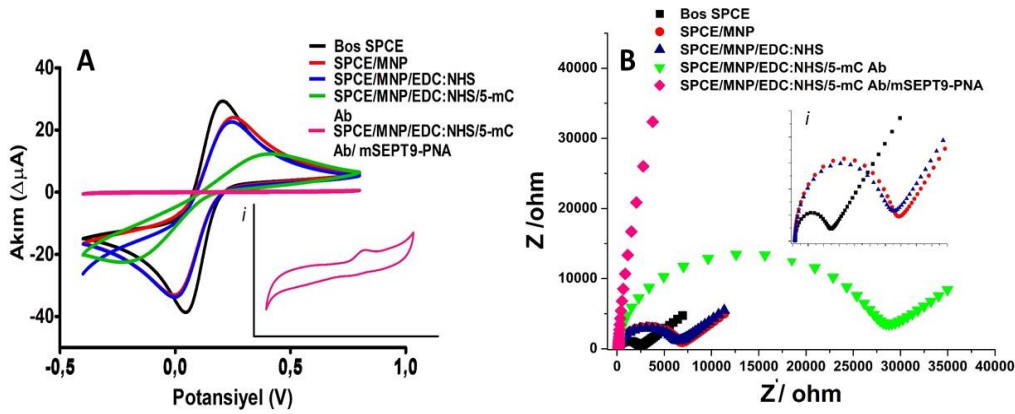
Şekil 3. 7. Her modifikasyon adımı için SEM görüntüleri. (A) MNP, (B) MNP/TEOS, (C) MNP/TEOS/APTES, (D) MNP/APTES/TEOS/EDC:NHS, (E) MNP/APTES/TEOS/EDC:NHS/5-Mc Ab

Tablo 3. 2. Her modifikasyon adımı için boyut ve zeta potansiyel sonuçları.

	Zeta Potential (mV) ± SD	Size (d.nm) ± SD	PDI
MNP	10.30 ± 5.6	45.75 ± 18.8	0.15
MNP/TEOS	-42.40 ± 7.5	57.26 ± 20.9	0.11
MNP/TEOS/APTES	20.30 ± 5.8	64.78 ± 36.1	0.21
MNP/TEOS/APTES/EDC/NHS/5-mC Ab	24.20 ± 4.9	75.03 ± 43.5	0.21

3.1.3. Sensör platformunun yüzey karakterizasyon sonuçları

MNP ve 5-mC Ab ile modifiye edilmiş sensör platformunun farklı metilasyon oranlarına sahip SEPT9 fragmentleri ile Fc-PNA'ya karşı verdiği yanıtlar değerlendirdi. Tasarlanan yüzeylerin karakterizasyonları için CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de, sayısal değerler ise Tablo 3.3'de özetlendi.



Şekil 3. 8. Tasarlanan sensöre ilişkin (A) CV (%50 metillenmiş SEPT9 ve PNA eklenmiş yüzey için (SPCE/MNP/EDC: NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA) CV piki ilave olarak (i) verilmiştir.) (Ölçümler, 50 mV/s tarama hızında -0,4 V ile +0,8 V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi), (B) İmpedans sonuçları (Boş SPCE, SPCE/MNP ve SPCE/MNP/EDC:NHS olarak modifiye edilmiş yüzey için EIS sonuçları ilave olarak (i) verildi) (Ölçümler için 0,18V'da 0,02 Hz ile 10 Hz akım aralığı kullanıldı.)

Tablo 3. 3. CV piklerinin katodik, anodik pik değerleri ve impedans piklerinin ohm değerleri.

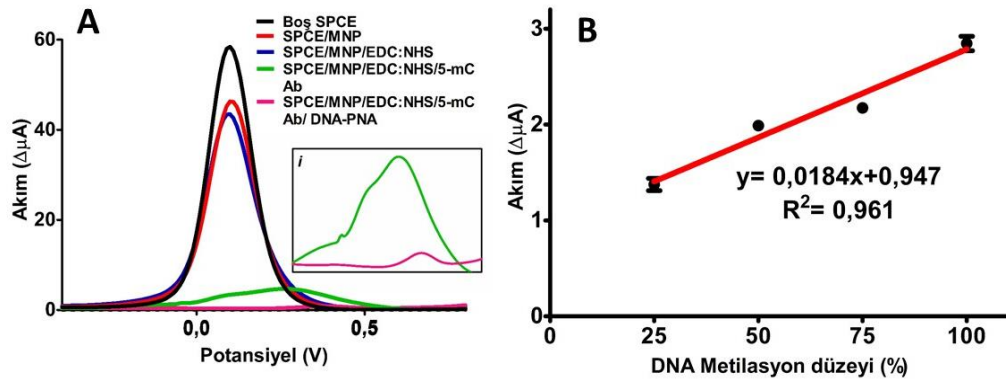
	Katodik Pik Akım değerleri (μA)	Anodik Pik Akım Değerleri (μA)	Ohm (Ω)
Boş SPCE	29,288	-38,676	2092
SPCE/MNP	24,009	-33,126	6192
SPCE/MNP/EDC:NHS	22,608	-32,811	5765
SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab	12,318	-22,527	26560
SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA	0,310	-0,589	100000

CV ve EIS grafiklerinde görüldüğü üzere, elektrot yüzeyinin modifikasyonu, CV piklerinin azalmasına neden olmuştur. Bu azalma sensör platformunun başarılı şekilde modifiye edildiğini ve 5-mC antikorunun MNP ile başarılı şekilde konjuge edildiğini ve mSEPT9 ile ferrosen işaretli PNA ile başarılı şekilde hibridize olup, metillenmiş mSEPT fragmentlerinin yüzeyde bulunan 5-mC antikoruna başarılı şekilde bağlandığını kanıtlamaktadır. Benzer şekilde impedans ölçümlerinde her bir modifikasyon adımından sonra direnç değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar sensör platformunun başarılı

şekilde modifiye edildiğini ve 5-mC antikorumun mSEPT9 fragmentlerini tanıdığını kanıtlar niteliktedir.

3.1.4. Sensör platformunun analitik özellikleri

Farklı metilasyon miktarına sahip olan SEPT9 fragmentlerine karşı, 5-mC Ab ile modifiye edilmiş sensör platformunun verdiği yanıtların değerlendirilmesi ve tasarlanan sensör platformunun analitik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DPV ölçümleri alınmıştır. Kalibrasyon grafiği, MNP-5mC Ab ve mSEPT9-PNA konjugatının eklenmesi ile elde edilen piklerin arasındaki akım farkından yararlanılarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9A'da paylaşılmıştır.



Şekil 3. 9. Tasarlanmış sensör platformunun mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıtla ilişkin A) DPV (%100 metillenmiş DNA için elde edilen pikler ilave olarak (i) verilmiştir) (Ölçümler için -0,4 V dan +0,8 V'a potansiyel aralığı kullanıldı.) B) Kalibrasyon grafiği.

CV ve EIS sonuçları ile ilişkili olarak tasarlanan sensör platformu için, DPV sonuçları da benzer şekilde elde edilmiştir. Her bir modifikasyon adımı ile yüzeydeki hacimli grupların artması sonucu akım değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. 5-mC antikorumun, farklı metilasyon düzeylerine sahip mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıtın değerlendirilmesi amacıyla, %0, 25, 50 ve 75 metilasyon oranına sahip SEPT9'lar ile ferrosen işaretli PNA'lar yüzeye eklenmiştir. 5-mC Ab ile %25, 50, 75 ve 100 metillenmiş SEPT9-PNA hibridizasyonu sonucu elde edilde edilen DPV piklerinin akım değerindeki

değişimden, metillenmemiş (%0) SEPT9-PNA hibridizasyon akım değerindeki değişim çıkarılarak bir kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.9B).

Tasarlanan platform için biyosensörün tayin edebildiği en düşük mSEPT9 miktarının belirlenmesi açısından LOD değeri, analitik parametre olarak önemlidir. Bu değer aynı zamanda tasarlanan biyosensör sisteminin duyarlılığının bir ölçütüdür. LOD değerinin belirlenmesi için elektrot yüzeyine %25 metilasyon oranına sahip SEPT9 fragmentinin eklenmesi ardından ardışık olarak alınan 10 ayrı ölçüm sonucunun standart sapması hesaplandı. $[(3 \times \text{Standart sapma}) / m \text{ değeri}]$ formülü ile LOD değeri 0,371 olarak belirlendi.

Ek olarak sensör sistemi için analitik parametre olarak tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı değerleri belirlenmiştir. Elektrot yüzeyine %25 metillenmiş SEPT9 eklenmesi ardından ardışık olarak alınan 10 ayrı ölçüm sonucu ile hesaplanan tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı sonuçları ile tasarlanan biyosensör sistemi için diğer analitik parametreler Tablo 3.4'te özetlenmiştir.

Tablo 3. 4. Tasarlanan biyosensör sistemi için bazı analitik parametreler.

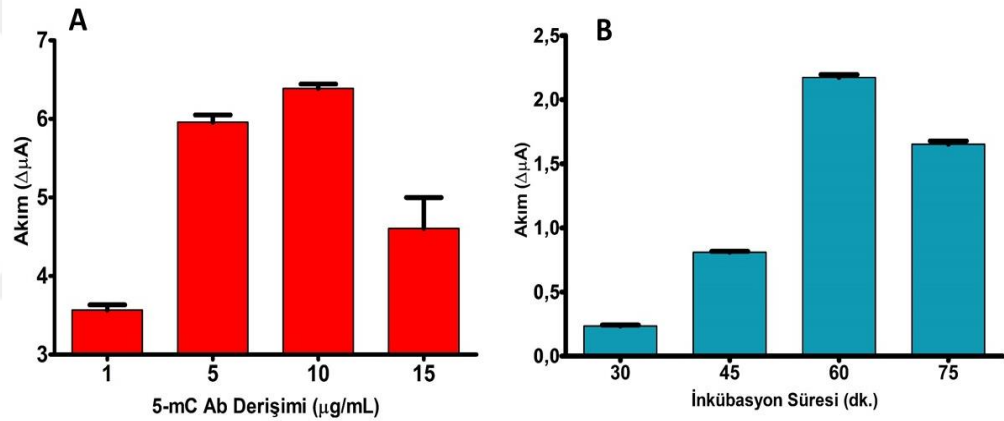
Analitik Parametreler	Değerler
Lineer Aralık (% Metillenme miktarı)	25-100
Eğim	0,0184
Eğim Standart Sapması	0,003
Kesim Değeri	0,947
Kesim Değeri Standart Sapması	0,179
Korelasyon Katsayısı	0,961
Tekrarlanabilirlik ($\pm$ Standart Sapma)	0,002
Varyasyon Katsayısı (% cv)	1,985
LOD (% Metillenme miktarı)	0,371

3.1.5. Optimizasyon sonuçları

Biyosensör sisteminin tasarım aşamasında MNP ile konjuge edilen 5-mC antikorunun derişiminin optimizasyonu için farklı konsantrasyonlarda (1,0; 5,0; 10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$) antikor ile MNP konjugasyonu gerçekleştirilmiştir ve %50

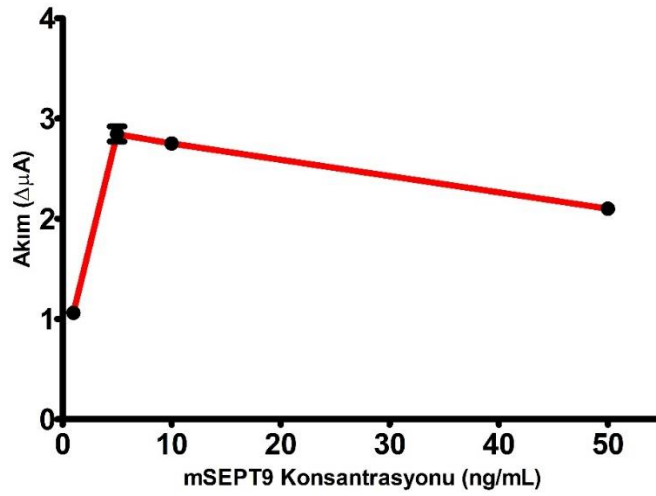
mSEPT9-PNA eklenerek DPV ölçümleri yapılmıştır. Şekil 3.10A’da görüldüğü üzere en yüksek akım değişimi 10 $\mu\text{g/mL}$ antikorunun kullanımı ile elde edilmiştir. Bu sebepten ötürü tüm deneyler bu konsantrasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Biyosensör tasarım aşamasında elektrot yüzeyine mSEPT9-PNA eklendikten sonraki inkübasyon süresinin optimizasyonunun sağlanması amacıyla, yüzeye mSEPT9-PNA eklendikten sonra 30., 45., 60. ve 75. dakikalarda ölçümler gerçekleştirilmiştir. 5-mC antikorunun eklenmesi ile elde edilen akım ile farklı zamanlarda alınan ölçümlerde elde edilen akım, arasındaki fark hesaplanmıştır. Şekil 16B’de görüldüğü üzere en büyük değişim 60. dk’da elde edilmiş ve optimum süre 60 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 10. Optimizasyon sonuçları. **(A)** MNP ile konjuge edilen 5-mC antikorunun konsantrasyon optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. **(B)** SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeyine mSEPT9-PNA (%75 mSEPT9 ile) eklenmesi ardından inkübasyon süresi optimizasyon sonuçları.

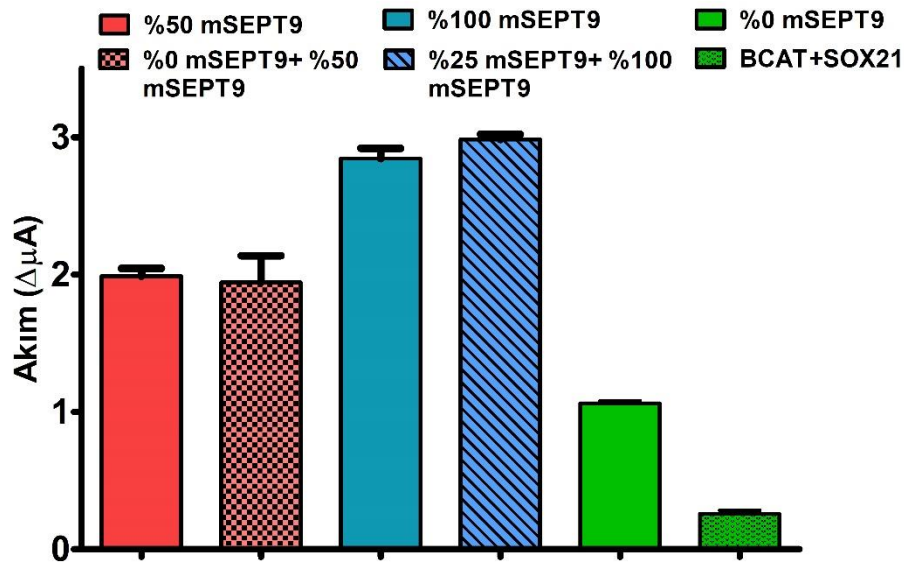
Ek olarak ferrosen işaretli PNA ile hibridize edilen mSEPT9 fragmentlerinin de konsantrasyonları optimize edilmiştir. Bunun için 1,0; 5,0; 10 ve 50 nM konsantrasyonlara sahip %100 mSEPT9 fragmentleri, 0,5 μM PNA ile hibridize edilmiş ve MNP-5-mC Ab ile fonksiyonelleştirilmiş elektrot yüzeyine eklenerek DPV ölçümleri alınmıştır. mSEPT9 konsantrasyonuna göre elde edilen akım değişimleri Şekil 3.11’de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü üzere optimum konsantrasyon 5,0 nM olarak belirlenmiş ve tüm deneyler bu konsantrasyona göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 11. PNA ile hibridite edilen mSEPT9 fragmentlerinin konsantrasyon optimizasyonu (%100 mSEPT9 fragmenti ile deneyler gerçekleştirilmiştir).

3.1.6. Girişimci deneyleri

Tasarlanan biyosensör sisteminin metillenmiş mSEPT9 seçiciliğinin belirlenmesinin amacıyla metillenmemiş SEPT9 ile %50 mSEPT9 fragmenti ve %25 mSEPT9 ile %100 mSEPT9 fragmentleri ve BCAT ile SOX21 fragmentlerinin karışımı ferrosen işaretli PNA ile hibridize edildi ve ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kıyaslanmış ve Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3. 12. Farklı metillenmiş mSEPT9 karışımlarına ve dolaşımda serbest bulunabilecek diğer BCAT, SOX21 fragmentlerine sensörün verdiği yanıt.

SPCE/MNP/EDC: NHS/5-mC Ab ile modifiye edilmiş sensör sistemine uygulanan metillenmemiş SEPT9 ile %50 mSEPT9 fragmentine verdiği yanıt, %50 mSEPT9'a verdiği yanıt ile karşılaştırılmıştır. Buna göre sensörden %97,67 cevap alınmıştır. %25 mSEPT9 ile %100 mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıt ile %100 mSEPT9 fragmentine verdiği yanıt karşılaştırılmış ve sensörün %104,88 cevap verdiği belirlenmiştir. BCAT, SOX21 fragmentleri ile oluşturulan karışım ile elde edilen sonuçlar ise %0 mSEPT9 fragmentlerine sensör sisteminden alınan yanıt ile karşılaştırılmış ve sensörün %26,60 cevap verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan sensör sisteminin mSEPT9 fragmentlerine karşı spesifik olduğunu kanıtlar niteliktedir.

3.1.7. Örnek uygulama sonuçları

Tasarlanan biyosensörün hasta örneklerde çalışılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla öncelikle insan serum örneklerine standart katma yöntemi ile metillenmiş mSEPT9 fragmentleri eklenerek, DPV tekniği ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucu elde edilen sinyal değerleri ve kalibrasyon grafiği yardımıyla geri kazanım ile bağlı standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.5'te verilmiştir.

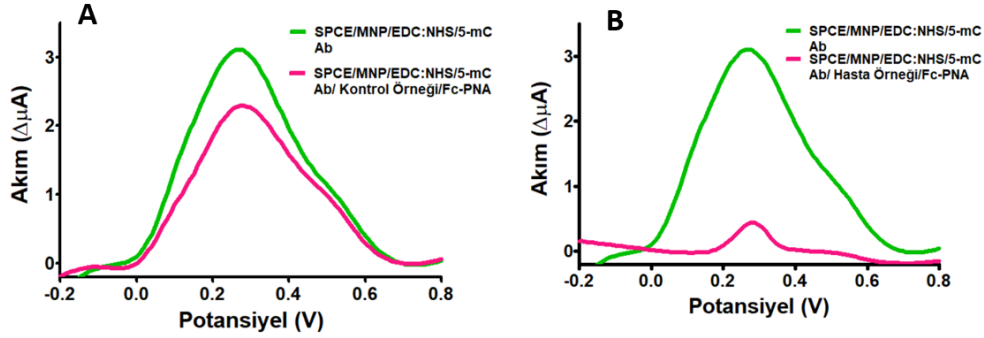
Tablo 3. 5. İnsan serum örneklerinde bulunan mSEPT9 fragmentleri için biyosensör cevabı.

Eklenen mSEPT9	Bulunan mSEPT9	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
%50	52,446±0,029	104,89	1,559
%75	73,804±0,022	98,41	0,931

Standart katma yöntemi ile serum örneklerine eklenen mSEPT9 miktarıyla tutarlı olarak, sensör sisteminde sonuçlar elde edilmiştir. RSD değerlerinin %5'ten küçük olarak belirlenmiştir, bu sonuçlara göre de tasarlanmış olan sensör sisteminin başarılı şekilde serum örneklerinden mSEPT9 dedeksiyonu için kullanılabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmaların devamı olarak kolon kanseri hastalarından ve kontrol grubundan toplanmış olan plazma örnekleri cDNA izolasyonunun ardından

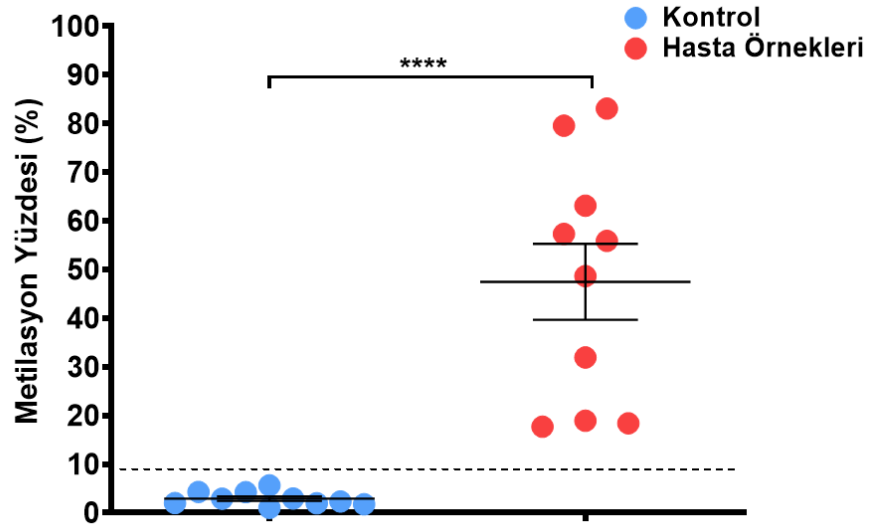
tasarlanan elektrokimyasal sensör sistemine uygulanmıştır. DPV ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te paylaşılmıştır.



Şekil 3. 13. Hasta örnekleri ile gerçekleştirilen DPV ölçüm sonuçları (A) Kontrol, (B) kolon kanseri hasta örneği.

Şekil 3.13'te görüldüğü üzere kontrol grubu ve kolon kanseri hasta plazmaları ile gerçekleştirilen deneyler sonucu elde edilen DPV pikleri kıyaslandığında hasta örnekleri için meydana gelen akım değişimi oldukça fazladır. Kontrol grubunda az da olsa bir akım değişimi, plazma örnekleri içinde bulunan biyomoleküller nedeniyle normal olarak kabul edilmektedir. Ancak hasta örnekleri içerisinde bulunan mSEPT9 fragmentleri PNA molekülleri tarafından spesifik etkileşmiş ve sensör sistemine uygulandığında belirgin bir akım değişimine yol açmıştır. Bu sonuçlara göre, tasarlanan elektrokimyasal sensör sisteminin hasta örnekler ile kullanılabilirliğini kanıtlar niteliktedir.

Kolon kanseri hastalarından toplanan 10 adet plazma örneği ve kontrol grubu, sensör sistemine uygulanmış ve örnekler içerisindeki metilasyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'te verilmiştir. Geliştirilen sensörün cut-off değeri 9,106 olarak belirlenmiş ve şekil üzerinde çizgiyle gösterilmiştir. Bu değer altında, herhangi bir hasta örneği için sonuç belirlenmemiştir. Bu durum sensör sisteminin, kontrol ve hasta örneklerinde mSEPT9'u başarıyla ayırt ettiği göstermektedir. İki grup arasındaki metilasyon yüzdeleri arasındaki farklılıklar Mann-Whitney testi kullanılarak test edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$).

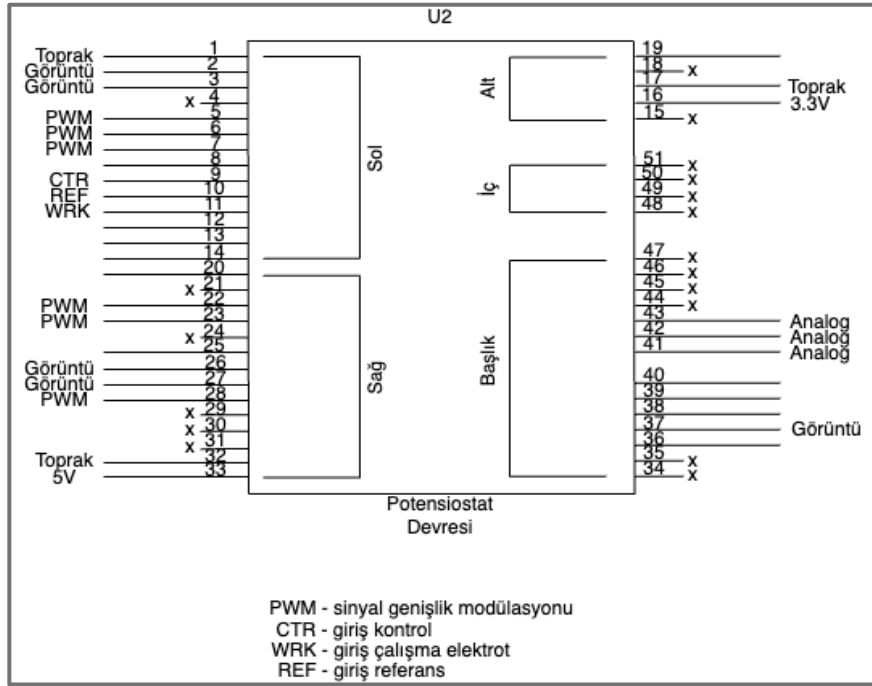


Şekil 3. 14. Kontrol grubu ve hasta örneklerinin tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sistemi ile mSEPT9 yüzdeleri (****: $p < 0,0001$).

3.1.8. Akıllı telefon uygulamasına biyosensörün entegrasyonu

3.1.8.1. PoC tasarımı

Geliştirilen devre kartı, elektrokimyasal ölçümler yapmak için açık kaynaklı bir potansiyostat olarak tasarlanmıştır. Çoklu çıkış gerilimi ve akım ölçüm aralıkları ile kullanımı pratik olan cihazın mevcut ölçüm aralıkları: ± 1 , 10, 100, 1000 μA olup, çıkış voltaj aralığı ± 1 , 2, 5, 10V'dır. Potansiyostat yazılımında, kronoamperometri, doğrusal tarama, döngüsel ve sabit voltaj voltametrisi gibi birçok yaygın voltametrik yöntemi yer almaktadır. Ana bilgisayardan elektrot potansiyelinin doğrudan/manuel kontrolü yapılır. Baskı devrede kullanılan devre elemanları Şekil 3.15'te ve Tablo 3.6'da verildi.



Şekil 3. 15. Elektrokimyasal cihaz (potansiyostat) elektrik devresi.

Tablo 3. 6. Kullanılan devre elemanları.

No	Kullanılan Devre Elemanları	No	Kullanılan Devre Elemanları
1	4.7µF Seramik Kondansatör	14	49.9k Direnç, 1%
2	0.1µF Seramik Kondansatör	15	300k Direnç, 1%
3	3.3nF Seramik Kondansatör	16	30k Direnç, 1%
4	2.2µF Seramik Kondansatör	17	3k Direnç, 1%
5	1µF Seramik Kondansatör	18	300 Ohm Direnç, 1%
6	56nF Seramik Kondansatör	19	1k Direnç, 1%
7	10nF Seramik Kondansatör	20	100 Ohm Direnç
8	12nF Seramik Kondansatör	21	4.7k Direnç
9	BAS70-04 Schottky Bariyer Diyot	22	74HC138 3-to-8 kod çözücü/Çoklayıcı
10	12k Direnç, 1%	23	DG411DY-T1-E3 Dörtlü Analog Anahtarlar
11	20k Direnç, 1%	24	TL072CDT Çift JFET Girişli İşlemsel Yükselteç
12	100k Direnç, 1%	25	REF3330AIDBZR Reference Voltage 3V ±0.15%
13	10k Direnç, 1%	26	OP07CDR Hassas İşlemsel Amplifikatör

Elektrottan gelen verileri bilgisayar üzerinden Python dilinde yazılan ve geliştirilen uygulama ile hesaplama işlemi gerçekleştirildi. Bu veriler CV yöntemi ile grafiksel gösterim elde edilmiştir.

Oluşturulan POC Potansiyostat Devresinde kullanılan Python dilinde geliştirilmiş program aşağıda verilmiştir:

```

.....

from potentiostat import Potentiostat
import matplotlib.pyplot as plt

port = '/dev/ttyACM0'          # Serial port for potentiostat
device
datafile = 'data.txt'          # Output file for time, curr,
volt data

test_name = 'cyclic'           # The name of the test to run
curr_range = '100uA'           # The name of the current range
[-100uA, +100uA]
sample_rate = 100.0            # The number of samples/second
to collect

volt_min = -0.1                 # The minimum voltage in the
waveform (V)
volt_max = 1.0                  # The maximum voltage in the
waveform (V)
volt_per_sec = 0.050            # The rate at which to
transition from volt_min to volt_max (V/s)
num_cycles = 1                  # The number of cycle in the
waveform

# Convert parameters to amplitude, offset, period, phase
shift for triangle waveform
amplitude = (volt_max - volt_min)/2.0          # Waveform
peak amplitude (V)
offset = (volt_max + volt_min)/2.0             # Waveform
offset (V)

```

```

period_ms = int(1000*4*amplitude/volt_per_sec)    # Waveform
period in (ms)
shift = 0.0                                       # Waveform
phase shift - expressed as [0,1] number
                                                    # 0 = no
phase shift, 0.5 = 180 deg phase shift, etc.

# Create dictionary of waveform parameters for cyclic
voltammetry test
test_param = {
    'quietValue' : 0.0,
    'quietTime' : 0,
    'amplitude' : amplitude,
    'offset' : offset,
    'period' : period_ms,
    'numCycles' : num_cycles,
    'shift' : shift,
}

# Create potentiostat object and set current range, sample
rate and test parameters
dev = Potentiostat(port)
dev.set_curr_range(curr_range)
dev.set_sample_rate(sample_rate)
dev.set_param(test_name,test_param)

# Run cyclic voltammetry test
t,volt,curr =
dev.run_test(test_name,display='pbar',filename=datafile)

# plot results using matplotlib

plt.figure(1)
plt.subplot(211)
plt.plot(t,volt)
plt.ylabel('potential (V)')
plt.grid('on')

plt.subplot(212)

```

```

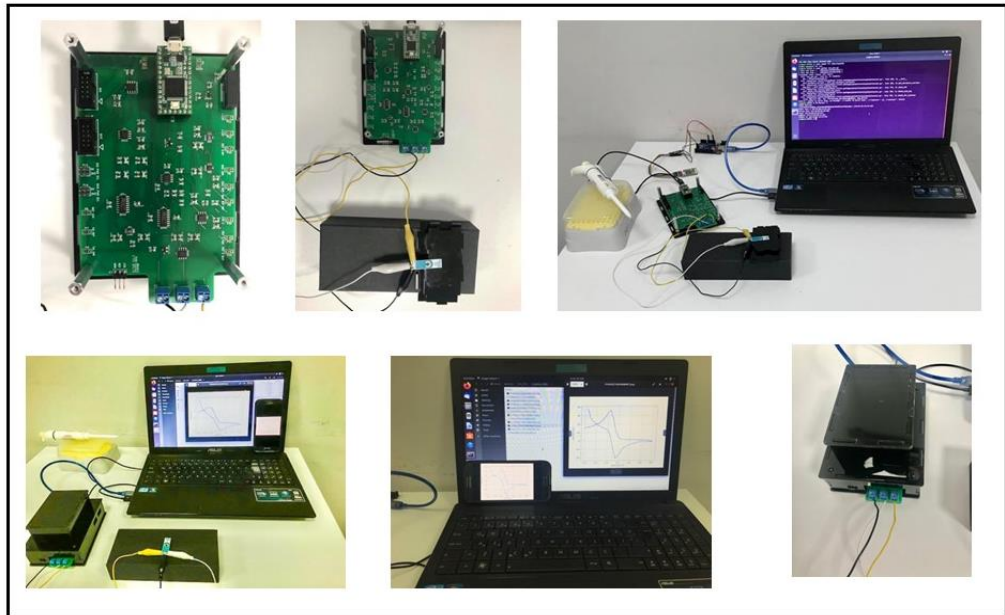
plt.plot(t,curr)
plt.ylabel('current (uA)')
plt.xlabel('time (sec)')
plt.grid('on')
plt.savefig('1.png')

plt.figure(2)
plt.plot(volt,curr)
plt.xlabel('potential (V)')
plt.ylabel('current (uA)')
plt.grid('on')
plt.savefig('2.png')

plt.close()

```

Tasarlanan PoC cihazının en gncel görüntüleri Şekil 3.16'da paylaşılmıştır. Dış ortamdan gelebilecek zarara karşın Siyah Pleksi levhalardan yapılmış kutu içerisinde devre elemanları koruma altına alınmıştır.



Şekil 3. 16. Elektrokimyasal cihazın elektrik devre baskısı ve cihazla ilgili en güncel görüntüler.

Geliştirilen cihazın ölçüm için uygun parametreleri Python, Aruino ve Javascript dillerinde geliştirilen uygulama ile parametreler ayarlanabilmektedir. Ana bilgisayardan elektrot potansiyelinin ve akım ölçümü doğrudan ya da manuel kontrolü sağlanmaktadır. Uygun voltametrik test yöntemi seçilip çalıştırılmakta ve cihazdan zaman, voltaj ve akım verileri (zaman, voltaj, akım) kaydedilebilmektedir. Çıkış voltajı ve akım değeri seçilen aralıklarda ayarlanabildiği gibi, ölçümler sırasında veri elde etmek için kullanılan örnekleme hızı da ayarlanabilmektedir.

3.1.8.2. Akıllı telefon ile entegrasyonu

PoC cihazı ile elde edilen grafiksel verilerin ham halini Linux tabanlı uygulama yardımıyla bluetooth modülü ile mobil cihaza gönderim sağlanmış olup, CV yöntemi baz alınmıştır. Bu uygulamada kullanılan yazılımlar Linux tabanlı Python dilinde geliştirilmiştir. Aşağıda CV yönteminin çalışma şekli anlatılmıştır;

- -100 mV minimum voltajda başlar ve biter.
- Döngünün ortasında maksimum 1000 mV gerilime ulaşır.
- Minimum (maksimum) voltajdan maksimum (minimum) voltaja 50 mV/s (-50 mV/s) oranında geçişler.
- Tek bir döngü gerçekleştirir.

Test yürütülürken veriler <o günün tarihi, saati, saniyesi ve milisaniye> adlı bir dosyaya kaydedilmiştir. Dosyadaki veriler virgülle ayrılmış zaman, gerilim ve akım değerlerinden oluşmaktadır. Test tamamlandıktan sonra verileri görüntülemek için iki grafik oluşturulur. İlk grafik, voltaj (potansiyel) ve akım-zaman iken, ikincisi akıma karşı voltaj (potansiyel) grafiğidir. Grafiklerin gösterimi “matplotlib” açık kaynak uygulama ile hazırlanmıştır. Her bir test sonucunda elde edilen veriler BlueDevil açık kaynak haberleşme protoköü ile mobil cihaza iletilmektedir. BlueDevil, KDE Bluetooth yığıdır. KDE Plazma masaüstü ile iyi bir şekilde entegre edilmiş işlevsellik sağlamak için BlueZ'in üzerinde yer almaktadır. Aşağıdaki komutlar kullanılarak akıllı telefona gerekli dosya aktarımı sağlanmıştır. Elde edilen data/png/verilerin mobil cihaz iletişimi için geliştirilmiş program aşağıdaki gibidir.

```

ls /dev/ttyAC*

sudo chmod 777 /dev/ttyACM0

sudo python cos_pos.py

bt-device -l (üstteki çalışmazsa önce bunu çalıştır__ sudo
apt install bluez-tools __)

hcitool scan

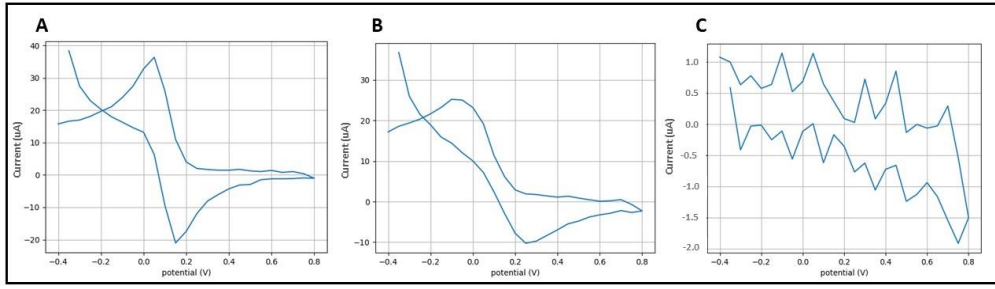
bluedevil-wizard

bluedevil-sendfile -u /org/bluez/hci0/dev_F4_F5_DB_66_1C_45 -
f /home/cos/COS_POS/results/29032022111040957504.png

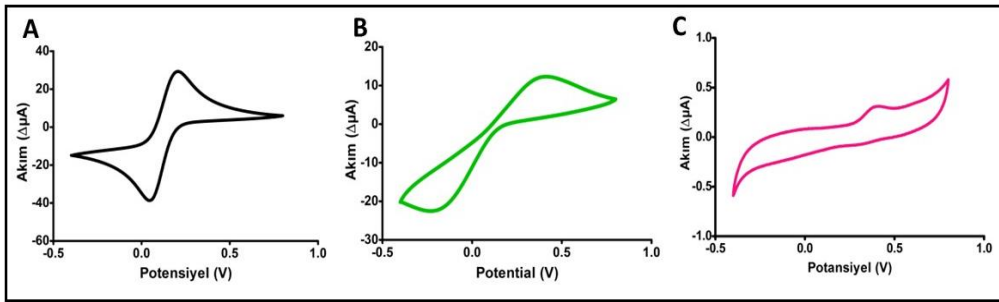
```

3.1.8.3. PoC ile elde edilen elektrokimyasal ölçümler

Boş SPCE, 5-mC Ab ile konjuge edilmiş MNP ile modifiye elektrot ve mSEPT9 ve PNA eklenmiş elektrotların CV ölçümleri hem PalmSens cihazı hem de tasarlanan PoC ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pikler Şekil 3.17 ve 18’de paylaşılmıştır. Şekillerde de görüldüğü üzere piklerin akım değerleri birbirine benzerdir. Ancak son modifikasyon adımı sonrasında, CV pikleri PoC cihazında gürültülü olarak çıkmıştır. Elektrodun bu modifikasyon adımı sonucu akım değeri oldukça düşmektedir. PalmSens cihazında otomatik olarak gürültü seslerini ortadan kaldıran ve pikleri düzelten bir ölçüm sistemi vardır, bu nedenle burada pik düzgün çıkarken, tasarlanmış olan PoC cihazında bu özellik olmadığından dolayı akım değeri düştükçe gürültü pikleri daha belirgin hale gelmiştir.



Şekil 3. 17. Tasarlanan POC ile elde edilen CV grafiği (A) Boş SPCE, (B) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab, (C) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA.



Şekil 3. 18. PalmSens cihazı ile elde edilen CV sonuçları. (A) Boş SPCE, (B) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab, (C) SPCE/MNP/EDC:NHS/5-mC Ab/mSEPT9-PNA.

3.1.9. Doğrulama çalışmaları

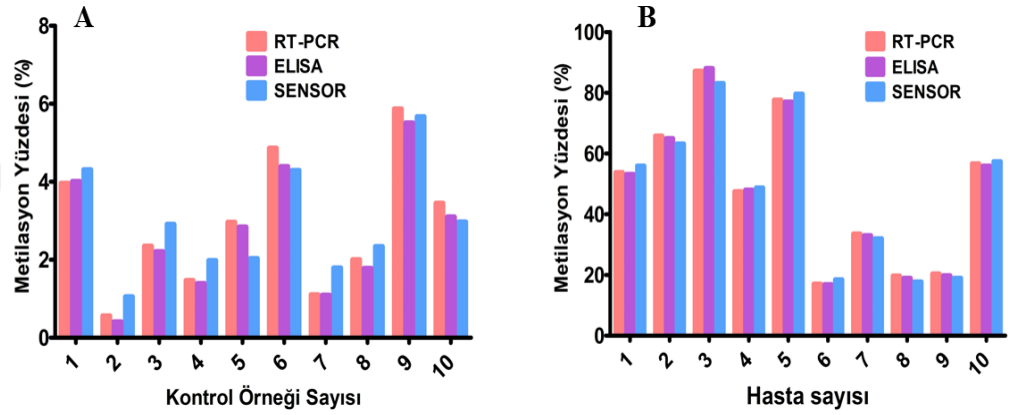
Tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla ELISA ve RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RT-PCR qMetil Kiti ile hızlı, bölgeye özgü DNA metilasyon değerlendirmesi için basit, anlaşılır ve bisülfid içermeyen bir prosedür izlenmiştir. Tek adımlı bir reaksiyon ile hızlı ve doğru DNA metilasyon seviyesi tespit edilmiştir. Ayrıca ELISA testi ile validasyon gerçekleştirilmiştir. Farklı metilasyon yüzdelere sahip mSEPT9 fragmentleri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Öncelikle standart katma yöntemi ile insan serum örnekleri içerisine eklenen mSEPT9 fragmentlerinin metilasyon yüzdeleri RT-PCR ve ELISA ile doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3. 7. Biyosensör sonuçlarının RT-PCR ve ELISA ile kıyaslanması.

EKLENEN MSEPT9	BIYOSENSÖR	RT-PCR	ELISA
%50	52,446±0,029	%50,15	%50,28
%75	73,804±0,022	%74,93	%75,17

Ardından, kontrol ve hasta örnekleri ile gerçekleştirilen deneysel adımların doğrulamaları benzer şekilde RT-PCR ve ELISA ile sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3. 19’da verilmiştir. Sonuçlara göre tasarlanan biyosensör sistemi ile RT-PCR ve ELISA sonuçları birbirine benzer ve pozitif korelasyon göstermiştir. Bu sonuçlara göre tasarlanan biyosensör sisteminin hasta örneklerinde mSEPT9 dedeksiyonu için kullanılabileceği ve elde edilen sonuçların doğruluğunun yüksek olduğu söylenebilir.

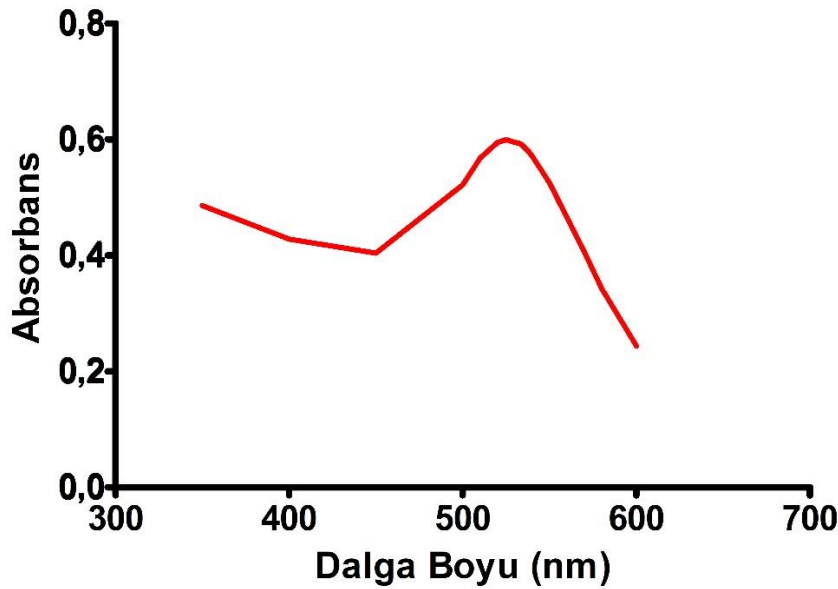


Şekil 3. 19. RT-PCR, ELISA ve elektrokimyasal biyosensör sistemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması (A) Kontrol grubu (n=10), (B) Hasta örnekleri (n=10).

3.2. Bölüm-2: “Metillenmiş DNA’ların Analizine Yönelik PNA Temelli Optik Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

3.2.1. AuNP karakterizasyonu

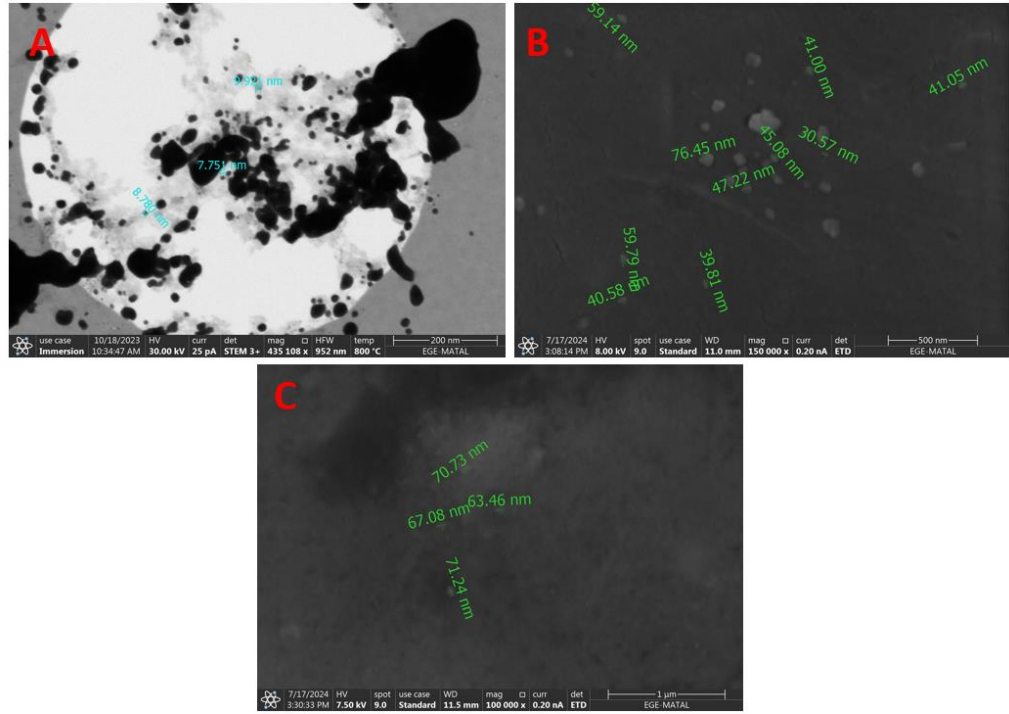
Optik sensör sisteminde renk değişimlerini gözlemlemek amacıyla AuNP’ler kullanılmıştır. Sentezlenen AuNP’nin maksimum absorpsiyon piki 520 nm’de gözlemlenmiştir (Şekil 3.20A).



Şekil 3. 20. Sentezlenen AuNP’e ilişkin UV-VIS spektrumu.

Amino fonksiyonel PNA moleküllerinin, AuNP ile konjugasyonu için öncelikle AuNP yüzeyi HS-PEG-COOH ile kaplanmıştır. AuNP/PEG konjugatının karakterizasyonu için nanodrop ile absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. HS-PEG-COOH (10 μ M) ile 24 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen AuNP/PEG konjugatının max. Piki 525 nm’e kaymıştır (Şekil 3.22). Bu kayma AuNP’nin yüzeyinin başarılı şekilde PEG ile kaplandığını açıklar niteliktedir ((Hosu et al., 2017).

Benzer şekilde her modifikasyon adımı için SEM görüntüleri sağlanmış ve DLS ile boyu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.21’de, boyut ölçüm sonuçları ise Tablo 3.8’de verilmiştir. Elde edilen sonuçların uyum içinde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum konjugasyonun başarılı şekilde gerçekleştirildiğini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 3. 21. Her modifikasyon adımı için SEM görüntüleri.

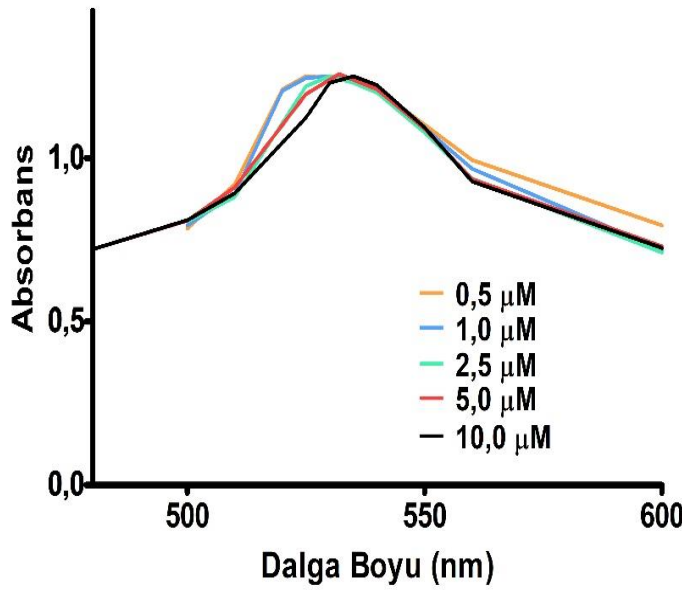
Tablo 3. 8. Her modifikasyon adımı için boyut ve zeta potansiyel sonuçları.

	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SD	Boyut (d.nm) $\pm$ SD	PDI
AuNP	$-42,50 \pm 1,93$	$11,23 \pm 3,12$	0,589
AuNP/PEG	$-21,42 \pm 4,63$	$42,62 \pm 10,5$	0,657
AuNP/PEG/PNA/mSEPT9	$10,42 \pm 6,19$	$62,31 \pm 45,5$	0,257

3.2.2. Optimizasyon çalışmaları

Tasarlanan optik biyosensör sisteminde en iyi sonuçların elde edilmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, öncelikle AuNP yüzeyinin kaplanması için optimum HS-PEG-COOH konsantrasyonu

belirlenmiştir. Farklı PEG konsantrasyonları (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10,0 μM) ile AuNP inkübe edilmiş ve UV-VIS ile absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22’de verilmiştir. Şekil 3.22’de de görüldüğü üzere pikte meydana gelen kayma 10,0 μM ile inkübasyon sonrasında meydana gelmiştir. Bu nedenle optimum PEG konsantrasyonu 10,0 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 22. HS-PEG-COOH optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için UV-VIS spektrumu.

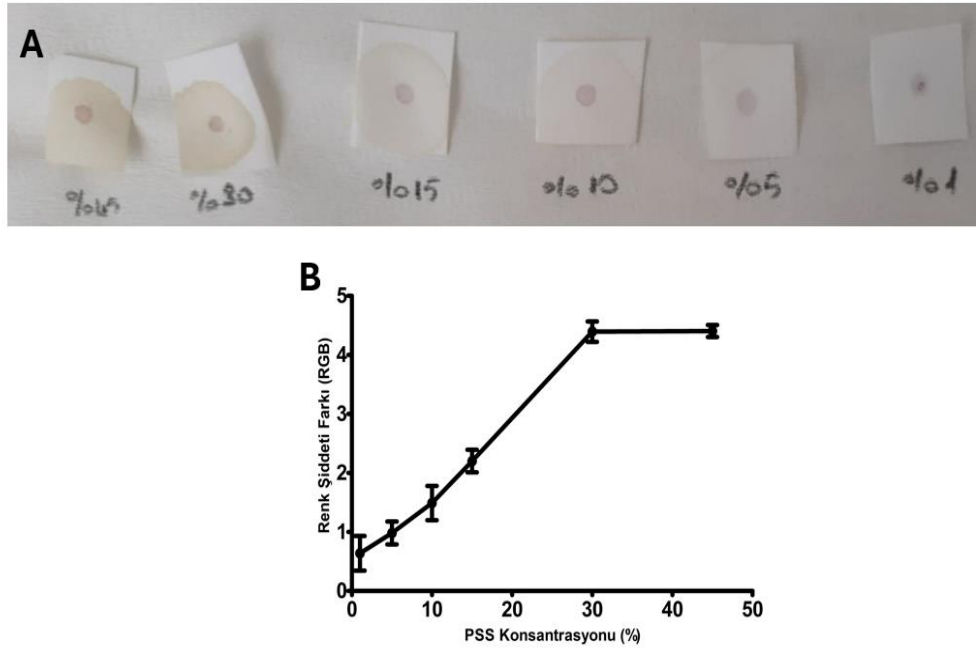
Tasarlanan biyosensör platformu için gerçekleştirilen bir diğer optimizasyon parametresi, optik sensör tasarımında kullanılan Whatman kağıdı türü ve PSS konsantrasyonunun optimizasyonudur. Kağıt substratların PSS ile modifiye edilmesi, AuNP’nin selüloz matrisinde depolanmasını kolaylaştırırken, aynı zamanda yüksek verimlilikle salınımlarını da sağlar. Bu kapsamda, PSS’nin kağıt yüzeyinde eşit şekilde dağılımı oldukça önemli bir parametredir. Bu nedenle iki farklı Whatman (Grade 41(20–25 μm) ve Grade 1 (11 μm)) kağıdı kullanılmıştır. Her iki kağıt %30, %15, %10,0, %5,0 ve %1,0 PSS ile ıslatılmıştır (Şekil 3.23). 22 μm (Whatman 41) gözenek boyutuna sahip kağıtlar, tüm PSS konsantrasyonlarında çoğunlukla düz kalırken, 11 μm (Whatman 1) gözenek boyutundaki kağıtların PSS uygulaması sonrasında buruştuğu gözlemlenmiştir. Bu durum bir sonraki adım olan AuNP konjugatı ile

ıslatıldığında, AuNP'nin yüzeyden salınmasında sorunlar yaratacağı için sonraki çalışmalarda Grade 41 olan Whatman kağıdı kullanılmıştır.



Şekil 3. 23. Whatman kâğıt türü optimizasyonu (A) Grade 41 için (B) Grade 1 için sonuçlar.

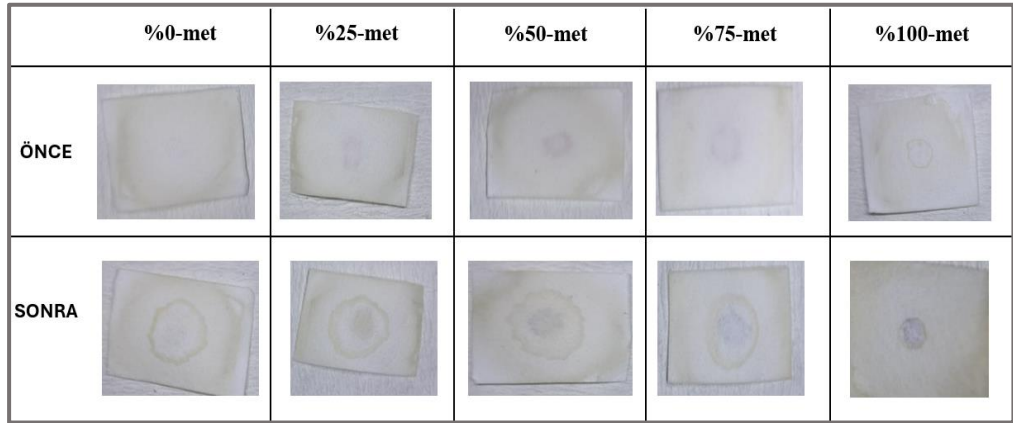
Tasarlanan biyosensör sisteminin çalışma prensibi, rezervuar kağıt yüzeyinden AuNP konjugatının, alıcı kağıda transferinin PSS ile sağlanmasına dayanmaktadır. Bu kapsamda, en iyi salımın gerçekleştirilmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda PSS (%45; 30; 15; 10,0; 5,0 ve 1,0) ile rezervuar kağıdının ıslatılmış ve AuNP uygulanmıştır. Düşük PSS konsantrasyonu durumunda AuNP'nin kağıt yüzeyinde daha çok yayıldığı görülmektedir (Şekil 3.24A). Bu yayılma durumu sonucunda, alıcı kağıdın yüzeyine AuNP'nin geçişi zorlaşmaktadır. Ardından alıcı kağıt yüzeyine bastırılmıştır. Rezervuar kağıda, whatman kağıdı üzerine bastırılmadan önce ve sonra olmak üzere AuNP'nin uygulandığı alanlara renk analizi yapılmıştır. Bastırılmadan öncesi ve sonrasında arasında yapılan renk analizi farkı hesaplanmıştır. En iyi sonuç %30 PSS ile sağlandığı görülmektedir (Şekil 3.24B). Bu nedenle sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere optimum PSS konsantrasyonu %30 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 24. PSS konsantrasyon optimizasyonu (A) rezervuar kağıdına AuNP eklendiğinde durum, (B) alıcı kağıda rezervuar kağıt bastırıldıktan sonra renk değişim farkı.

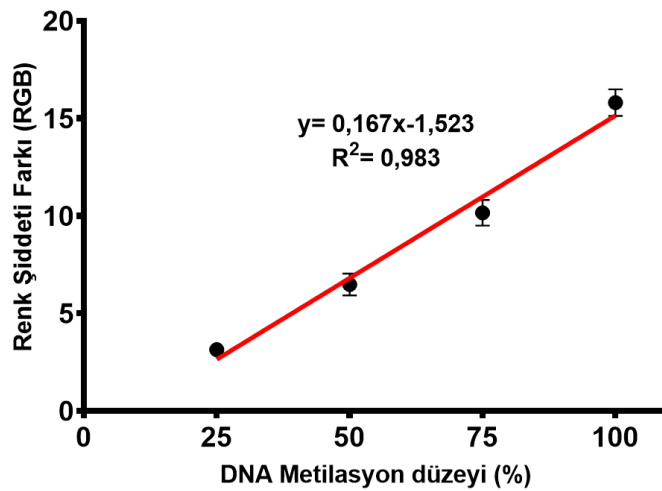
3.2.3. Sensör platformunun analitik özellikleri

Tasarlanan optik sensör sisteminde amino uçlu PNA ile farklı metilasyon derecelerine sahip olan mSEPT9 fragmentleri ile hibritize edildikten sonra AuNP/PEG ile konjuge edilmiştir. Ardından konjugatlar, rezervuar kağıdı olarak %30 PSS ile ıslatılmış kağıtlara damlatılmıştır. 5-mC Ab ile modifiye edilmiş alıcı kağıt, PBA-BSA ile ıslatıldıktan hemen sonra rezervuar kağıda bastırılmış ve alıcı kağıda AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatının geçmesi için beklenmiştir. Kurumanın hemen sonrasında alıcı kağıtların fotoğrafları çekilmiştir. Aynı şekilde AuNP/PEG/PNA/mSEPT9 konjugatının alıcı kağıda geçmesi ardından rengin daha belirgin şekilde gözlemlemesi ve renk analizinin daha iyi sonuç vermesi için gümüş arttırıcı kit kullanılmış ve hemen ardından tekrar fotoğraf çekilmiştir. Gümüş ile zenginleştirme yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra alıcı kağıttaki renk değişimleri Şekil 2.25’de paylaşılmıştır. Zenginleştirme sonrasında AuNP’den kaynaklanan renk değişimi daha belirgin gözlemlenmiştir. Bu nedenle bundan sonraki deneysel adımlarda gümüş ile zenginleştirme işlemi yapılmıştır.



Şekil 3. 25. Gümüş zenginleştirme işlemi öncesi ve sonrasında alıcı kağıttaki renk değişimleri.

Gümüş ile zenginleştirme sonrasında tasarlanan ev yapımı kutu içerisinde fotoğrafları çekilmiş ve Image J ile renk analizleri gerçekleştirilmiştir. Metilasyon yüzdelere bağlı olarak, AuNP konjugatı alıcı kağıt yüzeyindeki 5-mC Ab üzerine farklı miktarlarda geçiş sağlamıştır. Farklı oranlarda meydana gelen bu geçiş, analiz sonrasında farklı RGB renk şiddetlerine sebep olmuştur. 5-mC Ab ile %25, 50, 75 ve 100 metillenmiş SEPT9-PNA hibridizasyonu sonucu elde edilen RGB renk şiddetleri metillenmemiş (%0) SEPT9-PNA ile elde edilen RGB renk şiddetinden çıkarılarak bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3. 26. Tasarlanmış sensör platformunun mSEPT9 fragmentlerine verdiği yanıtla ilişkin kalibrasyon grafiği.

Tasarlanan optik biyosensör platformu için LOD değerinin belirlenmesi için %50 metilasyon oranına sahip SEPT9 fragmenti ile 5 farklı test gerçekleştirilmiş ve standart sapması hesaplanmıştır. [(3X Standart sapma) / m

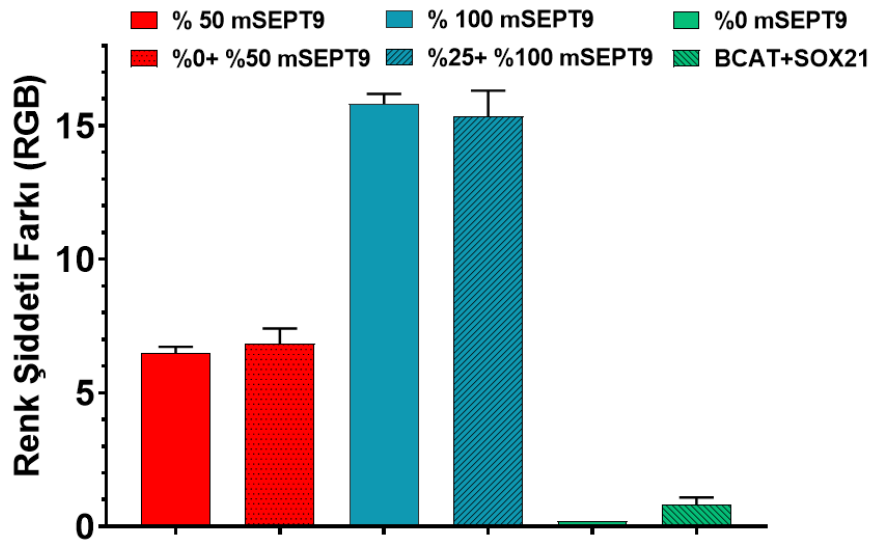
değeri] formülü ile LOD değeri %1,904 olarak belirlenmiştir. LOD değerine ek olarak tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Tasarlanan optik biyosensör sistemi için belirlenmiş olan tüm analitik parametreler Tablo 3.9'da özetlenmiştir.

Tablo 3. 9. Tasarlanan biyosensör sistemi için bazı analitik parametreler.

Analitik Parametreler	Değerler
Lineer Aralık (% Metillenme miktarı)	25-100
Eğim	0,167
Eğim Standart Sapması	0,015
Kesim Değeri	1,523
Kesim Değeri Standart Sapması	1,050
Korelasyon Katsayısı	0,983
Tekrarlanabilirlik ($\pm$ Standart Sapma)	0,106
Varyasyon Katsayısı (%)	0,069
Dedeksiyon Limiti (LOD) (% Metillenme miktarı)	1,904

3.2.4. Girişimci denemeleri

Tasarlanan optik biyosensör sisteminin mSEPT9 seçimliliğinin belirlenmesinin amacıyla %0 ile %50 mSEPT9 fragmenti ve %25 ile %100 mSEPT9 fragmentleri ve BCAT ile SOX21 fragmentlerinin karışımı, amino fonksiyonlu PNA ile hibridize edilmiştir. Ardından AuNP/PEG ile konjuge edilerek standart prosedür ile tasarlanan biyosensör sistemine uygulanmıştır. Elde edilen renk değişimleri, %50, %100 ve %0 mSEPT9 cevapları ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslanmış ve Şekil 3.27'de verilmiştir.



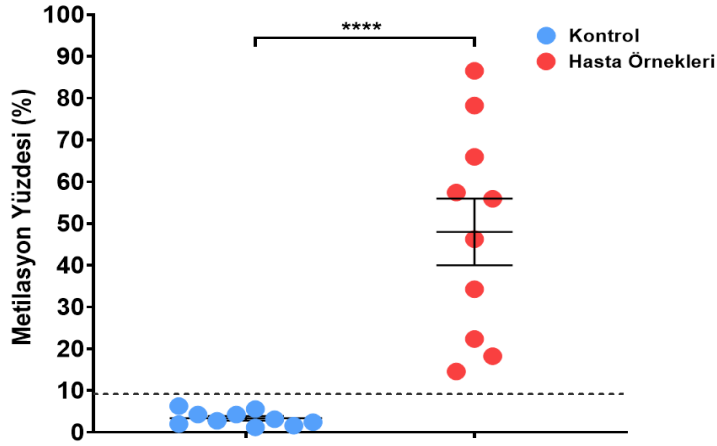
Şekil 3. 27. Optik biyosensör sisteminin girişimci molekül olarak seçilmiş olan fragment karışımlarına verdiği yanıt.

Optik biyosensör sistemine uygulanan %0 ile %50 mSEPT9 fragment karışımının verdiği yanıt, %50 mSEPT9'a verdiği yanıt ile karşılaştırılmıştır. Buna göre biyosensörden %105,79 cevap alınmıştır. %25 ile %100 mSEPT9 fragment karışımlarına verdiği yanıt ile %100 mSEPT9 fragmentine verdiği yanıt karşılaştırılmış ve sensörün %97,11 cevap verdiği belirlenmiştir. BCAT, SOX21 fragmentleri ile oluşturulan karışım ile elde edilen sonuçlar ise %0 mSEPT9 fragmentlerine sensör sisteminden alınan yanıt ile karşılaştırılmış ve sensörün %18,33 cevap verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan optik biyosensör sisteminin mSEPT9 fragmentlerine karşı spesifik olduğunu kanıtlar niteliktedir.

3.2.5. Örnek uygulama sonuçları

Tasarlanan optik biyosensörün hasta örneklerinde çalışılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla kolon kanseri hastalarından toplanan 10 adet plazma örneği ve 10 adet kontrol örneği, optik biyosensör sistemine uygulanmış ve örnekler içerisindeki metilasyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.28'e verilmiştir. Geliştirilen sensörün cut-off değeri 9,617 olarak belirlenmiş ve şekil üzerinde çizgiyle gösterilmiştir. Bu değerin altında, herhangi bir hasta örneği için sonuç belirlenmemiştir. Bu durum sensör sisteminin, kontrol

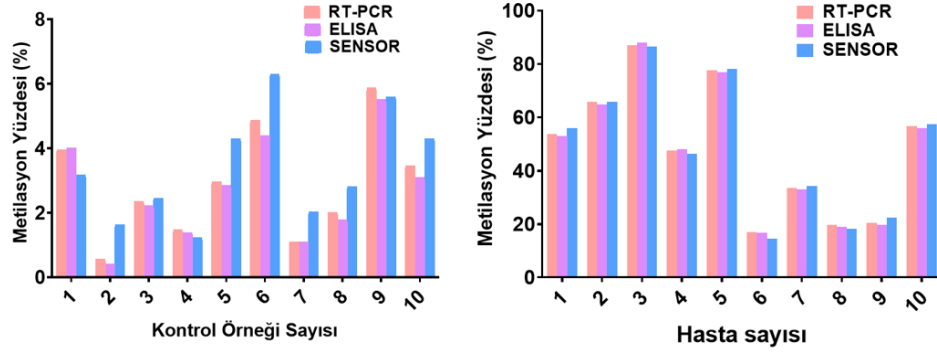
ve hasta örneklerinde mSEPT9'u başarıyla ayırt ettiği göstermektedir. İki grup arasındaki metilasyon yüzdeleri arasındaki farklılıklar Mann-Whitney testi kullanılarak test edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,0001$).



Şekil 3. 28. Kontrol grubu ve hasta örneklerinin tasarlanan optik biyosensör sistemi ile mSEPT9 yüzdeleri (****: $p<0,0001$).

3.2.6. Doğrulama çalışmaları

Tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla, elektrokimyasal biyosensör sistemi ile benzer olarak, ELISA ve RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3. 29'da verilmiştir. Sonuçlara göre tasarlanan biyosensör sistemi ile RT-PCR ve ELISA sonuçları birbirine benzer ve pozitif korelasyon göstermiştir. Bu sonuçlara göre tasarlanan optik biyosensör sisteminin hasta örneklerinde mSEPT9 dedeksiyonu için kullanılabileceği ve elde edilen sonuçların doğruluğunun yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 3. 29. RT-PCR, ELISA ve optik biyosensör sistemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması (A) Kontrol grubu (n=10), (B) Hasta örnekleri (n=10).

3.3. Bölüm-3: “miRNA-221 ve 222’nin Analizine Yönelik PNA Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”

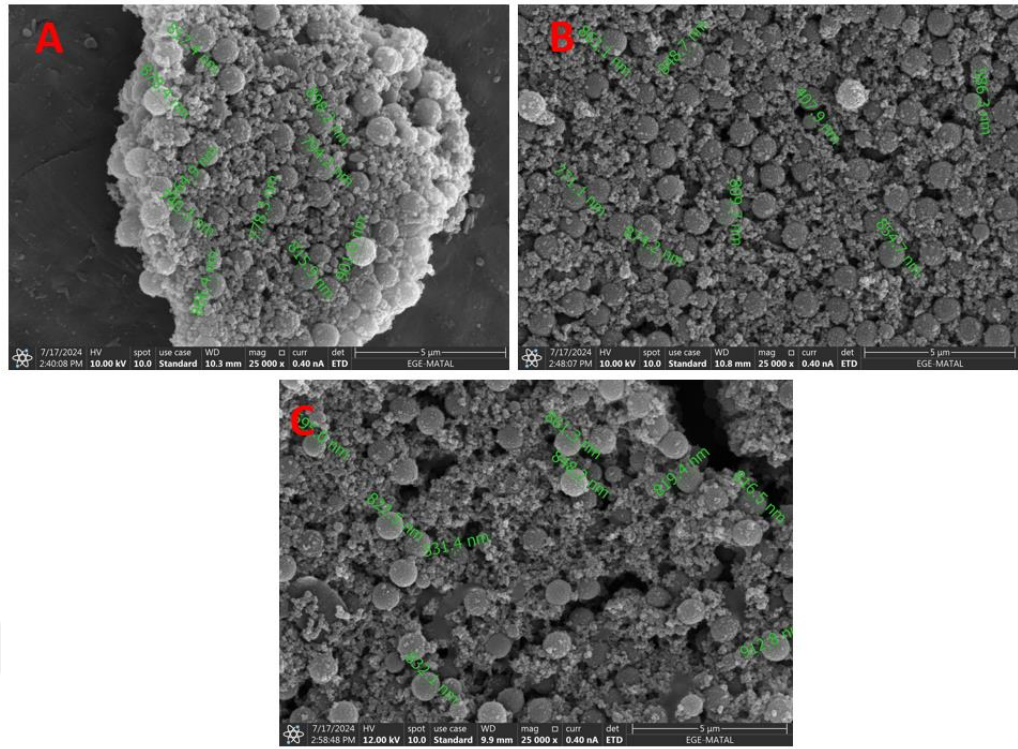
Bu bölümde miRNA-221 ve 222 dedeksiyonu için 4 farklı PNA probu ve 4 farklı miRNA sekansı tasarlanmıştır. İlgili PNA fragmentleri ve miRNA sekansları ile denemeler gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmaya çalışılmıştır. Elde edilen en iyi PNA ve miRNA çifti ile çalışmalara devam edilmiştir. Tablo 3. 10’da gerçekleştirilen denemeler ve tasarlanan biyosensör sistemlerinin çalışma durumları özetlenmiştir. Bu kapsamda miRNA221 ve 222 için iki farklı elektrokimyasal biyosensör sistemi tasarlanmıştır.

Tablo 3. 10. Tasarlanan PNA ve miRNA fragmentleri ile gerçekleştirilen elektrokimyasal sensör platformları ve çalışma durumları.

PNA Fragmentleri	miRNA Sekansları	Çalışma durumu
PNA1: PNA-mir221-5p	miR-221-5p	X
	miR-221-3p	X
PNA2: PNA-miR221-3p	miR-221-5p	√
	miR-221-3p	X
PNA3: PNA-miR222-5p	miR-222-5p	X
	miR-222-3p	√
PNA4: PNA-miR222-3p	miR-222-5p	X
	miR-222-3p	X

3.3.1. MB karakterizasyonu

Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin tasarımında kullanılan MB/PNA/miRNA konjugatlarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında, her konjugat adımı SEM ve boyut ölçümü analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.30’da verilmiştir.



Şekil 3. 30. MB/PNA/miRNA konjugatına ilişkin SEM görüntüleri A) Sadece MB; B) MB/PNA; C) MB/PNA/miRNA.

Benzer şekilde her adımda boyut ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3. 11’de verilmiştir.

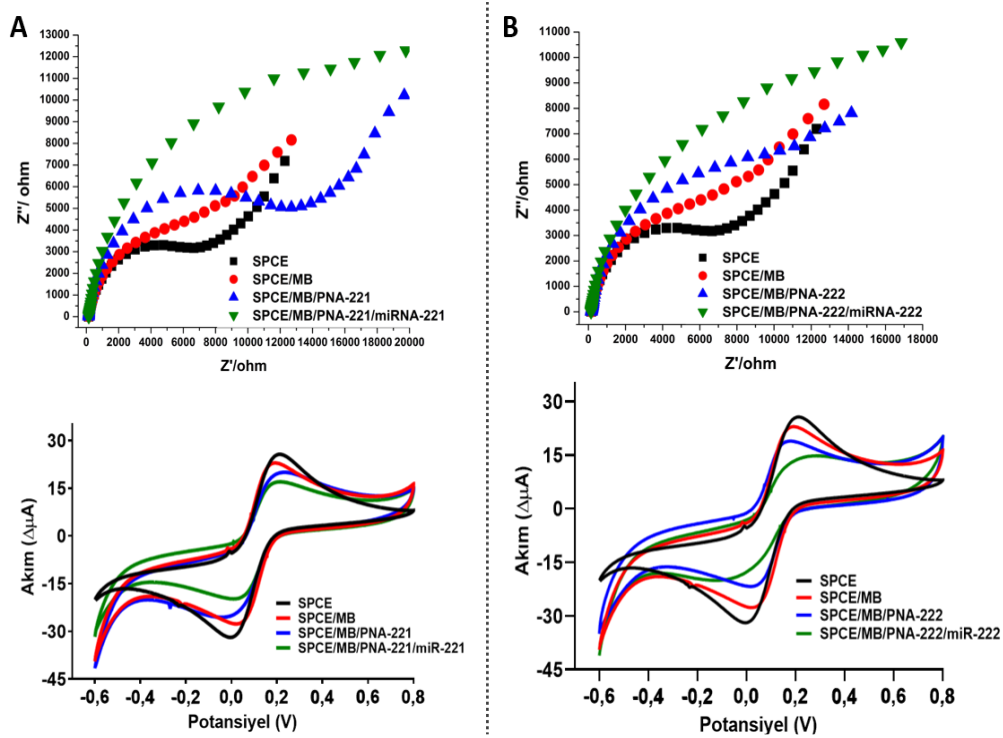
Tablo 3. 11. Her modifikasyon adımına ilişkin boyut ve zeta potansiyel sonuçları.

	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SD	Boyut (d.nm) $\pm$ SD	PDI
MB	-8,3 $\pm$ 3,71	799,02 $\pm$ 10,3	0,139
MB/PNA	2,48 $\pm$ 4,20	809,98 $\pm$ 26,1	0,102
MB/PNA/miRNA	5,19 $\pm$ 2,43	831,18 $\pm$ 34,4	0,291

Elde edilen SEM ve DLS sonuçları birbiri ile uyumlu olmakla birlikte, başarılı şekilde MB ile PNA ve miRNA konjugasyonunun yapıldığını kanıtlar niteliktedir.

3.3.2. Sensör platformunun yüzey karakterizasyon sonuçları

miRNA 221 ve 222 dedeksiyonu için benzer stratejiler ile tasarlanmış olan iki biyosensör platformunun yüzey karakterizasyonu için CV and EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her modifikasyon adımından sonra ölçümler gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.31A'da ki CV ve EIS pikleri miRNA221 için tasarlanmış platforma ait iken, B'deki pikler miRNA222 için tasarlanmış biyosensöre aittir. Ayrıca CV ve EIS sonuçlarının sayısal değerleri Tablo 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3. 31. miRNA221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanmış olan PNA temelli elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin CV ve EIS sonuçları (A) miR221, (B) miRNA222 (CV ölçümleri, 50 mV/s tarama hızında -0,6 V ile +0,8 V arasında potansiyel aralığında, EIS ölçümleri ise 0,18V'da 0,02 Hz ile 10 Hz akım aralığı gerçekleştirilmiştir.)

Tablo 3. 12. miRNA221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanmış olan biyosensör sistemlerinin CV piklerinin katodik, anodik pik değerleri ve impedans piklerinin ohm değerleri.

	Katodik Pik Akım değerleri (μA)	Anodik Pik Akım Değerleri (μA)	Ohm (Ω)
Boş SPCE	25,663	-31,891	50,88
SPCE/MB	22,953	-27,653	29,39
SPCE/MB/PNA2	20,013	-25,581	26,28
SPCE/MB/PNA2/miR-221-5p	17,031	-19,793	18,07
SPCE/MB/PNA3	18,901	-21,764	20,35
SPCE/MB/PNA3/miR222-3p	14,401	-20,051	19,75

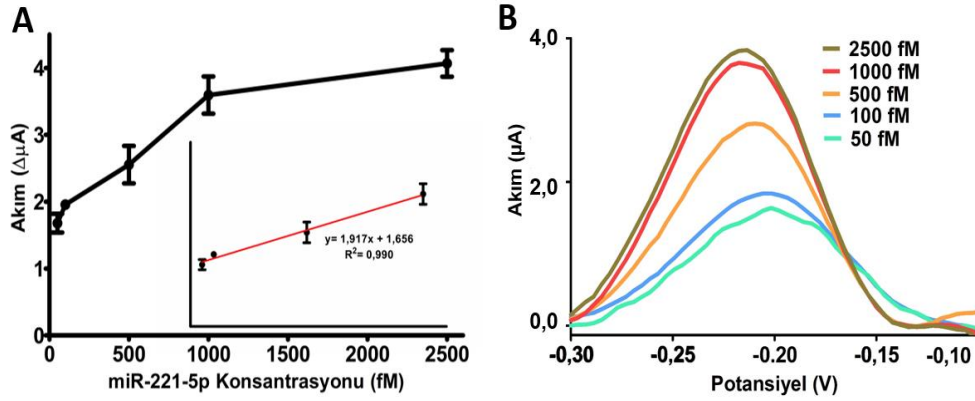
Her iki elektrokimyasal biyosensör sisteminde, her modifikasyon adımı CV piklerinde düşüş gözlemlenmiştir. Bunun nedeni her adımdan sonra, yüzeydeki grupların daha hacimli olması ile elektrokimyasal hücrede bulunan elektronların, elektrot yüzeyine ulaşmasında yaşanan zorluktur. Benzer şekilde EIS piklerindeki artışta beklenen bir sonuçtur. Her iki ölçüm tekniği sonuçları birbiri ile tutarlı olup, yüzey modifikasyonunun başarılı şekilde gerçekleştirildiğini kanıtlar niteliktedir.

3.3.3. Sensör platformunun analitik özellikleri

PNA temelli olarak miRNA221 ve miRNA222 dedeksiyonu için benzer stratejiler ile tasarlanmış olan iki elektrokimyasal biyosensör sisteminin analitik özelliklerinin belirlenmesi için SWV tekniğinden yararlanılmıştır. PNA-miRNA hibridizasyonunun izlenmesi amacıyla hibridizasyon probu olarak Meldola's indikatörü kullanılmıştır.

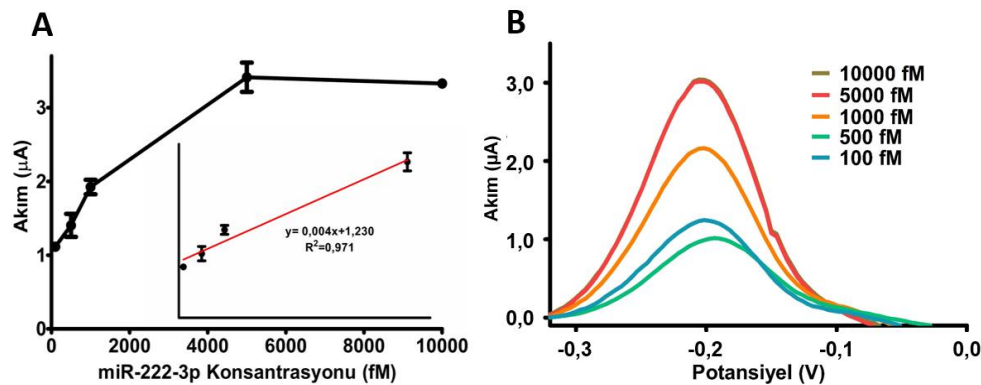
PNA2 ile MB konjugasyonu ardından farklı konsantrasyonlarda miRNA221-5p (2500; 1000; 500; 100 ve 50 fM) ile hibridize edilmiş ve SWV ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon farkına göre elde edilen SWV pikleri ve ölçülen akım değerleri ile elde edilmiş kalibrasyon grafiği Şekil 3.32'de verilmiştir. MBD sinyali 1000 fM miRNA221-5p konsantrasyonuna kadar lineer olarak artarken, sonrasında artış durmuştur. Bu durum PNA2 ile

miRNA221-5p'nin 1000- 50 fM konsantrasyon arasında ölçülebileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 32. miRNA221 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen (A) kalibrasyon grafiği (B) farklı konsantrasyonlarda miRNA221-5p için SWV pikleri (SWV ölçümleri +0,10 ile -0,40 V potansiyel aralığında, 25 mV amplitude ve 12 Hz'de 4 mV step potansiyelde gerçekleştirilmiştir.)

PNA3 ile MB konjugasyonu ardından farklı konsantrasyonlarda miRNA222-3p (10000; 5000; 1000; 500 ve 100 fM) ile hibridize edilmiş ve SWV ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon farkına göre elde edilen SWV pikleri ve ölçülen akım değerleri ile elde edilmiş kalibrasyon grafiği Şekil 3.33'de verilmiştir. MBD sinyali 10000 fM miRNA222-3p konsantrasyonuna kadar lineer olarak artarken, sonrasında artış durmuştur. Bu durum PNA3 ile miRNA222-3p'nin 5000- 100 fM konsantrasyon arasında ölçülebileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 33. miRNA222 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemi ile elde edilen (A) kalibrasyon grafiği (B) farklı konsantrasyonlarda miRNA222-3p için SWV pikleri (SWV ölçümleri +0,10 ile -0,40 V potansiyel aralığında, 25 mV amplitude ve 12 Hz'de 4 mV step potansiyelde gerçekleştirilmiştir.)

Benzer stratejiler ile tasarlanan iki biyosensör platformu için diğer analitik parametreler hesaplanmıştır. LOD değerinin belirlenmesi için her iki biyosensör sistemi için de 100 fM miRNA ile ardışık olarak 10 ayrı ölçüm alınarak, sonuçların standart sapması hesaplanmıştır. Her iki biyosensör sistemi için $[(3 \times \text{Standart sapma}) / m \text{ değeri}]$ formülü ile LOD değerleri belirlenmiştir.

Ek olarak sensör sistemleri için analitik parametre olarak tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı değerleri belirlenmiştir. Her iki miRNA ile ardışık olarak alınan 10 ayrı ölçüm sonucu ile hesaplanan tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı sonuçları ile tasarlanan biyosensör sistemleri için diğer analitik parametreler Tablo 3.13'te özetlenmiştir.

Tablo 3. 13. miRNA 221 ve 222 dedeksiyonu için tasarlanan biyosensör sistemleri için bazı analitik parametreler.

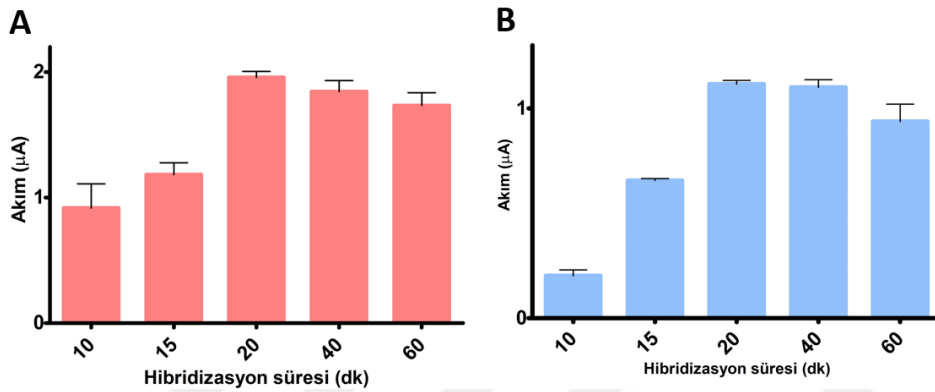
Analitik Parametreler	miRNA221-5p	miRNA222-3p
Lineer Aralık (fM)	1000-50	5000-100
Eğim	1,917	0,004
Eğim Standart Sapması	0,136	0,0005
Kesim Değeri	1,656	1,230
Kesim Değeri Standart Sapması	0,076	0,140
Korelasyon Katsayısı	0,990	0,971
Tekrarlanabilirlik ($\pm$ Standart Sapma)	0,090	0,037
Varyasyon Katsayısı (%)	3,915	2,876
Dedeksiyon Limiti (LOD) (fM)	0,141	2,775

3.3.4. Optimizasyon sonuçları

Tez kapsamında tasarlanmak istenen miRNA221 ve miRNA22 için elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin tasarımında kullanılmak üzere farklı PNA ve miRNA fragmentleri temin edilmiştir. Her bir PNA ile miRNA fragmentleri hibridizasyon yapılmaya çalışılmış ve kalibrasyon grafiği

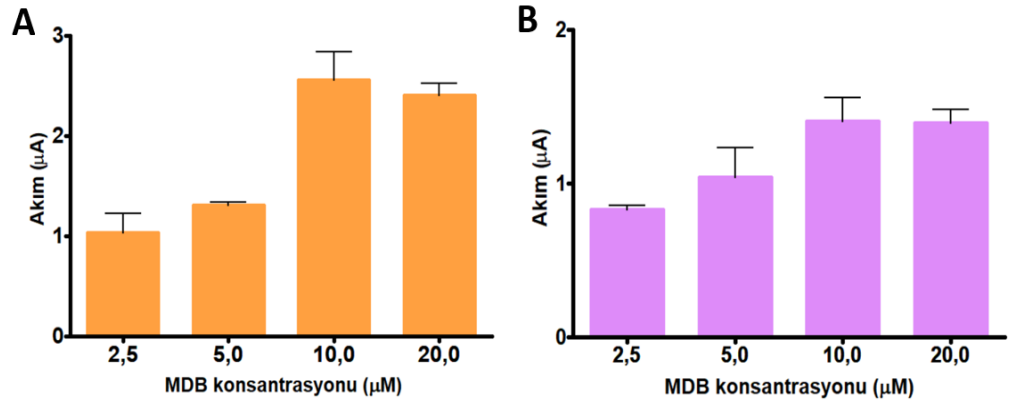
oluşturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En iyi sonuçlar PNA2- miRNA-3p ve PNA3-miRNA222-5p çifti ile elde edilmiştir.

Bir diğer gerçekleştirilen optimizasyon çalışması, PNA ile miRNA'ların hibridizasyonu için gereken süredir. Bu çalışma için PNA2 ile miRNA221-3p (100 fM) ve PNA3 ile miRNA222-5p (100 fM) fragmentleri 10; 15; 20; 40 ve 60 dk hibridize edilmiştir. Ardından MDB eklenerek, SWV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Farklı hibridizasyon süreleri ile elde edilen akım değerleri Şekil 3.34'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre hem miRNA221 hem de miRNA222 sensörleri için optimum hibridizasyon süresi 20 dk. olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 34. miRNA ve PNA'ların hibridize edilmesi için optimum inkübasyon süresi (A) miRNA221, (B) miRNA222

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, PNA2 ile miRNA221-3p (500 fM) ve PNA3 ile miRNA222-5p (500 fM) fragmentleri hibridize edildikten sonra, farklı MDB konsantrasyonları (2,5; 5,0; 10 ve 20 μ M) ile SWV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen akımlardan yararlanılarak optimum MDB konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 3.35). Her iki sistemde de, 10 μ M MDB konsantrasyonu ile en yüksek akım değerleri elde edilmiştir. Bu nedenle optimum MDB derişimi 10 μ M olarak belirlenmiş ve çalışmalar için bu konsantrasyon kullanılmıştır.



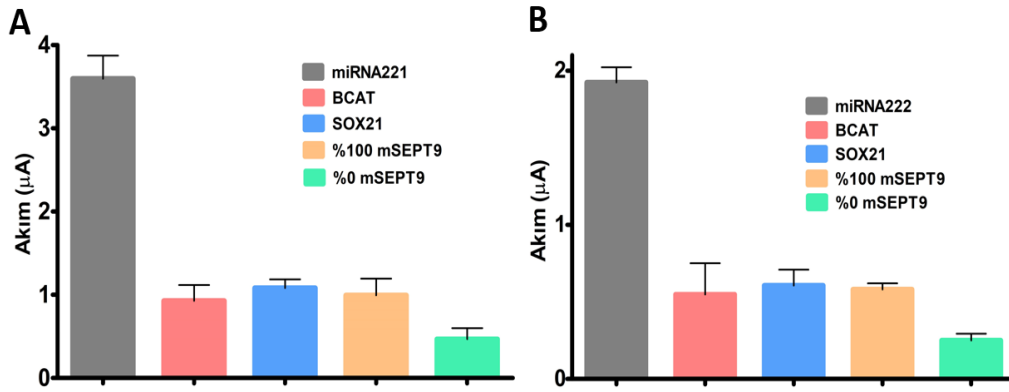
Şekil 3. 35 . Optimum MDB konsantrasyonu (A) miRNA221, (B) miRNA222.

3.3.5. Girişimci denemeleri

Tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde, miRNA 221 için PNA2, miRNA222 için PNA3 dizisi kullanılmıştır. Biyosensör sistemlerinin miRNA fragmentlerine spesikliğinin belirlenmesi için PNA2 ve3 fragmentleri ile tasarlanan sistemlere 1000 fM konsantrasyonlarda hazırlanmış olan

- %0 mSEPT9
- %100 mSEPT
- BCAT ve
- SOX21 hibridize edilerek SWV ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

PNA2 için elde edilen sonuçlar 1000 fM miRNA221 ile PNA3 ile elde edilen sonuçlar ise miRNA222 ile karşılaştırılmış ve yüzde hesaplaması yapılmıştır.

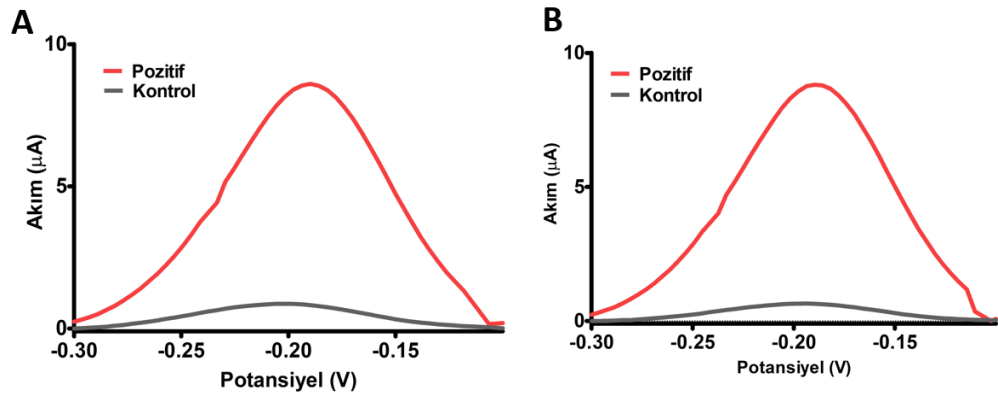


Şekil 3. 36. Her iki elektrokimyasal biyosensör sisteminin girişimci molekül fragmntlerine verdiği cevaplar (A) PNA2 için, (B) PNA3 için.

PNA2 fragmentinin girişimci moleküllere verdiği yüzdelik yanıtlar BCAT için %25,786; SOX21 için %29,09; %100 mSEPT9 için %27,622 ve %0 mSEPT9 için %12,990 olarak hesaplanmıştır. PNA3 fragmentinin ise girişimci moleküllere verdiği yüzdelik yanıtlar BCAT için %28,482; SOX21 için %29,497; %100 mSEPT9 için %29,197 ve %0 mSEPT9 için %12,993 olarak hesaplanmıştır Hesaplanan yüzdelerin %30 aşağısında olması PNA2 ve PNA3 fragmentinin miRNA'lar için spesifik olduğunu kanıtlamaktadır.

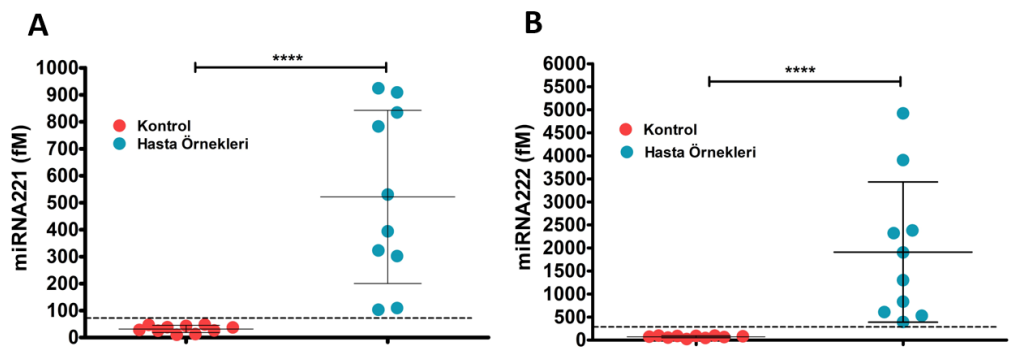
3.3.6. Örnek uygulama sonuçları

Kolon kanseri hastalarından ve kontrol grubundan toplanmış olan plazma örneklerinden RNA izolasyonun ardından, PNA2 ve PNA3 ile konjuge edilmiş MB'ler ile hibridize edilmiş ve elektrot yüzeyine uygulanmıştır. Pozitif ve kontrol örnekleri için elde edilen SWV pikleri Şekil 3.37'de verilmiştir. Hem PNA2 (Şekil 3.37A), hem de PNA3 (Şekil 3.37B) için pozitif hasta örnekleri için elde edilen piklerin akım şiddeti oldukça fazla iken, kontrol grubu ile elde edilen piklerin akımı düşüktür. Bu durum beklenen bir durumdur. Pozitif hasta örnekleri içerisinde bulunan kanser belirteçlerinin (miRNA 221 ve miRNA222) PNA fragmentleri ile hibridizasyonu, kontrol gruplarına göre daha fazladır. Hibridizasyon sonucu oluşan PNA/RNA sarmalı arasına giren MDB miktarı ile orantılı olarak akım değişimi meydana gelmektedir. Buna göre pozitif örnekleri ile elde edilen piklerin akım şiddeti, kontrol grubununkine göre fazla olmalıdır.



Şekil 3. 37. Pozitif ve kontrol örnekleri için SWV pikleri (A) PNA2 için, (B) PNA3 için.

Kolon kanseri hastalarından toplanan 10 adet plazma örneği ve kontrol grubu, PNA2 ve PNA3 ile tasarlanmış olan biyosensör sistemlerine uygulanmıştır. Örnekler içerisindeki miRNA miktarları, elde edilen kalibrasyon grafikleri yardımıyla hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların dağılımı Şekil 3.38’te verilmiştir. PNA2 biyosensörün cut-off değeri 99,561 iken, PNA3 biyosensörünün cut-off değeri 321,561 olarak belirlenmiştir. Değerler şekiller üzerinde çizgiyle gösterilmiştir. Bu değerın altında, herhangi bir hasta örneği için sonuç belirlenmemiştir. Bu durum her iki biyosensör sisteminin, kontrol ve hasta örneklerinde miRNA221 ve miRNA 222’yi başarıyla ayırt ettiğini göstermektedir. İki grup arasındaki farklılıklar Mann-Whitney testi kullanılarak test edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$).



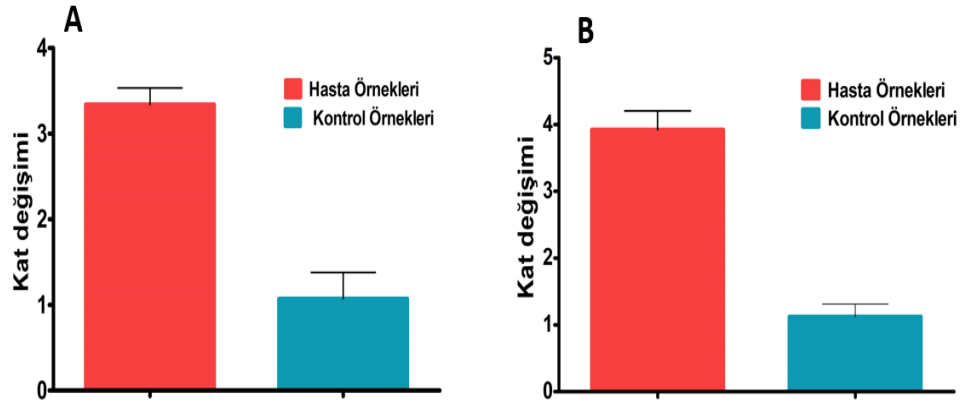
Şekil 3. 38. Kontrol ve pozitif plazma örnekleri sonuçları, (a) miRNA221, (B) miRNA222 için.

3.3.7. Doğrulama sonuçları

Biyosensörler ile elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla RT-PCR kullanılmıştır. Plazma örnekleri içerisindeki miRNA221 ve 222'e ek olarak kontrol örnekleri için hesaplanan ΔC_T değerleri Tablo 3. 13'te verilmiştir. Tüm örneklerin ortalama değerlerine göre kat değişimi ($2^{\Delta\Delta C_T}$) hesaplanmış ve Şekil 3.39'da sonuçlar paylaşılmıştır.

Tablo 3. 14. Hasta ve kontrol örnekleri için belirlenen ΔC_T değerleri (H: hasta örnekleri; K: kontrol örnekleri)

ΔC_T (miR 221)	ΔC_T (miR 222)	ΔC_T (miR 221)	ΔC_T (miR 222)		
H1	2,44	2,12	K1	1,20	0,28
H2	2,05	3,63	K2	1,76	1,39
H3	3,09	3,81	K3	1,92	1,49
H4	2,90	3,01	K4	2,01	2,49
H5	2,42	2,78	K5	0,79	1,30
H6	3,13	3,29	K6	1,30	0,40
H7	3,08	2,49	K7	0,78	0,85
H8	4,59	4,29	K8	0,48	0,29
H9	3,36	2,19	K9	2,19	1,93
H10	4,05	3,91	K10	1,29	1,39



Şekil 3. 39. Hasta plazma örneklerinin RT-PCR sonuçları ışığında miRNA 221 ve 222 düzeyinin kontrol örneklerine göre kat değışim sonuçları (A) miRNA 221 için, (B) miRNA 222 için.

4. TARTIŞMA

Kolorektal kanseri, dünya çapında en çok görülen ve teşhis edilen üçüncü, mortalite açısından ikinci kanser türüdür. Erken tanı tüm kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanser içinde önemli olmakla birlikte, erken tanı alan hastalar başarılı bir tedavi süreci geçirmekte ve sağ kalım oranı artmaktadır. Günümüzde, tanı için kolonoskopi gibi invazif yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler lezyonları son derece hassas bir şekilde tespit ederken, aynı zamanda da pahalıdır. Dahası, işlem öncesinde kapsamlı hazırlık gerektirmektedir. Bu nedenle dışkıda gizli kan testi, immünokimyasal test gibi invazif olmayan yaklaşımlar, daha çok tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin de duyarlılığı kısıtlıdır. Bu nedenle, araştırmalar, hastalığın çok erken evresinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, invaziv olmayan tarama prosedürlerinin ve araçlarının geliştirilmesine odaklanmaktadır. Klinik uygulamalar için, vücut sıvılarında veya invazif olmayan bir şekilde toplanan örneklerde (dışkı, idrar, tükürük) duyarlılığı ve doğruluğu yüksek, spesifik sonuçlar veren, kullanımı kolay, taşınabilir sistemler olan biyosensörler üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır (Balaban Hanoglu et al., 2023). Biyosensör sistemlerinin geliştirilmesinde biyoreseptör molekül olarak aptamer (Celikbas et al., 2019b), antikör (De Matos et al., 2010), nükleik asit (Du & Dong, 2017), peptit (Balaban Hanoglu et al., 2024) gibi farklı yapıların kullanımı söz konusudur. Tez çalışması kapsamında avantajlı özellikleri nedeniyle, biyoreseptör molekül olarak peptitler kullanılmıştır.

Biyosensör sistemlerinde biyoreseptör olarak antikörlerin kolay bulunabilmesi ve basit prosedürlerle uygulanabilmesi gibi bazı avantajlı özellikleri olmasına rağmen, peptitler ile kıyaslandığında sentez, modifikasyon, üretim maliyetleri ve sınırlı raf ömrü gibi sınırlamalar söz konusudur. Hedef analitler ve peptitler arasındaki etkileşim, antikörler ve antijenler arasındaki etkileşime benzemektedir. Antikörlerin aksine peptitler, hedefe uyarlanabilen küçük ve akıllı bir yapılardır (M. Wang et al., 2022). Peptitler kimyasal olarak sentezlenebilirken, antikörler *in vivo* koşullar gerektiren karmaşık sentez yöntemleri gerektirir. Ayrıca peptitler, sentez basitliği ve düşük maliyetin yanı

sıra daha yüksek verim açısından avantajlar sunar (Sfragano et al., 2021). Peptit molekülleri, fonksiyonel grup eklenmesinde çok yönlülük sunarak, amino ve karboksil grupları gibi fonksiyonel gruplar aracılığıyla elektrot yüzeylerine tek adımda stabil ve homojen bağlanmayı kolaylaştırır. Ayrıca bu fonksiyonel gruplar aracılığıyla hasta örnekleri içerisindeki hedef analitler ile etkileşim artırılabilir. Bu şekilde, karmaşık insan örneklerinden hedef analitin tespiti ve miktarının belirlenmesi kolaylaştırılabilir (M. Wang et al., 2022). Benzer şekilde biyoreseptör olarak enzimler ve peptitler karşılaştırıldığında, peptit moleküllerinin avantajlı olduğu bilinmektedir. Enzimler pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı hassastır, bu da onları kritik çalışma koşullarında daha az güvenilir hale getirmektedir (Bazin et al., 2017).

Antikorların yanı sıra nükleik asitlerin ve aptamerlerin biyotanıma molekülleri olarak kullanılması alternatif bir yaklaşımdır. Ancak aptamerler ve nükleik asitler gibi molekülleri peptitlerle karşılaştırmak zordur (Sfragano et al., 2021). Aptamerler ve nükleik asitler, peptitlere benzer şekilde hedefli bir şekilde sentezlenebilen küçük moleküllerdir (Pfeiffer & Mayer, 2016). Bununla birlikte peptitler, kendini oluşturan amino asitlerin farklı yan grupları ve bunların kombinasyonları nedeniyle farklı özellikler sergilemektedir. Aptamerler ve nükleik asitlerle karşılaştırıldığında, peptitlerin hidrofobik ve hidrofilik yan grupları yapının kendi kendine birleşmesini sağlayarak, hedef analite stabilite ve afinitelerini artırır (M. Wang et al., 2022). Ek olarak kısa yapılı peptit molekülleri sterik engeli ortadan kaldırabilir ve elektrokimyasal duyarlılığı artırabilir (G. Wang et al., 2018). Bu biyoreseptörler karşılaştırırken, hedeflenen moleküller için farklı üretim süreçlerinin seçimi gibi farklı parametrelerde dikkate alınmalıdır. Farklı koşullar için en iyi biyoreseptörün seçimi ve tahmin edilmesi oldukça zordur. Farklı biyoreseptörlerin değerlendirilmesi, hedefin seçilmesi, biyosensörün tasarlanması, seçicilik ve özgüllük gibi analitik parametrelerin belirlenmesi ve karşılaşılan sorunlara çözüm bulunması açısından oldukça önemlidir (Sfragano et al., 2021). Peptitlerin elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde kullanılması, sentez basamaklarında karşılaşılan bazı zorluklar dışında diğer biyoreseptörlere göre avantajlıdır. Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde peptitlerin biyoreseptör

olarak kullanılmasının güçlü ve zayıf yönleri, SWOT (Güçlü Yönler, Zayıf Yönler, Fırsatlar ve Tehditler) analizi ile Şekil 4.1'de değerlendirilmiştir (Balaban Hanoglu et al., 2024).



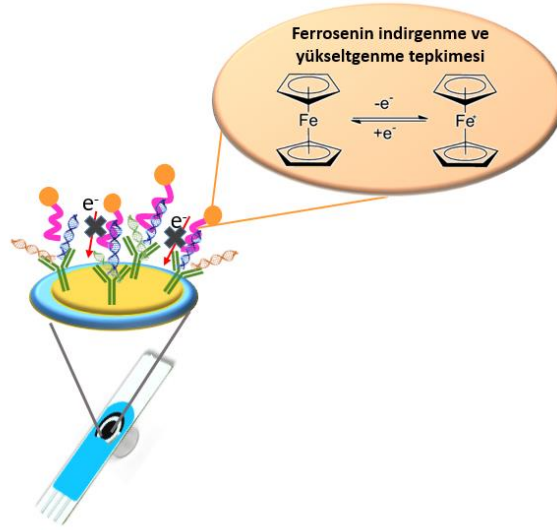
Şekil 4. 1. Peptit biyoreseptörleri için SWOT analizi.

Tez çalışmasında kolorektal kanser dedeksiyonu için kullanılabilecek olan biyosensör sistemlerinin tasarımında, vücut sıvılarında veya invazif olmayan bir şekilde toplanan örneklerde (dışkı, idrar, tükürük) tespit edilebilen belirteçler temel alınmıştır. Bu açıdan, öncelikle klinik olarak kullanımı ispatlanmış metillenmiş DNA biyobelirteci olan SEPT9, hedef analit olarak seçilmiştir. İyi bilinen metilasyon biyobelirteci olan SEPT9 dedeksiyonuna dayanan ve ticari olarak satışta bulunan testler mevcuttur (Tablo 4.1). Önerilen kitler, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmakla birlikte, maliyetlerinin yüksek olması ve sonuç alma sürelerinin uzun olması nedeniyle rutinde kullanımları zordur. Bu nedenle halen hızlı test sistemlerine ihtiyaç vardır. Tez kapsamında mSEPT9 dedeksiyonu için geliştirilmiş olan elektrokimyasal ve optik biyosensör sistemleri ile bu ihtiyaca cevap vermek amaçlanmıştır.

Tablo 4. 1. Ticari mSEPT9 dedeksiyon kitleri.

Adı	Örnek Tipi	Çalışma prensibi
Epi (Epigenomics)	proColon Plazma	Bisülfid dönüşümü
ColoVantage Diagnostics)	(Quest Plazma	RT-PCR
RealTime mS9 (Abbott)	Kan	RT-PCR

Tez kapsamında mSEPT9 dedeksiyonu için geliştirilen elektrokimyasal biyosensör sisteminde metilasyon seviyelerini tespit etmek için MNP'lerin, 5-mC Ab antikorun ve peptit moleküllerinin yardımıyla bir hibridizasyon sisteminin kullanımı söz konusudur. Bu sistemde, peptitler ile DNA'nın kolay hibridizasyon ve kolay modifikasyon özelliğinden yola çıkılarak ferrosen işaretli PNA'nın kullanımı biyosensörün çalışma prensibinde kolaylık sağlanmıştır. SEPT9 fragmentlerinin metilasyon yüzdesi ile bağlantılı olarak hibridize edilmiş PNA-DNA çiftleri, 5-mC Ab'ler tarafından yüzeye bağlanmıştır. Metilasyon miktarının artması ile PNA-DNA hibridizasyonu artmış ve dolayısıyla PNA'nın terminal ucundaki ferrosende meydana gelen indirgenme-yükseltgenme tepkimesi sonucu açığa çıkan elektron, elektrot yüzeyine ulaşamamıştır. Bu durumda elektrokimyasal pikte farklanmaya neden olmuştur (Şekil 4.2). Ayrıca ferrosen işaretli PNA'lar sayesinde, ölçüm alınacak elektrokimyasal hücreye redoks probu koyma gereksinimi ortadan kaldırılmış, dolayısıyla hazırlanan hücrelerin raf ömrü uzatılmıştır. Ek olarak elektrot yüzeyinin 5-mC Ab ile modifiye edilmiş MNP'lerin tek bir adımda (bir mıknatıs yardımıyla) elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile yüzey hazırlama süresi kısaltılmıştır (Hanoglu et al., 2022).



Şekil 4. 2. Ferrosen işaretli PNA ile mSEPT9 dedeksiyonu için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sisteminin çalışma prensibi.

Benzer şekilde mSEPT9 dedeksiyonu için AuNP'lerin kolorimetrik özellikleri kullanılarak, 5-mC Ab antikorun ve peptit moleküllerinin yardımıyla bir optik biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Bu sistem, spot test sistemi olarak tasarlanmış ve kolay kullanımı temel alınmıştır. Elektrokimyasal biyosensör ile benzer bir strateji ile PNA-metillenmiş DNA hibridizasyonu ardından 5-mC Ab'ye bağlanma üzerine kurulmuş prosedürde, renk değişiminin gözlemlenmesi için AuNP'ler kullanılmıştır. İki kâğıdın birbiri üzerine bastırılması ve konjugatın kağıtlar arasında transferi sonucu, oluşan renk değişimi analiz edilmiştir. Bu sistemde, alıcı kâğıda geçen AuNP konjugatlarının renklerinin gözlemlenmesi amacıyla gümüş ile zenginleştirme yapılmıştır. Bu teknik, nanoparçacıkların boyutunu büyütürken, rengi daha görülebilir hale getirmek için kullanılmaktadır. Uygulanan gümüş, altın etrafında birikmekte ve bir çekirdek oluşmasına sebep olmaktadır. Ancak gümüş ile uzun süre inkübasyon, çökme ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle inkübasyon süresi oldukça önemlidir. Ayrıca AuNP'lerin PEG ile kaplanması, PEG'in biyoyumluluğu artırması sonucunda agregat oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (Tremi et al., 2021). Tasarlanan biyosensör sisteminin, günümüzde herkesin aktif şekilde kullanımında olan

akıllı telefonlar ile analiz imkânı sağlaması bir avantaj olmakla birlikte, kullanımını kolaylaştırmaktadır.

Tez kapsamında mSEPT9 dedeksiyonu için peptit temelli iki biyosensör sistemi, literatürdeki biyosensör sistemleri ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4. 2.)

Tablo 4. 2. mSEPT9 tespiti için tasarlanmış biyosensör platformları.

Biyosensör Tipi	Biyosensör Dizayını	Örnek Tipi	Dedeksiyon Süresi	LOD	Referans
Elektrokimyasal	CDs-LEG-FET/ Prop/mSEPT9/5-mC Ab	Doku	3 saat	2,0 ng	(Dong et al., 2020)
Elektrokimyasal	SPCE/GO/L-Arg/5-mC Ab/ Fe ₃ O ₄ -TMC-Au- prob- mSEPT9	Plazma	2 saat 40 dk.	0,01 pM	(Syedmoradi et al., 2018)
Optik	AgNP-DNA mSEPT9	prob/ -	1 saat	$8,2 \times 10^{-9}$ M	(Sadeghan et al., 2021)
Optik	Prob mSEPT9/AgNP	DNA/ Kan	1 saat	$7,6 \times 10^{-8}$ M	(Sadeghan et al., 2018)
Optik	MB/5-mC mSEPT9/proteinaz K/LAMP primer/SYTO-9 boyası	Ab/ Plazma	1 saat	0,02 ng/ μ L	(Lin et al., 2021)
Elektrokimyasal	SPCE/NH ₂ -MNP-5-mC Ab/Fc-PNA/mSEPT9	Plazma	1 saat	%0,371	Bu çalışma
Optik	5-mC Ab/ PNA- mSEPT9/PEG/AuNP	Plazma	1 saat	%1,904	Bu çalışma

CDs-LEG-FET: Karbon dot-sıvı modifiyeli grafen alan etkili transistör; L-Arg: poli (L-arginin); TMC: N-trimetilkitosan; AgNP: gümüş nanoparçacık; LAMP: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon

Literatürde bulunan sistemler ile tez kapsamında tasarlanan sistemler arasındaki en temel fark, hazırlanma süresidir. Dedeksiyon için hazırlanan yüzeyin kısa sürede, stabil olarak hazırlanması oldukça önemlidir. Elektrokimyasal biyosensörlerde bu stabilite, MNP kullanımı ile

ilişkilendirilebilir. Süper paramanyetik özellikleri sayesinde oksidasyon/redüksiyon sırasında meydana gelen sinyal/gürültü oranlarını azaltabilmektedir. Ayrıca hem elektrokimyasal hem de optik sistemde 5-mC Ab kullanımı ile immüno afiniteden yararlanılmış ve yüzeylere kolay birikme sağlanmıştır. Dahası her iki sistemde bu afiniteye ek olarak PNA'ların DNA ile kolay ve stabil hibridizasyon yeteneği kullanılarak, hedefe spesiflik ve stabilite arttırılmıştır. Ayrıca tez kapsamında elektrokimyasal sistemin akıllı telefon ile entegrasyonu sağlanarak hızlı ve yerinde tespiti imkân verebilmesi adına bir PoC sisteminin tasarlanmış olması ve optik biyosensörün analizinin direkt akıllı telefonlar ile sağlanması bir diğer avantajdır.

Tez çalışmasının bir diğer kısmında ise benzer şekilde kolon kanseri epigenetik biyobelirteçlerinden olan miRNA221 ve 222 dedeksiyonu için elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Her iki miRNA için PNA fragmentleri temin edilmiştir. Sistemde diğer sistemden farklı olarak, hedef miRNA'ların örnek içerisinde spesifik olarak bağlanması hedef alınarak modifiye MB'lar kullanılmıştır. Sistem tasarımında MB kullanımı, bir miknatıs yardımıyla kolayca yüzeye modifiye edilebilmeleri ve aynı zamanda uygun yüzey modifikasyonun ardından total RNA'lar içerisinde hedef miRNA221/222'nin miknatıs yardımıyla toplanması avantaj sağlamaktadır. Dahası, PNA/miRNA hibridizasyonu üzerine kurulmuş sistemde, ölçüm için MDB kullanılmıştır. MDB, benzen türevidir ve benzen türevlerinin yük transfer araçları olarak kullanılmaktadır. MDB'nin bir ara düzenleyici olarak çalıştığı ve hibridizasyon probu olarak görev yaptığı bilinmektedir (Aladag et al., 2010). MDB'nin yapısındaki düzlemsel penoksazin halkası yoluyla, DNA'nın çift sarmalına da girebilmektedir (Reid et al., 2002). MDB, çift sarmallı yapı arasına girdiğinde, aromatik halka sayesinde elektrokimyasal olarak aktif olan merkezi, çift sarmal tarafından sarılmaz ve redoks aktivitesi için uygun hale gelir. Bu sayede MDB, elektrokimyasal temelli biyosensör sistemlerinde, bir hibridizasyon göstergesi olarak kullanılabilir (Kara et al., 2004). Bu prensip ışığında miRNA 221 ve 222 tespiti için PNA temelli biyosensör sistemlerin analizinde MDB kullanılmış ve hibridizasyon başarılı şekilde sağlanmıştır.

Bunlara ek olarak tasarlanan biyosensör platformlarının LOD değerleri oldukça düşüktür. Literatürde bulunan diğer miRNA221 ve 222 biyosensör çalışmaları ile kıyaslandığında fM seviyesinde ölçüm yapabilen biyosensör sistemi tez kapsamında tasarlanmıştır (Tablo 4.3). Bunun sebebi, birçok avantajlı özelliği olan peptit biyoreseptörlerinin kullanımı ile açıklanabilir.

Tablo 4. 3. miRNA 221 ve 222 tespiti için tasarlanmış biyosensör platformları.

Biyosensör Tipi	Biyosensör Dizayını	Örnek Tipi	Dedeksiyon Süresi	LOD	Referans
Elektrokemülüminesans	MBene/Hairpin DNA/miRNA221/T7 eksonükleaz/Cu prob DNA)	Tümör dokusu	2 saat	3,3 pM	(D. Wang et al., 2023)
Elektrokimyasal	GE/Prob/Hairpin prob/miRNA-221	Kanser hücresi	2 saat	0,6 pM	(H. Zhang et al., 2017)
Elektrokimyasal	SPCE/MB-DNA yakalama probu/miRNA222/Strep- Ap	Kanser hücresi	5 dk.	7,0 pmol/L	(Bettazzi et al., 2013)
Elektrokimyasal	SPCE/MB-PNA- miRNA221/MDB	Plazma	30 dk	0,141 fM	Bu çalışma
Elektrokimyasal	SPCE/MB-PNA- miRNA221/MDB	Plazma	30 dk	2,77 fM	Bu çalışma

MBene: iki boyutlu çok katmanlı geçiş metali brörürler; Cu NCSL: üstün yapıya sahip bakır nanokümleri; GE: altın elektrot; strp-AP: Streptavidin-alkalin fosfat-konjugatı

İlgili biyosensör sistemleri, literatürdeki diğer sistemler ile kıyaslandığında bir diğer dikkat çeken özellikte dedeksiyon süresidir. MB yardımıyla kolayca hazırlanan sistemler için 30 dk. yeterli bir süredir. Bu süreden daha kısa bir sürede ölçüm aldığı belirlenen diğer sistem ise enzim temellidir ve enzimin aktivitesi dolayısıyla ölçüm süresi 5 dk.'dır (Bettazzi et al., 2013). Diğer sistemlerden dedeksiyon süresi, LOD gibi analitik özellikler

açısından oldukça avantajlı olduğu görölen ilgili biyosensör sistemleri gelecek için umut vericidir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüz en yaygın klinik hastalıklarından biri olan kolon kanserin erken teşhisi sağ kalım ve tedavi için oldukça önemlidir. Bu açıdan, geleneksel yöntemlerin yerini alabilecek olan günümüz çalışma konularından biyosensör sistemleri oldukça popülerdir. Tez kapsamında geliştirilen biyosensör platformları ile günümüz teknolojilerine uyum sağlanarak, ileri çalışmalar ile hastanın kendi evinde, ambulanslarda, klinik laboratuvarlarda bu sistemlerinin kullanılabilirliği ve sonuçların elektronik ortamda doktora iletimi sağlanıp kolon kanserinin erken teşhisi ve tedavisini mümkün kılacak PoC sistemlerinin geliştirilmesi temel alınmıştır. Buradan hareketle tez kapsamında,

- mSEPT9 dedeksiyonu için peptit temelli bir elektrokimyasal biyosensör,
- mSEPT9 dedeksiyonu için peptit temelli bir optik biyosensör,
- miRNA 221 dedeksiyonu için peptit temelli bir elektrokimyasal biyosensör ve
- miRNA 222 dedeksiyonu için peptit temelli bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Kolon kanser biyobelirteçi olan mSEPT9'un tespitine yönelik geliştirilen elektrokimyasal ve optik biyosensör sistemlerinin akıllı telefonlarla entegrasyonunun başarılı şekilde sağlanmış olması, sistemlerin PoC sistemi olarak kullanılabilirliği avantaj sağlamaktadır. miRNA dedeksiyonu için benzer stratejilerle geliştirilmiş elektrokimyasal biyosensör sistemleride PoC olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır. Tasarlanan tüm sistemlerin hasta örneklerinde başarılı şekilde kullanılması da bir diğer avantajlı taraftır. Bu sistemler, peptit temelli olarak tasarlanmış biyosensör platformlarının başında gelmektedir ve sonraki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir. Bundan sonraki çalışmaların hasta örnek çalışmalarının artırılması üzerine yoğunlaşması ile sistemlerin ticarileştirilmesi değerlendirilebilir. Dahası, ilk çalışmaları gerçekleştirilen PoC sistemi üzerine yapılacak ileri çalışmalar ile bu sistem optimize edilerek literatüre katkı sağlanabilir. Bu platformlar sadece kolon

kanseri değil, aynı zamanda diğer kanser türlerinin de erken tanısı için kullanılabilir platformlara model niteliği taşıyabilir niteliktedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agarwal, G., and Gabrani, R.,** 2021, Antiviral Peptides: Identification and Validation, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 149–168p.
- Aladag, N., Ozkan-Ariksoysal, D., Gezen-Ak, D., Yilmazer, S., and Ozsoz, M.,** 2010, An Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of the Apa I Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Using Meldola's Blue as a Hybridization Indicator, *Electroanalysis*, 22(5), 590–598 p.
- Alba-Patiño, A., Adrover-Jaume, C., and de la Rica, R.,** 2020, Nanoparticle Reservoirs for Paper-Only Immunosensors, *ACS Sensors*, 5(1), 147–153 p.
- Alfaleh, M. A., Alsaab, H. O., Mahmoud, A. B., Alkayyal, A. A., Jones, M. L., Mahler, S. M., and Hashem, A. M.,** 2020, Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside, *Frontiers in Immunology*, 11.
- Arya, S. K., and Bhansali, S.,** 2011, Lung Cancer and Its Early Detection Using Biomarker-Based Biosensors, *Chemical Reviews*, 111(11), 6783–6809 p.
- Balaban Hanoglu, S., Harmanci, D., Evran, S., and Timur, S.,** 2024, Detection strategies of infectious diseases via peptide-based electrochemical biosensors, *Bioelectrochemistry*, 160, 108784.
- Balaban Hanoglu, S., Harmanci, D., Ucar, N., Evran, S., and Timur, S.,** 2023, Recent Approaches in Magnetic Nanoparticle-Based Biosensors of miRNA Detection, *Magnetochemistry*, 9(1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Barták, B. K., Kalmár, A., Péterfia, B., Patai, Á. V., Galamb, O., Valcz, G., Spisák, S., Wichmann, B., Nagy, Z. B., Tóth, K., Tulassay, Z., Igaz, P., and Molnár, B.,** 2017, Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples, *Epigenetics*, 12(9), 751–763 p.
- Bazin, I., Tria, S. A., Hayat, A., and Marty, J.-L.,** 2017, New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins, *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 285–298 p.
- Behrendt, R., White, P., and Offer, J.,** 2016, Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Journal of Peptide Science*, 22(1), 4–27 p.
- Bettazzi, F., Hamid-Asl, E., Esposito, C. L., Quintavalle, C., Formisano, N., Laschi, S., Catuogno, S., Iaboni, M., Marrazza, G., Mascini, M., Cerchia, L., De Franciscis, V., Condorelli, G., and Palchetti, I.,** 2013, Electrochemical detection of miRNA-222 by use of a magnetic bead-based bioassay, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2), 1025–1034 p.
- Bhardwaj, R., Lightson, N., Ukita, Y., and Takamura, Y.,** 2014, Development of oligopeptide-based novel biosensor by solid-phase peptide synthesis on microchip, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192, 818–825 p.
- Borisov, S. M., and Wolfbeis, O. S.,** 2008, Optical Biosensors, *Chemical Reviews*, 108(2), 423–461 p.
- Borrebaeck, C. A. K.,** 2017, Precision diagnostics: Moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 17(3), 199–204 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Breslauer, K. J., Remeta, D. P., Chou, W. Y., Ferrante, R., Curry, J., Zaunczkowski, D., Snyder, J. G., and Marky, L. A.,** Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 8922–8926 p.
- Celikbas, E., Balaban, S., Evran, S., Coskunol, H., and Timur, S.,** 2019, A Bottom-Up Approach for Developing Aptasensors for Abused Drugs: Biosensors in Forensics, *Biosensors*, 9(4).
- Chaubey, A., and Malhotra, B. D.,** 2002, Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6), 441–456 p.
- Chen, A., and Shah, B.,** 2013, Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry, *Analytical Methods*, 5(9), 2158–2173 p.
- Chen, S., Cao, Z., and Jiang, S.,** 2009, Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids, *Biomaterials*, 30(29), 5892–5896 p.
- Church, T. R., Wandell, M., Lofton-Day, C., Mongin, S. J., Burger, M., Payne, S. R., Castaños-Vélez, E., Blumenstein, B. A., Rösch, T., Osborn, N., Snover, D., Day, R. W., Ransohoff, D. F., and for the PRESEPT Clinical Study Steering Committee, I. and S. T.,** 2014, Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 63(2), 317–325 p.
- Colon Cancer Treatment—NCI (nciglobal,ncienterprise),** (2024, March 5), <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq> (08.08.2024)
- Comprehensive Cancer Information—NCI (nciglobal,ncienterprise),** (1980, January 1) <https://www.cancer.gov/> (08.08.2024)

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Constâncio, V., Nunes, S. P., Henrique, R., and Jerónimo, C.,** 2020, DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types, *Cells*, 9(3).
- Das, A. B., Kumari, T., and Sahu, P. P.,** 2022, Calorimetric Biosensors: Core Principles, Techniques, Fabrication and Application, *Biosensors in Food Safety and Quality*.
- De Matos, L. L., Trufelli, D. C., De Matos, M. G. L., and Da Silva Pinhal, M. A.,** 2010, Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice, *Biomarker Insights*, 5, BMI.S2185.
- Deo, S., Turton, K. L., Kainth, T., Kumar, A., and Wieden, H.-J.,** 2022, Strategies for improving antimicrobial peptide production. *Biotechnology Advances*, 59, 107968 p.
- deVos, T., Tetzner, R., Model, F., Weiss, G., Schuster, M., Distler, J., Steiger, K. V., Grützmann, R., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Fleshner, P. R., Oubre, B. M., Day, R., Sledziewski, A. Z., and Lofton-Day, C.,** 2009, Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer. *Clinical Chemistry*, 55(7), 1337–1346 p.
- Dong, D., Zhang, J., Zhang, R., Li, F., Li, Y., and Jia, Y.,** Multiprobe Assay for Clinical SEPT9 Methylation Based on the Carbon Dot-Modified Liquid-Exfoliated Graphene Field Effect Transistor with a Potential to Present a Methylation Panorama, *ACS Omega*, 5(26), 16228–16237 p.
- Du, Y., and Dong, S.,** 2017, Nucleic Acid Biosensors: Recent Advances and Perspectives, *Analytical Chemistry*, 89(1), 189–215 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ducasse, M., and Brown, M. A.**, 2006, Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, 5(1), 60 p.
- Duffy, M. J.**, 2015, Use of Biomarkers in Screening for Cancer. In R. Scatena (Ed.), *Advances in Cancer Biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision*, Springer Netherlands, 27-39 p
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., and Dempsey, J. L.**, 2018, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206 p.
- E. McCracken, K., and Yoon, J.-Y.**, 2016, Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: A brief review. *Analytical Methods*, 8(36), 6591–6601 p.
- Erdem Büyükkiraz, M. and Kesmen, Z.**, 2022, Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds, *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573–1596 p.
- Estey, M. P., Kim, M. S., and Trimble, W. S.**, 2011, Septins. *Current Biology*, 21(10), R384–R387 p.
- Fagerlund, A., Myrset, A. H., and Kulseth, M. A.**, 2014, Construction of a Filamentous Phage Display Peptide Library. In A. E. Nixon (Ed.), *Therapeutic Peptides: Methods and Protocols*, 19–33 p.
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., and Sun, Y.**, 2008, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1), 8–26 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J., and Rawson, K.,** 2005, Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: Application to biosensor development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(1), 37–48 p.
- Fida, H. M., Kumada, Y., Terashima, M., Katsuda, T., and Katoh, S.,** 2009, Tandem multimer expression of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide in *Escherichia coli*, *Biotechnology Journal*, 4(9), 1345–1356 p.
- Fu, B., Yan, P., Zhang, S., Lu, Y., Pan, L., Tang, W., Chen, S., Chen, S., Zhang, A., and Liu, W.,** 2018, Cell-Free Circulating Methylated SEPT9 for Noninvasive Diagnosis and Monitoring of Colorectal Cancer. *Disease Markers*, 2018, e6437104.
- Gaglione, R., Pane, K., Dell’Olmo, E., Cafaro, V., Pizzo, E., Olivieri, G., Notomista, E., and Arciello, A.,** 2019, Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*. *New Biotechnology*, 51, 39–48 p.
- Gao, Y., Wang, J., Zhou, Y., Sheng, S., Qian, S. Y., and Huo, X.,** 2018, Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 2732 p.
- Garzón, V., Pinacho, D. G., Bustos, R.-H., Garzón, G., and Bustamante, S.,** 2019, Optical Biosensors for Therapeutic Drug Monitoring. *Biosensors*, 9(4).
- Gaughran, G., Aggarwal, N., Shadbolt, B., and Stuart-Harris, R.,** 2020, The utility of the tumor markers CA15.3, CEA, CA-125 and CA19.9 in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Management*, 9(4).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gezer, U., Yörüker, E. E., Keskin, M., Kulle, C. B., Dharuman, Y., and Holdenrieder, S.,** 2015, Histone Methylation Marks on Circulating Nucleosomes as Novel Blood-Based Biomarker in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12).
- GLOBOCAN, 2022.,** *Cancer Today*. Retrieved May 23, 2024, from <https://gco.iarc.who.int/today/>.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., and Reimhult, E.,** 2008, Electrochemical Biosensors—Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3).
- Grützmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., Miehle, S., Stolz, T., Model, F., Roblick, U. J., Bruch, H.-P., Koch, R., Liebenberg, V., deVos, T., Song, X., Day, R. H., Sledziewski, A. Z., and Lofton-Day, C.,** 2008, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLOS ONE*, 3(11), e3759.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A.,** 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674 p.
- Hanoglu, S. B., Man, E., Harmanci, D., Tozan Ruzgar, S., Sanli, S., Keles, N. A., Ayden, A., Tuna, B. G., Duzgun, O., Ozkan, O. F., Dogan, S., Ghorbanizamani, F., Moulahoum, H., Guler Celik, E., Evran, S., and Timur, S.,** 2022, Magnetic Nanoparticle-Based Electrochemical Sensing Platform Using Ferrocene-Labelled Peptide Nucleic Acid for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Biosensors*, 12(9).
- Hanoglu, S. B., Ucar, N., and Timur, S.,** 2024, Other Analytical Methods for the Detection of Biological and Chemical Threats. In *Plasmonic Nanosensors for Biological and Chemical Threats*. CRC Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Harshita, Wu, H.-F., and Kailasa, S. K., 2023, Recent advances in nanomaterials-based optical sensors for detection of various biomarkers (inorganic species, organic and biomolecules). *Luminescence*, 38(7), 954–998 p.

Hassan, S., Shehzad, A., Khan, S. A., Miran, W., Khan, S., and Lee, Y.-S., 2022, Diagnostic and Therapeutic Potential of Circulating-Free DNA and Cell-Free RNA in Cancer Management, *Biomedicines*, 10(8).

Hosu, O., Ravalli, A., Lo Piccolo, G. M., Cristea, C., Sandulescu, R., and Marrazza, G., 2017, Smartphone-based immunosensor for CA125 detection. *Talanta*, 166, 234–240 p.

Hou, J.-Y., Li, N., Wang, J., Gao, L.-J., Chang, J.-S., and Cao, J.-M., 2023, Histone crotonylation of peripheral blood mononuclear cells is a potential biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Epigenetics & Chromatin*, 16(1), 35 p.

Hou, W., Zhang, X., and Liu, C.-F., 2017, Progress in Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Transactions of Tianjin University*, 23(5), 401–419 p.

Hourfar, M. K., Michelsen, U., Schmidt, M., Berger, A., Seifried, E., and Roth, W. K., 2005, High-Throughput Purification of Viral RNA Based on Novel Aqueous Chemistry for Nucleic Acid Isolation. *Clinical Chemistry*, 51(7), 1217–1222 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Iida, M., Hazama, S., Tsunedomi, R., Tanaka, H., Takenouchi, H., Kanekiyo, S., Tokumitsu, Y., Tomochika, S., Tokuhisa, Y., Sakamoto, K., Suzuki, N., Takeda, S., Ueno, T., Yamamoto, S., Yoshino, S., Fujita, K., Kuroda, M., and Nagano, H.,** 2018, Overexpression of miR-221 and miR-222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer, *Oncology Reports*, 40(3), 1621–1631 p.
- Inoue, J., and Inazawa, J.,** 2021, Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential, *Journal of Human Genetics*, 66(9), 937–945 p.
- Jad, Y. E., Kumar, A., El-Faham, A., de la Torre, B. G., and Albericio, F.,** 2019, Green Transformation of Solid-Phase Peptide Synthesis, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(4), 3671–3683 p.
- James, C. R., Quinn, J. E., Mullan, P. B., Johnston, P. G., and Harkin, D.,** 2007, BRCA1, a Potential Predictive Biomarker in the Treatment of Breast Cancer, *The Oncologist*, 12(2), 142–150 p.
- Juds, C., Schmidt, J., Weller, M. G., Lange, T., Beck, U., Conrad, T., and Börner, H. G.,** 2020, Combining Phage Display and Next-Generation Sequencing for Materials Sciences: A Case Study on Probing Polypropylene Surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 142(24), 10624–10628 p.
- Kanwal, R., and Gupta, S.,** 2012, Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*, 81(4), 303–311 p.
- Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., and Ozsoz, M.,** 2004, Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Analytica Chimica Acta*, 518(1), 69–76 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Karimi-Maleh, H., Orooji, Y., Karimi, F., Alizadeh, M., Baghayeri, M., Rouhi, J., Tajik, S., Beitollahi, H., Agarwal, S., Gupta, V. K., Rajendran, S., Ayati, A., Fu, L., Sanati, A. L., Tanhaei, B., Sen, F., shabani-nooshabadi, M., Asrami, P. N., and Al-Othman, A.,** 2021, A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 184, 113252 p.
- Karimzadeh, A., Hasanzadeh, M., Shadjou, N., and Guardia, M. de la.,** 2018, Peptide based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 107, 1–20 p.
- Katz, E.,** 2019, Synthesis, Properties and Applications of Magnetic Nanoparticles and Nanowires—A Brief Introduction. *Magnetochemistry*, 5(4).
- Kerman, K., Matsubara, Y., Morita, Y., Takamura, Y., and Tamiya, E.,** 2004, Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, *Science and Technology of Advanced Materials*, 5(3), 351–357 p.
- Khan, S. A., Reddy, D., and Gupta, S.,** 2015, Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? *World Journal of Biological Chemistry*, 6(4), 333–345 p.
- Khrapunov, S.,** 2018, The Enthalpy-entropy Compensation Phenomenon. Limitations for the Use of Some Basic Thermodynamic Equations, *Current Protein and Peptide Science*, 19(11), 1088–1091 p.
- Kongpeth, J., Jampasa, S., Chaumpluk, P., Chailapakul, O., and Vilaivan, T.,** 2016, Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidinyI peptide nucleic acid probe, *Talanta*, 146, 318–325 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kurdistani, S. K.**, 2011, Histone Modifications in Cancer Biology and Prognosis. In S. M. Gasser & E. Li (Eds.), *Epigenetics and Disease: Pharmaceutical Opportunities*, 91–106 p.
- Lamb, Y. N., and Dhillon, S.**, 2017, Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer, *Molecular Diagnosis & Therapy*, 21(2), 225–232 p.
- le Sage, C., Nagel, R., Egan, D. A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafrè, S. A., Farace, M. G., and Agami, R.**, 2007, Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation, *The EMBO Journal*, 26(15), 3699–3708 p.
- Li, M., Zengeya, T., and Rozners, E.**, 2010, Short Peptide Nucleic Acids Bind Strongly to Homopurine Tract of Double Helical RNA at pH 5.5. *Journal of the American Chemical Society*, 132(25), 8676–8681p.
- Li, Y.**, 2011, Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260–267 p.
- Lin, Q., Fang, X., Chen, H., Weng, W., Liu, B., and Kong, J.**, 2021, Dual-modality loop-mediated isothermal amplification for pretreatment-free detection of Septin9 methylated DNA in colorectal cancer. *Microchimica Acta*, 188(9), 307 p.
- Lisdat, F., and Schäfer, D.**, 2008, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1555–1567 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Liu, J., Xu, N., Men, H., Li, S., Lu, Y., Low, S. S., Li, X., Zhu, L., Cheng, C., Xu, G., and Liu, Q.,** 2020, Salivary Cortisol Determination on Smartphone-Based Differential Pulse Voltammetry System. *Sensors*, 20(5).
- Liu, J., Xu, Y., Liu, S., Yu, S., Yu, Z., and Low, S. S.,** 2022, Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing, *Biosensors*, 12(7).
- Liu, Q., Wang, J., and Boyd, B. J.,** 2015, Peptide-based biosensors, *Talanta*, 136, 114–127 p.
- Martínez-Sáez, O., Chic, N., Pascual, T., Adamo, B., Vidal, M., González-Farré, B., Sanfeliu, E., Schettini, F., Conte, B., Brasó-Maristany, F., Rodríguez, A., Martínez, D., Galván, P., Rodríguez, A. B., Martinez, A., Muñoz, M., and Prat, A.,** 2020, Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer, *Breast Cancer Research*, 22(1), 45 p.
- Matsumura, T., Sugimachi, K., Iinuma, H., Takahashi, Y., Kurashige, J., Sawada, G., Ueda, M., Uchi, R., Ueo, H., Takano, Y., Shinden, Y., Eguchi, H., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ochiya, T., and Mimori, K.,** 2015, Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer, *British Journal of Cancer*, 113(2), 275–281p.
- McGuire, M. J., Li, S., and Brown, K. C.,** 2009, Biopanning of Phage Displayed Peptide Libraries for the Isolation of Cell-Specific Ligands. In A. Rasooly & K. E. Herold (Eds.), *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols: Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors*, 291–321 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Merrifield, B.**, 1997, Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. In *Methods in Enzymology*, Vol. 289, 3–13 p.
- Merrifield, R. B.**, 1985, Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English*, 24(10), 799–810 p.
- Mishra, S., Yadav, T., and Rani, V.**, 2016, Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 98, 12–23 p.
- Moccia, M., Caratelli, V., Cinti, S., Pede, B., Avitabile, C., Saviano, M., Imbriani, A. L., Moscone, D., and Arduini, F.**, 2020, Paper-based electrochemical peptide nucleic acid (PNA) biosensor for detection of miRNA-492: A pancreatic ductal adenocarcinoma biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112371 p.
- Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D., and Zhu, J.**, 2017, Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30, 1–14 p.
- Mozharivskyj, Y.**, 2016, Magnetocaloric Effect and Magnetocaloric Materials. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier.
- NCI**, 2017, **August 11**, *Liquid Biopsy: Using Tumor DNA in Blood to Aid Cancer Care* - NCI (nciglobal,ncienterprise), <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/liquid-biopsy-detects-treats-cancer> (08.08.2024)
- Noppe, W., Plieva, F., Galaev, I. Y., Pottel, H., Deckmyn, H., and Mattiasson, B.**, 2009, Chromato-panning: An efficient new mode of identifying suitable ligands from phage display libraries, *BMC Biotechnology*, 9(1), 21 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Özkan, S. A., Uslu, B., and Aboul-Enein, H. Y.,** 2003, Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33(3), 155–181p.
- Paik Soonmyung, Shak Steven, Tang Gong, Kim Chungyeul, Baker Joffre, Cronin Maureen, Baehner Frederick L., Walker Michael G., Watson Drew, Park Taesung, Hiller William, Fisher Edwin R., Wickerham D. Lawrence, Bryant John, and Wolmark Norman,** 2004, A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer, *New England Journal of Medicine*, 351(27), 2817–2826 p.
- Paleček, E., and Fojta, M.,** 2007, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing, *Talanta*, 74(3), 276–290p.
- Pavan, S., and Berti, F.,** 2012, Short peptides as biosensor transducers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(10), 3055–3070 p.
- Pavanello, M., Chan, I. H., Ariff, A., Pharoah, P. D., Gayther, S. A., and Ramus, S. J.,** 2020, Rare Germline Genetic Variants and the Risks of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers*, 12(10).
- Pellestor, F., and Paulasova, P.,** 2004, The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *European Journal of Human Genetics*, 12(9).
- Peltomaa, R., Benito-Peña, E., Barderas, R., and Moreno-Bondi, M. C.,** 2019, Phage Display in the Quest for New Selective Recognition Elements for Biosensors. *ACS Omega*, 4(7), 11569–11580 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Perumal, V., and Hashim, U.,** 2014, Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1–15 p.
- Petcharoen, K., and Sirivat, A.,** 2012, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Materials Science and Engineering: B*, 177(5), 421–427 p.
- Pfeiffer, F., and Mayer, G.,** 2016, Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Frontiers in Chemistry*, 4.
- Qi, S., Duan, N., Sun, Y., Zhou, Y., Ma, P., Wu, S., and Wang, Z.,** 2021, High-affinity aptamer of allergen β -lactoglobulin: Selection, recognition mechanism and application, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 340, 129956 p.
- Ravegnini, G., Cargnin, S., Sammarini, G., Zanotti, F., Bermejo, J. L., Hrelia, P., Terrazzino, S., and Angelini, S.,** 2019, Prognostic Role of miR-221 and miR-222 Expression in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*, 11(7).
- Reid, G. D., Whittaker, D. J., Day, M. A., Turton, D. A., Kayser, V., Kelly, J. M., and Beddard, G. S.,** 2002, Femtosecond electron-transfer reactions in mono- and polynucleotides and in DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 124(19), 5518–5527 p.
- Rocha-Santos, T. A. P.,** 2014, Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 62, 28–36 p.
- Rodenhiser, D., and Mann, M.,** 2006, Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 174(3), 341–348 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Saadati, A., Hassanpour, S., Guardia, M. de la, Mosafer, J., Hashemzaei, M., Mokhtarzadeh, A., and Baradaran, B.,** 2019, Recent advances on application of peptide nucleic acids as a bioreceptor in biosensors development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 114, 56–68 p.
- Saarbach, J., Sabale, P. M., and Winssinger, N.,** 2019, Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 52, 112–124 p.
- Sadeghan, A. A., Soltaninejad, H., Dadmehr, M., Hamidieh, A. A., Asadollahi, M. A., Hosseini, M., Ganjali, M. R., and Hosseinkhani, S.,** 2021, Fluorimetric detection of methylated DNA of Sept9 promoter by silver nanoclusters at intrastrand 6C-loop. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 247, 119081 p.
- Sadeghan, A. A., Soltaninejad, H., Hosseinkhani, S., Hosseini, M., Ganjali, M. R., and Asadollahi, M. A.,** 2018, Fluorescence enhancement of silver nanocluster at intrastrand of a 12C-loop in presence of methylated region of sept 9 promoter. *Analytica Chimica Acta*, 1038, 157–165 p.
- Saito, H., Otsubo, K., Kakimoto, A., Komatsu, N., and Ohsaka, A.,** 2010, Emergence of two unrelated clones in acute myeloid leukemia with *MLL-SEPT9* fusion transcript. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 201(2), 111–115p.
- Sandrock, K., Bartsch, I., Bläser, S., Busse, A., Busse, E., and Zieger, B.,** 2011, *Characterization of human septin interactions*. 392(8–9), 751–761 p.
- Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., and Murray, R. W.,** 2009, Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir*, 25(24), 13840–13851 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sarhadi, V. K., and Armengol, G.,** 2022, Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*, 12(8).
- Scott, M., McCluggage, W. G., Hillan, K. J., Hall, P. A., and Russell, S. E. H.,** 2006, Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis, *International Journal of Cancer*, 118(5), 1325–1329 p.
- Sfragano, P. S., Moro, G., Polo, F., and Palchetti, I.,** 2021, The Role of Peptides in the Design of Electrochemical Biosensors for Clinical Diagnostics. *Biosensors*, 11(8).
- Shakeel, S., Karim, S., and Ali, A.,** 2006, Peptide nucleic acid (PNA)—A review, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(6), 892–899 p.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., and Jemal, A.,** 2023, Cancer statistics, 2023, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48 p.
- Singh, V., and Krishnan, S.,** 2014, An electrochemical mass sensor for diagnosing diabetes in human serum, *Analyst*, 139(4), 724–728 p.
- Siraj, A. K., Masoodi, T., Bu, R., Parvathareddy, S. K., Al-Badawi, I. A., Al-Sanea, N., Ashari, L. H., Abduljabbar, A., Alhomoud, S., Al-Sobhi, S. S., Tulbah, A., Ajarim, D., Alzoman, K., Aljuboury, M., Yousef, H. B., Al-Dawish, M., Al-Dayel, F., Alkuraya, F. S., and Al-Kuraya, K. S.,** 2017, Expanding the spectrum of germline variants in cancer, *Human Genetics*, 136(11), 1431–1444 p.
- Slavkovic, S., and Johnson, P. E.,** 2018, Isothermal titration calorimetry studies of aptamer-small molecule interactions: Practicalities and pitfalls. *OPEN ACCESS*, 2, 7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Smith, G. P.**, 2019, Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 58(41), 14428–14437 p.
- Song, J., Ouyang, Y., Che, J., Li, X., Zhao, Y., Yang, K., Zhao, X., Chen, Y., Fan, C., and Yuan, W.**, 2017, Potential Value of miR-221/222 as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers for Diseases. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Song, Q., An, Q., Niu, B., Lu, X., Zhang, N., and Cao, X.**, 2019, Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism, *Journal of Oncology*, 2019, e7252013.
- Song, Y., Wei, W., and Qu, X.**, 2011, Colorimetric Biosensing Using Smart Materials, *Advanced Materials*, 23(37), 4215–4236 p.
- Stöber, W., Fink, A., and Bohn, E.**, 1968, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69 p.
- Sugimoto, N., Satoh, N., Yasuda, K., and Nakano, S.**, 2001, Stabilization Factors Affecting Duplex Formation of Peptide Nucleic Acid with DNA. *Biochemistry*, 40(29), 8444–8451 p.
- Sun, K., Wang, W., Zeng, J., Wu, C., Lei, S., and Li, G.**, 2011, MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(3), 375–384 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Syedmoradi, L., Hajghassem, H., Tavoosidana, G., Rezayat, M., Faridi-Majidi, R., and Omidfar, K.,** 2018, An electrochemical sensing platform for sensitive detection DNA methylation using Fe₃O₄/TMC/Au nanocomposite and poly(l-arginine)/reduced graphene oxide modified screen-printed carbon electrode, *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 4, 216–221 p.
- Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., and Klajnert-Maculewicz, B.,** 2019, Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 16(1), 1–23 p.
- Tänzer, M., Balluff, B., Distler, J., Hale, K., Leodolter, A., Röcken, C., Molnar, B., Schmid, R., Lofton-Day, C., Schuster, T., and Ebert, M. P. A.,** 2010, Performance of Epigenetic Markers SEPT9 and ALX4 in Plasma for Detection of Colorectal Precancerous Lesions. *PLOS ONE*, 5(2), e9061.
- Tian, L., Jackson, K., Chan, M., Saif, A., He, L., Didar, T. F., and Hosseinidoust, Z.,** 2022, Phage display for the detection, analysis, disinfection, and prevention of *Staphylococcus aureus*, *Smart Medicine*, 1(1), e20220015.
- Tremi, I., Havaki, S., Georgitsopoulou, S., Lagopati, N., Georgakilas, V., Gorgoulis, V. G., and Georgakilas, A. G.,** 2021, A Guide for Using Transmission Electron Microscopy for Studying the Radiosensitizing Effects of Gold Nanoparticles In Vitro. *Nanomaterials*, 11(4).
- Tsunoda, T., Takashima, Y., Yoshida, Y., Doi, K., Tanaka, Y., Fujimoto, T., Machida, T., Ota, T., Koyanagi, M., Kuroki, M., Sasazuki, T., and Shirasawa, S.,** 2011, Oncogenic KRAS Regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-Specific Manner in Colorectal Cancer Cells, *Anticancer Research*, 31(7), 2453–2459 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ulijn, R. V., and Smith, A. M.,** 2008 Designing peptide based nanomaterials *Chemical Society Reviews*, 37(4), 664–675 p.
- Vakiani, E., and Solit, D. B.,** 2011, KRAS and BRAF: Drug targets and predictive biomarkers, *The Journal of Pathology*, 223(2), 220–230 p.
- Walker, N. L., Roshkolaeva, A. B., Chapoval, A. I., and Dick, J. E.,** 2021, Recent advances in potentiometric biosensing. *Current Opinion in Electrochemistry*, 28, 100735 p.
- Wang, D., Wang, P., Liang, Z., Li, Z., Liu, N., and Ma, Q.,** 2023, Novel Cu nanocluster superlattice/MBene-induced ECL enhancement strategy for miRNA-221 detection, *Chemical Engineering Journal*, 478, 147512 p.
- Wang, G., Su, X., Xu, Q., Xu, G., Lin, J., and Luo, X.,** 2018, Antifouling aptasensor for the detection of adenosine triphosphate in biological media based on mixed self-assembled aptamer and zwitterionic peptide, *Biosensors and Bioelectronics*, 101, 129–134 p.
- Wang, M., Li, L., Zhang, L., Zhao, J., Jiang, Z., and Wang, W.,** 2022, Peptide-Derived Biosensors and Their Applications in Tumor Immunology-Related Detection, *Analytical Chemistry*, 94(1), 431–441 p.
- Wang, Y., Chen, Z., and Chen, W.,** 2017, Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: A pilot study, *European Journal of Medical Research*, 22(1), 51 p.
- Wasserkort, R., Kalmar, A., Valcz, G., Spisak, S., Krispin, M., Toth, K., Tulassay, Z., Sledziewski, A. Z., and Molnar, B.,** 2013, Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer*, 13(1), 398p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- WHO**, 2022, *Cancer*, Cancer, <https://www.who.int/health-topics/cancer> (08.08.2024)
- WHO**, 2024, *Cancer*. Retrieved May 22, 2024, from <https://www.who.int/health-topics/cancer> (08.08.2024)
- Wu, S. C., and Zhang, Y.**, 2010, Active DNA demethylation: Many roads lead to Rome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 607–620 p.
- Xu, P., Ghosh, S., Gul, A. R., Bhamore, J. R., Park, J. P., and Park, T. J.**, 2021, Screening of specific binding peptides using phage-display techniques and their biosensing applications, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116229 p.
- Xue, Q., Sun, K., Deng, H.-J., Lei, S.-T., Dong, J.-Q., and Li, G.-X.**, 2013, Anti-miRNA-221 sensitizes human colorectal carcinoma cells to radiation by upregulating PTEN, *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(48), 9307–9317 p.
- Yurkova, M. S., Sadykhov, E. G., and Fedorov, A. N.**, 2020, Production of a toxic polypeptide as a fusion inside GroEL cavity. *Scientific Reports*, 10(1).
- Zhang, H., Wang, Q., Yang, X., Wang, K., Li, Q., Li, Z., Gao, L., Nie, W., and Zheng, Y.**, 2017, An isothermal electrochemical biosensor for the sensitive detection of microRNA based on a catalytic hairpin assembly and supersandwich amplification. *Analyst*, 142(2), 389–396 p.
- Zhang, H., Zhu, M., Shan, X., Zhou, X., Wang, T., Zhang, J., Tao, J., Cheng, W., Chen, G., Li, J., Liu, P., Wang, Q., and Zhu, W.**, 2019, A panel of seven-miRNA signature in plasma as potential biomarker for colorectal cancer diagnosis, *Gene*, 687, 246–254 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zhang, S., Wright, G., and Yang, Y., 2000, Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5), 273–282 p.

Zhao, G., Ma, Y., Li, H., Li, S., Zhu, Y., Liu, X., Xiong, S., Liu, Y., Miao, J., Fei, S., Zheng, M., and Zhao, X., 2020, A novel plasma based early colorectal cancer screening assay base on methylated *SDC2* and *SFRP2*, *Clinica Chimica Acta*, 503, 84–89 p.



TEŞEKKÜR

2018 yılından bu yana hem yüksek lisans hem de doktora eğitimim boyunca bana güvenen ve laboratuvarının kapılarını açan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, akademik ve tez çalışmalarım sırasında her türlü destek ve katkıları sağlayan saygıdeğer tez danışmanım **Prof. Dr. Suna TİMUR'a**,

İlk tanıştığımız günden itibaren her zaman desteğini hissettiğim, her türlü soruma bıkmadan usanmadan cevap veren, akademik ve tez çalışmalarım da bilgisini ve emeklerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Serap EVRAN'a**,

Doktora tez çalışmalarım sırasında benden desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen **EGE-MATAL bünyesindeki tüm öğretim üyeleri'e**,

Tez çalışmalarımın bir bölümü olan PoC tasarımı ve SEM görüntülemelerinde bilgilerini ve yardımını esirgemeyen **Dr. Şerife TOZAN RÜZGAR'a**

Hiçbir şey söylememe gerek kalmadan, bazen sadece bir bakış ile her daim yardımına koşan, desteğini ve bilgisini benden hiç esirgemedi yol gösteren, derdimi de sevincimi de anlayan ve her daim sırtımı sıvazlayan canım **Dr. Duygu HARMANCI KARAGÜLLE'e**

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan her zaman mutluluk duyduğum, iyi kalpliliği, çalışkanlığı ve yardımseverliği ile her zaman başarılı olacağına inandığım **Nursima UÇAR'a**,

Hayatımın ilk gününden itibaren hep arkamda olduklarını bildiğim, maddi ve manevi desteklerini benden bugüne kadar hiç esirgememiş, bu hayattaki en büyük destekçilerim başta canım annem **Mine BALABAN** başta olmak üzere, babam **Ümit BALABAN**, ablam **Hande KASAP** ve tontonum anneannem **Zeynep ŞAVKAL'a**,

En az kök ailem kadar bana sahip çıkan ve desteklerini her zaman hissettiğim ikinci annem ve babam **Neval HANOĞLU** ve **Hüsnü HANOĞLU**'a,

Ve tüm bu süreçte yaşadığım zorlukları benimle göğüslediği, her düştüğümde beni kaldırıp, gözyaşlarımı silip, cesaretlendirdiği ve yaralarımı sararak kaldığım yerden devam etmemi sağladığı için, hayatımızdan çalıp bilgisayar başında geçirdiğim her dakika beni sabırla beklediği için hayat arkadaşım **Alper HANOĞLU**'a sonsuz teşekkürlerimle...

Bu tez çalışmasının bir bölümü **219S405 no'lu TÜBİTAK-COST** proje tarafından desteklenmiştir. Tüm doktora eğitimim boyunca, **16-DPT-001 nolu Kalkınma Bakanlığı “Madde Bağımlılığı Biyosensör Laboratuvarı”** projesi tarafından burs desteği sağlanmıştır. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK ve Kalkınma Bakanlığına teşekkürü borç bilirim.

Simge BALABAN HANOĞLU

ÖZGEÇMİŞ

Simge BALABAN HANOĞLU

EĞİTİM BİLGİLERİ:

- Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tezli Doktora 2020-...
- Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans 2018-2020
- Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Kimya Bölümü
Lisans 2011-2016

DENEYİMLER:

Caran Kimya, AR-GE Kağıt Laboratuvarı Sorumlusu (Haziran, 2024-....)

- Kağıt laboratuvarı ile ilgili her türlü deneysel adımların yürütülmesi,
- Laboratuvarda yapılan işlerin raporlanması,
- Kağıt ile ilgili her türlü proje yazımı, proje yürütülmesi ve raporlanması.

Doktora, Ege Üniversitesi, Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (2020-....)

- 16-DPT-001 kodlu Kalkınma Bakanlığı Projesi kapsamında Biyokimyager olarak
- Elektrokimyasal ve optik sensör sistemlerinin geliştirilmesi
- Kanseri, COVID-19 gibi enfeksiyon hastalıkları gibi pek çok analitlerin dedeksiyonu amacıyla biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi
- Proje yazımı, proje yürütülmesi ve raporlanması
- Malzeme alım işlemleri

Molkim Endüstriyel Ürünler, AR-GE Personeli (Kasım, 2019-Haziran,2020)

- Endüstriyel temizleme kimyasallarının üretimi ve geliştirilmesi

- Farklı endüstriyel temizleme kimyasallarının muadillerinin oluşturulması
- Endüstriye yönelik farklı TÜBİTAK ve KOSGEB projelerinin yazımı ve yürütülmesi

Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2018-2020)

- Elektrokimyasal biyosensör sistemleri
- Doping maddelerinin ve yasa dışı maddelerin dedeksiyonu için biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi

A&G Laboratuvarları Pür Gıda (Haziran, 2015) Analiz

- Kimyasal analiz laboratuvarında gelen ürünlerin analizlerinin (toplam şeker, toplam azot vb.) gerçekleştirilmesi
- Katkı, kalıntı, mineral laboratuvarında gelen ürünlerin analizlerinin (GC-MS, HPLC, LC-MS ile pestisit analizi, ağır metal tayinleri) gerçekleştirilmesi

YAYINLAR

- **Review Article:**

Hanoglu, S. B., Harmanci, D., Evran, S., & Timur, S. (2024). Detection strategies of infectious diseases via peptide-based electrochemical biosensors. Bioelectrochemistry, 108784. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108784>

- **Research Article:**

Harmanci, D., **Hanoglu S.B.,** Kayali, G. A., Durgunlu, E., Ucar, N., Cicek, C., Timur, S. (2023). Post-Vaccination Detection of SARS-CoV-2 Antibody Response with Magnetic Nanoparticle-Based Electrochemical Biosensor System, Biosensors 13(9), 851. <https://www.mdpi.com/2079-6374/13/9/851>.

- **Review Article:**

Hanoglu S.B., Harmanci D., Ucar N., Evran S., Timur S. (2023). Recent Approaches in Magnetic Nanoparticle-Based Biosensors of miRNA Detection, *Magnetochemistry* 9 (1), 23. <https://www.mdpi.com/2312-7481/9/1/23>

- **Research Article:**

Hanoglu, S. B., Man, E., Harmanci, D., Tozan Ruzgar, S., Sanli, S., Keles, N. A., ... & Timur, S. (2022). Magnetic Nanoparticle-Based Electrochemical Sensing Platform Using Ferrocene-Labelled Peptide Nucleic Acid for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Biosensors*, 12(9), 736. <https://doi.org/10.3390/bios12090736>.

- **Research Article:**

Bor, G., Bulut, U., Man, E., **Hanoglu, S. B.**, Evran, S., & Timur, S. (2022). Synthetic antibodies for methamphetamine analysis: Design of high affinity aptamers and their use in electrochemical biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116686>.

- **Research Article:**

Durmus, C., **Hanoglu, S. B.**, Harmanci, D., Moulahoum, H., Tok, K., Ghorbanizamani, F., Sanlı, S., Zihnioglu, F., Evran, S., Cicek, C., Sertoz, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S. (2022). Indiscriminate SARS-CoV-2 multivariant detection using magnetic nanoparticle-based electrochemical immunosensing. *Talanta*, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123356>.
(Durmus, C., and Hanoglu, S.B. contributed equally)

- **Research Article:**

Tok, K., Moulahoum, H., Ghorbanizamani, F., Harmanci, D., **Hanoglu, S. B.**, Durmus, C., Evran, S., Cicek, C., Sertoz, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S., Zihnioglu, F. Simple Workflow to Repurpose SARS-CoV-2 Swab/Serum Samples for the Isolation of Cost-Effective Antibody/Antigens for Proteotyping Applications and Diagnosis. Under review in the *Analytical and Bioanalytical Chemistry Journal*, <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03654-4>.

- **Research Article:**

Ghorbanizamani, F., Tok, K., Moulahoum, H., Harmanci, D., **Hanoglu, S. B.**, Durmus, C., Zihnioglu, F., Evran, S., Cicek, C., Serto, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S. (2021). Dye-Loaded Polymersome-Based Lateral Flow Assay: Rational Design of a COVID-19 Testing Platform by Repurposing SARS-CoV-2 Antibody Cocktail and Antigens Obtained from Positive Human Samples. *ACS Sensors*, <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00854>.

- **Review Article:**

Beduk, T., Durmus, C., **Hanoglu, S. B.**, Beduk, D., Salama, K. N., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S. (2021). Breath as the Mirror of Our body, is the Answer Really Blowing in the Wind? Recent Technologies in Exhaled Breath Analysis Systems as Non-invasive Sensing Platforms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116329>

- **Research Article:**

Balaban, S., Beduk, T., Durmus, C., Aydindogan, E., Salama, K. N., Timur, S. (2020). Laser-Scribed Graphene Electrodes As An Electrochemical Immunosensing Platform For Cancer Biomarker ‘eIF3d’. *Electroanalysis*, <https://doi.org/10.1002/elan.202060482> (Cover picture)

- **Research Article:**

Bor, G., Man, E., Ugurlu, O., Ceylan, A. E., **Balaban, S.**, Durmus, C., Gumus, Z. P., Evran, S., Timur, S. (2020). in vitro Selection of Aptamer for Imidacloprid Recognition as Model Analyte and Construction of a Water Analysis Platform. *Electroanalysis*, <https://doi.org/10.1002/elan.202000075>

- **Research Article:**

Balaban, S., Man, E., Durmus, C., Bor, G., Ceylan, A. E., Gumus, Z. P., Evran, S., Coskunol, H., Timur, S. (2019). Sensor Platform with a Custom-Tailored Aptamer for Diagnosis of Synthetic Cannabinoids. *Electroanalysis*, <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201900670>

- **Review Article:**

Aydindogan, E., **Balaban, S.**, Evran, S., Coskunol, H., Timur, S. (2019) Bottom-Up Approach for Developing Aptasensors for Abused Drugs: Biosensors in Forensics. *Biosensors*, 9(4), 118; <https://doi.org/10.3390/bios9040118>

- **Research Article:**

Balaban, S., Durmus, C., Aydindogan, E., Gumus, Z. P. and Timur, S. (2019), An Electrochemical Biosensor Platform for Testing of Dehydroepiandrosterone 3-Sulfate (DHEA-S) as a Model for Doping Materials. *Electroanalysis*. *Electroanalysis*; doi:10.1002/elan.201900413

KİTAP BÖLÜMLERİ

- **Hanoglu S.B.**, Ucar N., Timur S. (2024) Other Analytical Methods for the Detection of Biological and Chemical Threats (pp. 289-330.) *Plasmonic Nanosensors for Biological and Chemical Threats*, Taylor & Francis Group, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003459316>.
- Harmanci D., **Hanoglu S.B.**, Beduk D. (2023) Electrochemical Sensors Based on Nanostructured Materials for Point-of-Care Diagnostics, In *Handbook of Nanobioelectrochemistry: Application in Devices and Biomolecular Sensing* (pp. 809-828). Singapore: Springer Nature Singapore. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-981-19-9437-1_37
- Harmanci D., **Hanoglu S.B.**, Beduk D., Durmus C., Timur S. (2023) Theranostic applications of functionalized carbon nanotubes, *Emerging Applications of Carbon Nanotubes in Drug and Gene Delivery*, 255-294. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323851992000029>

POSTER VE SÖZLÜ SUNUMLAR

POSTERLER

- **Hanoglu, S.B.**, Harmanci, D., Akkus, G., Durgunlu E., Ucar, N., Cicek, C., Timur, S. Magnetic nanoparticle-based biosensor system for SARS-CoV-2 antibody response following vaccination. 17th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NANOTR-17), 27-29 August 2023, Izmir-Turkey.

- **Hanoglu, S.B.,** Man, E., Harmanci, D., Ghorbanizamani, F., Moulahoum, H., Ruzgar, S. T., Keles, N. A., Ayden, A.,Tuna, B. G., Duzgun, O., Ozkan, O. F., Dogan, S., Celik, E.G., Evran, S., Timur, S. A Point-of-Care (PoC) Device Design: Preliminary Studies for the Detection of the Colorectal Cancer Biomarker. 5th International Congress on Biosensors, 21-23 September 2022, Canakkale- Turkey.
- Ucar, N., Harmanci, D., **Hanoglu, S. B.,** Man, E., Zihnioglu, F., Evran, S., Cicek, C., Serto, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S. Development of Aptasensor For the Diagnosis of COVID-19. 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NANOTR-16), 5-8 September 2022, Ankara- Turkey.
- **Hanoglu, S.B.,** Man, E., Harmanci, D., Ghorbanizamani, F., Moulahoum, H., Ruzgar, S. T., Evran, S., Keles, N. A., Ayden, A.,Tuna, B. G., Duzgun, O., Ozkan, O. F., Dogan, S., Celik, E.G., Timur, S. Nanomaterial- Based Electrochemical and Optical Sensor Systems for Colorectal Cancer Detection. 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NANOTR-16), 5-8 September 2022, Ankara- Turkey.
- **Hanoglu, S. B.,** Durmus C., Harmanci D., Moulahoum H., Tok K., Ghorbanizamani F., Sanlı S., Zihnioglu, F., Evran, S., Cicek, C., Serto, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K., Timur, S. Comparison of electrochemical immunosensor platforms for indiscriminate SARS-CoV-2 variant detection. 46. FEBS Congress. 9-14 July 2022, Portugal-Lisboa
- Ucar, N., Harmanci, D., **Hanoglu, S. B.,** Man, S., Zihnioglu, F. Evran, S., Cicek, C., Serto, R., Arda, B., Göksel, T., Turhan, K., Timur, S. Aptasensor Development for COVID-19 Detection. VII. Turkey in vitro Diagnostic (IVD) Symposia: Inflammation. 27-29 April 2022, Online, (En iyi poster ödülü).
- **Balaban, S.,** Aydindogan, E., Durmuş, C., Timur, S. Electrochemical Biosensor Design for Dehydroepiandrosterone-3-Sulfate (Dhea-S) Analysis Used For Doping – IV. Turkey in vitro Diagnostic (IVD) Symposia: Biosensors 20-22 February 2019, Izmir

SÖZLÜ SUNUMLAR

- Harmanci, D., **Hanoglu, S. B.**, Durmus, C., Man, E., Gumus, Z.P., Timur, S. A novel and rapid pesticide test: aptamer-based lateral flow assay for detecting and monitoring imidacloprid in water. 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NANOTR-16), 5-8 September 2022, Ankara- Turkey, (Duygu Harmancı tarafından sunulmuştur)
- **Hanoglu, S. B.**, Man, E., Karagulle D. H., Celik, E. G., Evran, S., Timur, S. Biosensing of methylated DNAs as biomarker for the diagnosis of colorectal cancer- COST Action CA17118 TRANSCOLONCAN- 7-9 March-Torino meeting 2022, (Emine Güler Çelik tarafından sunulmuştur).

PROJELER

- 219S405 kodlu “Kolon Kanserinin Tanı ve Tedavisinin İzlenmesinde Biyobelirteç Olarak Kullanılan Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik Biyoanalitik Sistemlerin Geliştirilmesi-TUBİTAK Projesi (Nisan, 2022-Haziran, 2022) Bursiyer Öğrenci.
- 120R021- kodlu “COVID-19'un Hızlı ve Doğru Tanısına Yönelik Nanoparçacık Destekli Yenilikçi Elektrokimyasal Test ve Analiz Yöntemlerinin Eldesi”- TUBİTAK Projesi (Ocak, 2021-Nisan, 2021) Bursiyer Öğrenci.
- TOA-2020-21862 kodlu “COVID19 Tanısına Yönelik Yenilikçi Test Kitlerinin Geliştirilmesi”- BAP projesi (Ağustos, 2020- Ağustos, 2022), Araştırmacı.
- 18-EGEMATAL-001 kodlu “Doping Amaçlı Kullanılan Maddelerin Analizine Yönelik Yenilikçi Biyo Analiz Sistemlerinin Geliştirilmesi ve LC-QTOF/MS ile Doğrulanması”- BAP projesi (Ekim,2017-Şubat,2020) (Yüksek lisans, tez konum ile ilişkili proje)
- 116Z31 kodlu “Ketokonazol ve Klotrimazole Maruz Kalan Saccharomyces cerevisiae Hücrelerinde İntrinsik Apoptozis Yolizi İle Oksidan-Antioksidan Dengesi, Hasar Düzeyi ve Metabolik Yolizlerinde

Meydana Gelen Bazı Degisimlerin Aydınlatılması” TUBİTAK 1001 Projesi (20.02.2018- 02.07.2018) Bursiyer Öğrenci.

BAŞARILAR VE BURSLAR

- FEBS Congress-2022- Young scientist- FEBS Bursu
- 16-DPT-001 kodlu Kalkınma Bakanlığı alt yapı projesi- Çalışan Araştırmacı (Nisan, 2021-....)
- 219S405 kodlu TUBİTAK-COST projesi “Kolon Kanserinin Tanı ve Tedavisinin İzlenmesinde Biyobelirteç Olarak Kullanılan Metillenmiş DNA'ların Analizine Yönelik Biyoanalitik Sistemlerin Geliştirilmesi” (Nisan, 2022-Haziran, 2022).
- 120R021 kodlu TUBİTAK Projesi "COVID-19'un Hızlı ve Doğru Tanısına Yönelik Nanoparçacık Destekli Yenilikçi Elektrokimyasal Test ve Analiz Yöntemlerin Eldesi" (Ocak, 2021- Nisan, 2021)
- 10-DPT-002 kodlu Kalkınma Bakanlığı alt yapı projesi - Çalışan Araştırmacı (Haziran, 2020- Aralık,2020)
- 16-DPT-001 kodlu Kalkınma Bakanlığı alt yapı projesi- Çalışan Araştırmacı (Ocak, 2019- Kasım, 2019)
- Dokuz Eylül Üniversitesi- 2016, Kimya bölümü mezunu- Bölüm İkinciliği

TOPLANTI VE KURSLAR

- NANOTR-17, 27-29 Ağustos 2023, İzmir- Turkey.
- 5th International Congress on Biosensors, 21-23 Eylül 2022, Çanakkale-Turkey
- NANOTR-16, 5-8 Eylül 2022, Ankara- Turkey,
- FEBS Kongresi-2022-Lizbon
- COST Action CA17118 TRANSCOLONCAN, “Colon cancer tumor profile”, 20-21, Eylül- Romanya/ Bükreş toplantısı 2021.
- 2237A- TUBİTAK- Bilimsel Eğitim Etkinlik Programı- “Biyomühendislikte Güncel Yaklaşımlar-I”- 24-26, Kasım 2021, Ege Üniversite, Biyomühendislik Bölümü (Online), Katılımcı

- 2237A- TUBİTAK- Bilimsel Eğitim Etkinlik Programı- “Diagnostik Yaklaşımlar ve Güncel Gelişmeler”- 28 Eylül- 01 Ekim 2021, EGE-MATAL/ İzmir, Yardımcı Personel
- IV. Turkey in vitro Diagnostic (IVD) Symposium, Biosensors, Şubat 2019, İzmir.
- Proteomic and Biomarker Discovery: General Concepts & Special Course on Preparing Future Faculty for Teaching, Bir günlük konferans, Mayıs, 2019, EGE-MATAL/ İzmir.

SERTİFİKALAR

- 11/2020 ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi (Yaşam Artı Eğitim Danışmanlık)
- 07/2018 GC - HPLC Chromatography Training
- 11/2018 Uygulamalı XPS (X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi) Eğitimi

YABANCI DİL

İngilizce- Intermediate

BECERİLER

Bilgisayar Bilgileri: Microsoft Office Programları, Origin, Prisma

Aletsel Bilgiler: XPS, HPLC, GC